



**Université Constantine 1 Frères Mentouri**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري كلية علوم  
الطبيعة والحياة

**Département : Biologie Animale**

قسم : بيولوجيا الحيوان

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Immunologie moléculaire et cellulaire**

**N° d'ordre :**

**N° de série :**

**Intitulé :**

---

**Interprétation immunologique du microbiote intestinal : pistes théorique et  
methodologique.**

---

**Présenté par : Fatmi Abdeldjallil**

**Le : 22/06/2025**

**Jury d'évaluation :**

**Président :** Mme CHAIB Aouatef (MCB-Université des Frères Mentouri, Constantine 1)

**Encadrant :** Mme AGGOUN Cherifa (MCB-Université des Frères Mentouri, Constantine 1)

**Examineur(s):** Mme MECHATI Chahinez (MAA-Université des Frères Mentouri, Constantine 1)

**Année universitaire**  
**2024 - 2025**

# Remerciements

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à mon encadrant pour son accompagnement, ses conseils précieux et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Je remercie également l'équipe pédagogique du département pour la qualité de la formation dispensée.

Mes remerciements vont aussi au personnel du laboratoire pour leur aide technique.

Un grand merci à ma famille pour son soutien inconditionnel.

Je n'oublie pas mes collègues et amis pour leurs encouragements constants.

À toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, merci infiniment.

# Table des matières

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

## **CHAPITRE 01 : Description du microbiote intestinal**

1. Généralité sur le tractus digestif .....	2
2. Le microbiote intestinal.....	3
2.1 Définition.....	3
2.2 Développement et composition du microbiote intestinal .....	3
2.3 Facteurs influençant la composition du microbiote.....	5
3. Fonctions du microbiote intestinal.....	6
3.1 Rôle dans la digestion et le métabolisme.....	6
3.2 Modulation du système immunitaire .....	7

## **CHAPITRE 02 : Interactions entre microbiote et système immunitaire**

1. Mécanismes de tolérance immunitaire .....	9
1.1 Rôle des lymphocytes T régulateurs (Treg).....	9
1.2 Rôle des cellules dendritiques dans la tolérance immunitaire.....	10
2. Signalisation moléculaire .....	12
2.1 Rôle des Toll-like receptors (TLR) .....	12
2.2 Rôle des NOD-like receptors (NLR).....	14
3. Barrière intestinale et immunité muqueuse .....	15
3.1 Rôle des cellules épithéliales et des jonctions serrées .....	16
3.2 Production d'IgA sécrétoires .....	18

## **CHAPITRE 03 : Dysbiose intestinale et maladies auto-immunes**

1. Définition .....	20
2. Mécanismes physiopathologiques de la dysbiose intestinale .....	22

2.1 Altération de la barrière intestinale et inflammation .....	22
2.2 Activation du système immunitaire.....	23
2.3 Influence sur le métabolisme .....	24
3. Dysbiose intestinale et maladies inflammatoires et auto-immunes .....	24
3.1 Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).....	24
3.2 Rôle du microbiote dans les maladies auto-immunes systémiques .....	27
3.3 Rôle du microbiote dans les maladies métaboliques .....	29

#### **CHAPITRE 04 : Méthodes d'analyse et stratégies thérapeutiques de la dysbiose**

1. Techniques de diagnostic .....	31
1.1 Techniques moléculaires de détection du microbiote intestinal.....	31
1.1.1 PCR et PCR Quantitative en Temps Réel (qPCR) .....	31
1.1.2 Séquençage de l'ARNr 16S.....	32
1.1.3 La métagénomique .....	33
1.2 Dosage des cytokines et marqueurs de l'inflammation .....	34
1.2.1 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) .....	34
1.2.2 La cytométrie en flux.....	35
2. Modèles expérimentaux pour l'étude de la dysbiose intestinale .....	36
3. Approches thérapeutiques .....	38
3.1 L'utilisation des probiotiques.....	38
3.2 L'utilisation des prébiotiques.....	38
3.3 La transplantation fécale.....	39

#### **PARTIE PRATIQUE**

1. Analyse des échantillons sanguins par ELISA sandwich Anticorps/Antigène .....	42
2. Détection du gène MSN par PCR .....	47
Conclusion & perspectives .....	51

Références bibliographiques.....	52
Annexes .....	60

# Liste des Abréviations

Abréviation	Signification complète
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AGCC	Acides Gras à Chaîne Courte
Treg	Lymphocytes T régulateurs
HDAC	Histone Deacetylase (Histone désacétylase)
LPS	Lipopolysaccharide
IL-10	Interleukine 10
DC	Cellules dendritiques (Dendritic Cells)
PRR	Récepteurs de Reconnaissance de Motifs (Pattern Recognition Receptors)
TLR	Toll-Like Receptors
NLR	NOD-Like Receptors
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
IgA	Immunoglobuline A
SJ	Jonctions Serrées (Tight Junctions)
pIgR	Récepteur des Immunoglobulines Polymériques
Th1	Lymphocytes T auxiliaires de type 1
Th17	Lymphocytes T auxiliaires de type 17
MII	Maladies Inflammatoires de l'Intestin
RCH	Rectocolite Hémorragique
MAI	Maladies Auto-Immunes
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
DT1	Diabète de Type 1
SEP	Sclérose en Plaques
SNC	Système Nerveux Central
DT2	Diabète de Type 2
NAFLD	Stéatose Hépatique Non Alcoolique (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction)
ARNr	ARN ribosomal
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FMC	Cytométrie en flux (Flow Cytometry)
FMT	Transplantation de Microbiote Fécalt (Fecal Microbiota Transplantation)

# Liste des Figures

Numéro de Figure	Légende	page
Figure 1	Répartition des principales familles microbiennes dans le tractus intestinal humain	2
Figure 2	Représentation schématique des différents phyla bactériens chez l'Homme et de leur abondance relative au niveau du côlon	5
Figure 3	Métabolites microbiens et modulation des réponses immunitaires intestinales : rôle des cellules dendritiques dans la tolérance immunitaire intestinale.	10
Figure 4	Rôle des cellules dendritiques dans la tolérance immunitaire intestinale.	12
Figure 5	Représentation schématique des Voies de signalisation intracellulaire induites par les récepteurs Toll-like.	14
Figure 6	Activation des récepteurs NOD1 et NOD2 et formation de l'inflammasome dans le cadre de l'immunité intestinale.	15
Figure 7	Épithélium intestinal de mammifère.	17
Figure 8	Facteurs contribuant au développement du « leaky gut » et sa relation avec les maladies auto-immunes.	18
Figure 9	Microbiote intestinal sain comparé à celui d'un patient atteint de dysbiose intestinale.	21
Figure 10	Interaction entre le microbiote intestinal et le système immunitaire dans la lamina propria.	23
Figure 11	Homéostasie immunitaire intestinale et inflammation.	26
Figure 12	Schéma du séquençage 16S.	32
Figure 13	Métagénomique shotgun.	33
Figure 14	Technique d'immuno-absorption enzymatique (ELISA) utilisée pour détecter un antigène dans un échantillon donné.	35
Figure 15	Applications de la cytométrie en flux.	36

Figure 16	Principaux modèles expérimentaux utilisés pour l'étude du microbiote intestinal et de la dysbiose	37
Figure 17	Procédure de transplantation fécale de microbiote intestinal	40
Figure 18	mise des échantillons en centrifugation	43
Figure 19	plaque avec puits et diluant échantillon ( DILSPE )	43
Figure 20	contrôle négatif et les contrôles positifs	44
Figure 21	incubation de la plaque et lavage	45
Figure 22	Distribution du conjugué n°1 et le conjugué n° 2 sur la plaque	45
Figure 23	Révélation du complexe immun par le substrat TMB	46
Figure 24	lecture par spectrophotométrie	46
Figure 25	Tampons MgCl <sub>2</sub> Taq , dNTP et amorces d'ADN	48
Figure 26	traitement des échantillons PCR dans la chambre à UV	48
Figure 27	Déroulement de la PCR	49
Figure 28	migration des échantillons et lecture des bandes	50



# Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Vitamines produites par le microbiote intestinal et leurs fonctions dans l'organisme	07

# **Introduction :**

## Introduction :

Le microbiote intestinal désigne une population complexe et dynamique de micro-organismes, héberge le tractus gastro-intestinal humain et exerce une influence marquée sur l'hôte au cours de l'homéostasie et de la maladie (Harris ;2024).

Dès la naissance les microbes colonisent l'intestin du nourrisson. Le microbiote intestinal suit un long cycle depuis son implantation jusqu'à sa maturation après des interactions avec des facteurs environnementaux, nutritionnels et médicamenteux (antibiothérapie) pourront influencer sur sa composition (Comtet-Marre *et al.*, 2024).

Le microbiote de l'intestin influence de nombreux aspects de la santé en assurant des fonctions métaboliques et immunitaires dans un état sain. Un déséquilibre de cette flore microbienne peut engendrer des effets délétères comme des inductions de l'inflammation, le développement des infections et une contribution potentielle des troubles métaboliques (Ferrad, 2025).

Au cours des dernières années, l'intérêt pour le microbiote intestinal a augmenté avec une révolution méthodologique dans l'étude du microbiote. Les méthodes moléculaires plus sensibles ont remplacé les techniques classiques basées sur la culture des cellules grâce à l'avancement du séquençage de haut débit (Harris ;2024). Mais malgré l'importance croissante des technologies d'analyse approfondie du microbiote intestinal et la détection des états de dysbiose il est regrettable de constater que ces outils ne sont actuellement pas disponibles dans notre région..

À cause de l'influence considérable du microbiote sur la santé humaine, plusieurs approches thérapeutiques ont émergé comme l'utilisation d'antibiotiques à spectre étroit, de nouveaux probiotiques ainsi que des méthodes plus radicales telles que la transplantation fécale (Ullah *et al.*, 2025) .

Par ce travail, nous allons tenter d'explorer l'histologie et la physiologie du microbiote intestinal, de discuter l'état de son dérèglement nommée la dysbiose à travers ses implications pathologiques et cliniques, et enfin de montrer l'intérêt d'une investigation immunologique dans la compréhension et le diagnostic de tous désordres touchant la flore intestinale, tout en s'appuyant sur des données expérimentales et des avancées récentes en immunologie et en microbiologie.

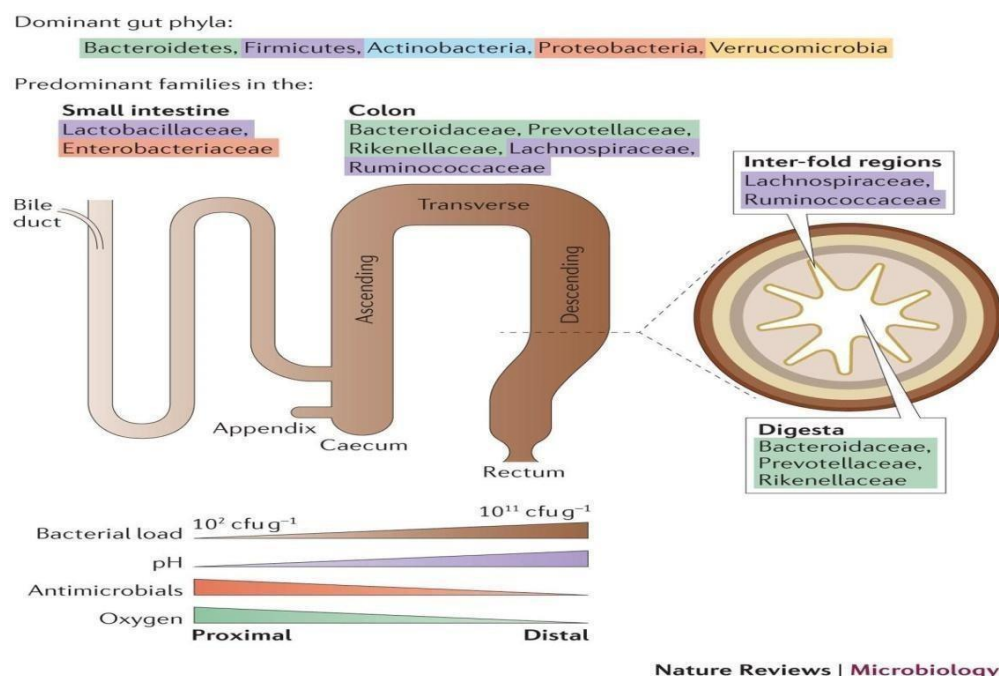
# **CHAPITRE 01 : Description du microbiote intestinal**

## 1/Généralité sur le tractus digestif :

L'appareil digestif se compose du tractus gastro-intestinal - également appelé tube digestif, du foie, du pancréas et de la vésicule biliaire. Le tractus gastro-intestinal est une série d'organes réunis sur le long tube tortueux allant de la bouche à l'anus. Les organes creux qui composent le tube digestif sont la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin et l'anus. Le foie, le pancréas et la vésicule biliaire sont les organes solides du système digestif (Ortega & Torres, 2023).

L'intestin grêle se compose de trois parties. La première partie s'appelle le duodénum. Le jéjunum se trouve au milieu et l'iléon à la fin (Ortega & Torres, 2023). Le gros intestin comprend l'appendice, le cæcum, le côlon et le rectum. L'appendice est une poche en forme de doigt attachée au cæcum. Le cæcum est la première partie du gros intestin. Le côlon est la partie suivante. Le rectum est la fin du gros intestin (Azzouz & Sharma, 2023).

Les bactéries présentes dans le tube digestif, appelées flore intestinale ou microbiome, contribuent à une série de processus physiologique essentiels à la santé de l'hôte, notamment l'homéostasie énergétique, le métabolisme, la santé de l'épithélium intestinal, l'activité immunologique et le développement neurocomportemental (Barko et al., 2018).



**Figure 1:** Répartition des principales familles microbiennes dans le tractus intestinal humain (Donaldson *et al.*, 2016)

---

## **2 / Le microbiote intestinal :**

### **2.1 / Définition :**

Le microbiote intestinal est la communauté microbienne la plus significative et complexe du corps humain. Sa répartition est inégale, les concentrations les plus élevées étant présentes dans le côlon. Composé de  $10^{14}$  bactéries et d'autres micro-organismes comme des virus, des champignons et des archées cet ensemble est reconnu comme un véritable organe caché du corps humain par rapport à ses diverses fonctions dans la physiologie intestinale et le maintien de la santé globale de l'hôte (Montalto *et al.*, 2009 ; Landman & Quévrain, 2016).

### **2.2 / Développement et composition du microbiote intestinal :**

#### **2.2.1 / Développement :**

Le microbiote intestinal suit un long cycle depuis son implantation jusqu'à sa maturation au bout de l'âge de 2 ans en moyenne. Au-delà, des facteurs environnementaux, nutritionnels et médicamenteux (antibiothérapie) pourront influencer sur sa composition (Clemente *et al.*, 2012).

Dans le fœtus le tube digestif est considéré stérile, sa colonisation commence dès la naissance et selon le mode d'accouchement les types des communautés bactériennes varient :

- d'origine vaginale lors d'un accouchement par voie naturelle (*Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia*) (Clemente *et al.*, 2012).
- plutôt d'origine cutanée lors d'un accouchement par césarienne (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* spp.) (Dominguez-Bello *et al.*, 2010).

Le mode d'alimentation est un facteur important affecte le développement du microbiote intestinal de l'enfant. Le lait maternel constitue une source bactérienne pour l'intestin du nourrisson. Les deux principales bactéries présentes dans le lait maternel sont les streptocoques et les staphylocoques (Liu, 2016).

Après la naissance, avec le temps et l'exposition de l'hôte à différents microbes, le microbiote intestinal passe rapidement d'une moins grande diversité avec une dominance relative des phyla Proteobacteria et Actinobacteria à une plus grande diversité avec une dominance des Firmicutes et Bacteroidetes (Liu, 2016).

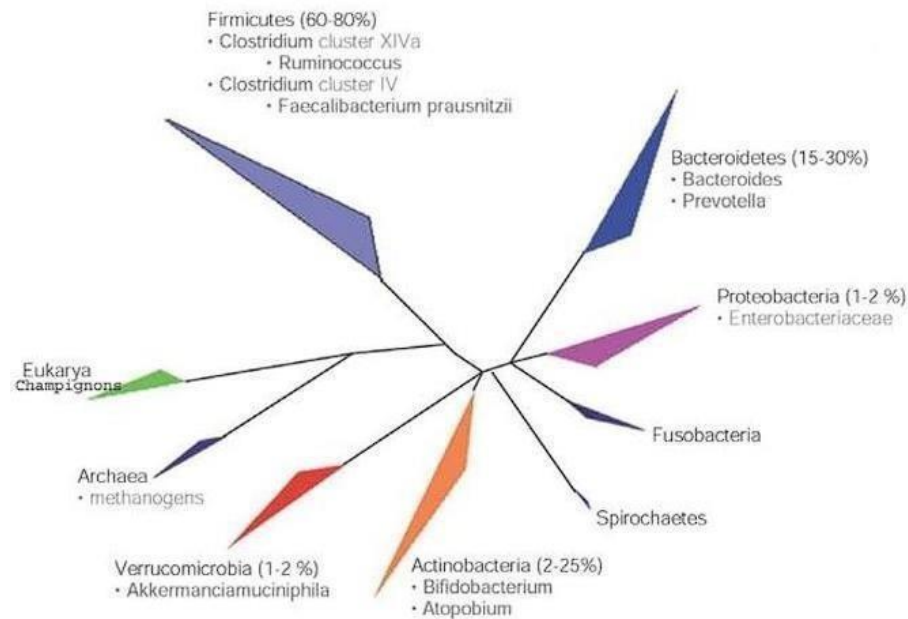
A l'âge de 3 ans, la diversité et la composition du microbiote intestinal ressemblent à celles de l'homme adulte et deviennent relativement stables (Faith *et al.*, 2013).

La disponibilité des microbes détermine les microbes ont la possibilité de coloniser l'intestin. Les effets de l'environnement comme l'utilisation d'antibiotiques, la situation géographique, l'alimentation et le mode de vie, sur le microbiote semblent être cumulatifs d'une génération à l'autre (Rodríguez *et al.*, 2015).

### 2.2.2/Composition :

Le microbiote intestinal est principalement composé de bactéries qui appartiennent à divers phylums tels que les Firmicutes, les Bacteroidetes, les Actinobacteria et les Proteobacteria. (Hannif *et al.*, 2025).

- **Firmicutes** : Ce groupe englobe des bactéries telles que *Lactobacillus* et *Clostridium*, qui participent de manière significative à la fermentation des fibres et à la génération d'acides gras à chaîne courte (AGCC). (Yang *et al.*, 2025)
- **Bacteroidetes** : Ces micro-organismes, représentés par *Bacteroides* et *Prevotella*, jouent un rôle dans la décomposition des polysaccharides complexes et l'ajustement des réactions immunitaires. (Yang *et al.*, 2025).
- **Actinobacteria** : Ce groupe comprend notamment *Bifidobacterium*, des bactéries reconnues pour leurs effets bénéfiques sur la santé intestinale, notamment par leur capacité à renforcer la barrière intestinale (Hannif *et al.*, 2025).
- **Proteobacteria** : Bien que minoritaires dans un microbiote sain, certaines espèces comme *Escherichia coli* et *Helicobacter* peuvent devenir pathogènes en cas de déséquilibre microbien (Cheng, 2013).



**Figure 2:** Représentation schématique des différents phyla bactériens chez l'Homme et de leur abondance relative au niveau du côlon (Cherbuy C, 2013).

### 2.3 / Facteurs influençant la composition du microbiote :

Le microbiote intestinal s'établit tôt dans la vie, mais peut ensuite être modifié par divers facteurs qui affectent son développement et sa diversité. (Hasan & Yang, 2019). On note particulièrement parmi ces facteurs :

- **Les facteurs génétiques** : Le patrimoine génétique de l'organisme hôte a une incidence sur la colonisation par les micro-organismes et la faculté à accueillir des espèces bactériennes particulières. Certaines prédispositions génétiques peuvent réguler la composition du microbiote et avoir un impact sur les interactions avec le système immunitaire (Rimbaud, 2004).
- **L'alimentation** : L'alimentation joue un rôle crucial dans la régulation du microbiote. Un régime alimentaire abondant en fibres stimule le développement de bactéries bénéfiques comme *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, alors qu'un régime occidental riche en graisses et en sucres raffinés peut nuire à la diversité microbienne et induire un état de dysbiose (Comtet-Marre *et al.*, 2024)
- **Le mode de naissance et l'allaitement** : Le mode d'accouchement a une influence sur la colonisation initiale du microbiote intestinal. Une naissance vaginale favorise le



passage précoce des bactéries maternelles, tandis qu'une césarienne entrave cette transmission, ce qui contribue à un microbiote moins diversifié. L'allaitement maternel a aussi un rôle primordial en encourageant l'élaboration d'un microbiote riche en *Bifidobacterium*, grâce à la présence d'oligosaccharides spécifiques dans le lait maternel (Cherbuy, 2013).

- **L'usage de médicaments** L'exposition aux antibiotiques, aux médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou aux inhibiteurs de la pompe à protons peut entraîner des changements significatifs et persistants dans le microbiote intestinal. La perturbation de cet équilibre pourrait conduire à la disparition de certaines bactéries saines et encourager la multiplication d'espèces opportunistes liées à des problèmes inflammatoires et métaboliques (Cheng, 2013).

Ces facteurs interagissent de manière dynamique, façonnant la composition microbienne et influençant ses fonctions métaboliques et immunitaires. Comprendre leur impact permet d'explorer des approches thérapeutiques visant à restaurer ou maintenir un microbiote équilibré pour prévenir certaines pathologies.

### **3/Fonctions du microbiote intestinal :**

L'interaction entre le microbiote intestinal et les systèmes ; digestif, métabolique et immunitaire est cruciale pour l'efficacité optimale de l'organisme. Il joue un rôle dans la digestion en fragmentant certains nutriments que l'organisme ne parvient pas à assimiler seul, tout en contribuant au métabolisme énergétique et à la fabrication de vitamines essentielles (Gérard & Bernalier-Donadille, 2007 ; Quévrain & Seksik, 2012). Par ailleurs, il procure une protection contre les agents infectieux en maintenant une barrière microbienne compétitive et en stimulant les dispositifs de défense immunitaire (Hooper *et al.*, 2001 ). En dialoguant en permanence avec le système immunitaire, il est primordial dans la gestion des réponses inflammatoires et la prévention des désordres immunitaires (Corthier & Doré, 2010).

#### **3.1/ Rôle dans la digestion et le métabolisme :**

Une des missions fondamentales du microbiote intestinal est de décomposer les composés alimentaires complexes, que les enzymes humaines ne parviennent pas à digérer. Cette activité métabolique conduit à la génération de métabolites utiles, en particulier les AGCC, qui ont une importance majeure dans la physiologie intestinale et systémique (Quévrain & Seksik, 2012 ; Dolié, 2018). (Flint *et al.*, 2012).

- **Dégradation des fibres alimentaires** Les fibres alimentaires sont fermentées par les bactéries intestinales pour générer des AGCC comme l'acétate, le propionate et le butyrate. Ces métabolites alimentent les cellules épithéliales du côlon, consolident la solidité de la barrière intestinale et contribuent à l'ajustement des réactions immunitaires (Quévrain & Seksik, 2012 ; Landman & Quévrain, 2016).
- **Synthèse de vitamines** : Des bactéries intestinales spécifiques, notamment le *Bacteroides* et le *Bifidobacterium*, participent à la synthèse de vitamines cruciales, y compris la vitamine K qui joue un rôle clé dans la coagulation du sang, ainsi que certaines vitamines du complexe B comme la B12 qui est vitale pour le métabolisme cellulaire (Laaboub, 2019).
- **Régulation du métabolisme énergétique** : Le microbiote intestinal est essentiel pour l'assimilation des nutriments et la gestion du métabolisme des lipides et glucides, ce qui a un impact sur l'accumulation de graisses et la réactivité à l'insuline. Une altération de sa composition peut être liée à des dysfonctionnements métaboliques tels que l'obésité et le diabète (Turnbaugh *et al.*, 2006 ; Qin *et al.*, 2012).

**Tableau 01** : Vitamines produites par le microbiote intestinal et leurs fonctions dans l'organisme (d'après Fayssinhes, 2017)

Vitamine	implication
K	coagulation sanguine, métabolisme des os.
B12	synthèse de neuromédiateurs, synthèse de l'ADN, synthèse des acides gras
B9	synthèse de l'ADN, synthèse de certains acides aminés
B6	métabolisme des acides aminés, réaction d'hydrolyse du glycogène en glucose
B8	métabolisme des acides gras, des glucides et des acides aminés, ainsi qu'à la biosynthèse des vitamines B9 et B12.
B2	transformation des aliments simples (glucides, lipides et protéines) en énergie, métabolisme de réparation des muscles

---

### 3.2/Modulation du système immunitaire :

Le microbiote intestinal est très important dans le développement et la force des défenses immunitaires. Grâce à une interaction continue avec les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale, il maintient un équilibre entre tolérance et réponse inflammatoire, ce qui est la prévention de la maladie pro-inflammation (Belkaid & Hand, 2014).

- **Interaction avec les cellules immunitaires** : Les bactéries commensales aident à la différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui eux sont indispensables pour prévenir les réactions auto-immunes et inflammatoires (Harris, 2024).
- **Production d'IgA sécrétoires** : Les immunoglobulines de ce type ont un rôle très important dans le système de défense immunitaire de l'organisme car ils empêchent la colonisation des agents pathogènes et protègent la barrière immunologique de la lumière intestinale (Sterlin et al., 2024).
- **Régulation de l'inflammation** : l'interaction du microbiote intestinale avec le système immunitaire inné et adaptatif via les métabolites comme les AGCC (butyrate) renforce la barrière intestinale et limite la perméabilité et empêche la translocation bactérienne afin de réduire l'activation intense des voies inflammatoires. En cas de dysbiose, le passage de bactéries et de métabolites active les réponses immunitaires impliquant cytokines et lymphocytes. (Yoo et al., 2020).

# **CHAPITRE 02 :Interactions entre microbiote et système immunitaire**

**1/ Mécanismes de tolérance immunitaire :**

Le microbiote intestinal est essentiel pour moduler la réponse immunitaire ainsi que pour établir la tolérance immunitaire. Cette immun régulation aide à prévenir l'inflammation excessive tout en fournissant une défense efficace contre l'infection (Liu *et al.*, 2024).

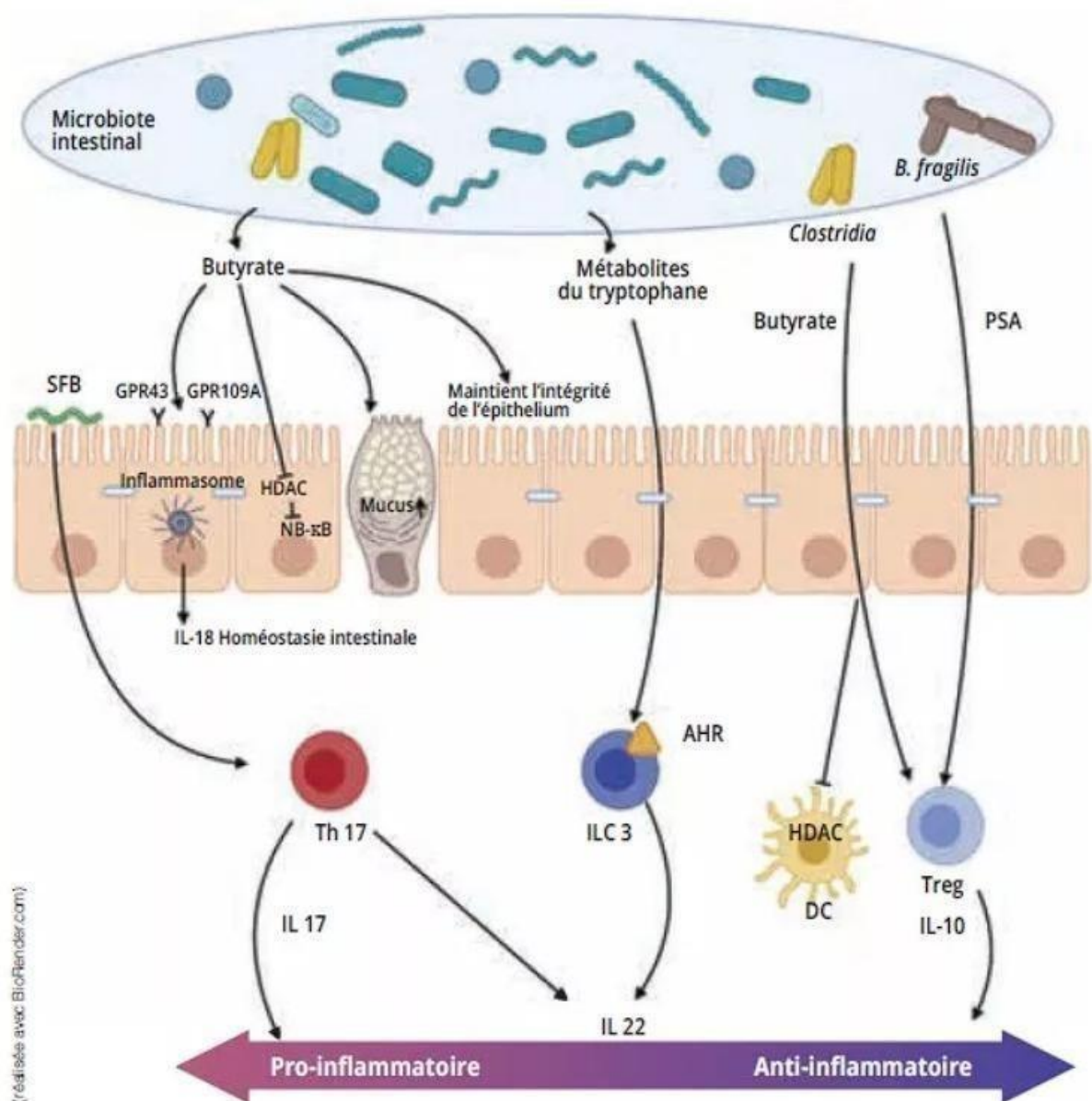
**1.2/Rôle des lymphocytes T régulateurs (Treg) :**

Concernant la tolérance des cellules immunitaires envers les tissus environnants et les microbes, cet aspect est géré par les cellules Treg. Leur maturation est influencée par les effets des bactéries commensales, en particulier celles qui dégradent les glucides de manière anaérobie pour former des acides gras à chaîne courte tels que le butyrate et le propionate (Bhutta *et al.*, 2024). Ces métabolites sont cruciaux pour le contrôle de l'expression du facteur de transcription Foxp3 qui doit être exprimé pour que la différenciation en cellules Treg puisse se produire.

La présence de butyrate a été associée à une réduction des lésions intestinales. Ce métabolite exerce son effet en inhibant l'histone désacétylase (HDAC), ce qui favorise l'activation de Foxp3 et la différenciation des Treg (Reynolds & Bettini, 2023). De plus, il contribue à la régénération de l'intégrité de l'épithélium intestinal et au maintien de l'homéostasie immunitaire locale (Reynolds & Bettini, 2023).

Un certain nombre de polysaccharides bactériens, et notamment le polysaccharide A (PSA) de *Bacteroides fragilis*, peuvent aussi induire par activation des cellules dendritiques, la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, importante pour la tolérance immunitaire (Reynolds & Bettini, 2023). Ces effets de modulations des réponses immunitaires visent à contrôler les réactions inflammatoires excessives et à préserver l'équilibre immunitaire.

Un rôle essentiel est donné aux Treg dans la modulation de la réponse inflammatoire et dans la prévention des maladies auto-immunes intestinales par la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que TGF- $\beta$  et IL-10 (Shim *et al.*, 2023). Cette régulation participe à garantir une défense efficace contre les agents infectieux tout en conservant une tolérance vis-à-vis du microbiote commensal. La figure 3 illustre ces interactions en mettant en évidence l'impact des métabolites microbiens sur les cellules immunitaires intestinales, notamment les Treg, via l'inhibition de l'HDAC et la production d'IL-10.



**Figure 3 :** Métabolites microbiens et modulation des réponses immunitaires intestinales.  
(Biocodex Microbiota Institute)

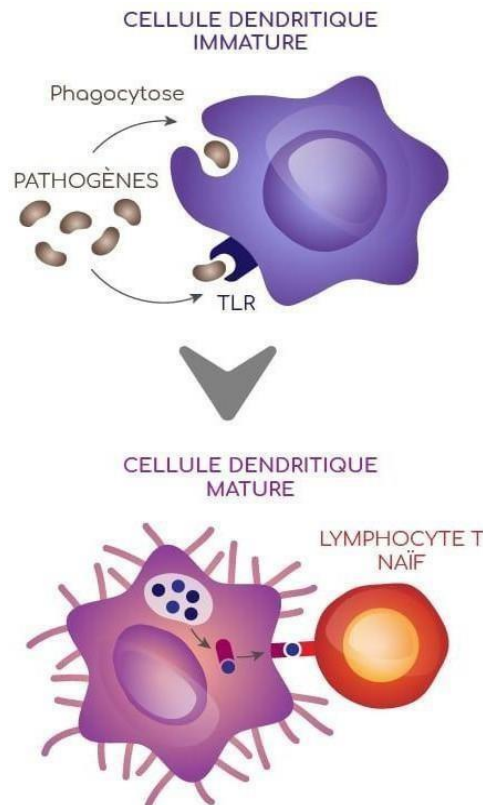
### 1.3/Rôle des cellules dendritiques dans la tolérance immunitaire :

Les lymphocytes dendritiques (DC), qui ont un rôle essentiel dans la tolérance immunitaire intestinale, sont responsables de la présentation d'antigènes microbiens aux cellules effectrices afin d'induire une réponse tolérante ou inflammatoire, selon le contexte intestinal (Belkaid & Hand, 2014).

À la faveur de la tolérance, les dendrocytes intestinales font la capture des antigènes microbiens, migrent vers les ganglions mésentériques et interagissent avec les lymphocytes T naïfs dans un contexte de sécrétion de cytokines au rôle immunomodulateur (IL-10, TGF- $\beta$ ), favorisant le recrutement des lymphocytes Treg aux dépens des lymphocytes T effecteurs pro-inflammatoires (Wang *et al.*, 2023).

Il est également intéressant de noter que certains métabolites microbiens sont en mesure de moduler la fonction des CD. L'acide rétinoïque dérivé de la vitamine A, par exemple, renforce le rôle des CD dans son action anti-inflammatoire (Wang *et al.*, 2023). Le polysaccharide A (*Bacteroides fragilis*) est impliqué dans la stimulation de l'IL-10 et favorise ainsi la tolérance immune, et limite les réponses inflammatoires démesurées (Round & Mazmanian, 2010).

Ce mécanisme permet d'établir un équilibre entre la tolérance immunitaire et la défense contre les pathogènes, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale.



**Figure 4:** Rôle des cellules dendritiques dans la tolérance immunitaire intestinale.( Nutrixeal Info, "Cellules dendritiques : rôles et caractéristiques")

## 2 / Signalisation moléculaire :

Notre système immunitaire interagit avec notre microbiote intestinal par l'intermédiaire de récepteurs spécialisés capables de reconnaître des motifs moléculaires microbiens spécifiques, les PRR ou Pattern Recognition Receptors, et, de façon plus restrictive, les récepteurs de type Toll (TLR) et les récepteurs de type NOD (NLR), qui sont exprimés aussi bien par les cellules immunitaires que par les cellules épithéliales intestinales, ces récepteurs jouent un rôle central dans l'acquisition de signaux microbiens et la modulation des réponses immunitaires (Harris, 2024)..

### 2.1/ Rôle des Toll-like receptors (TLR) :

Le microbiote intestinal interagit avec le système immunitaire grâce à des récepteurs spécialisés, répondant à des motifs moléculaires microbiens caractérisés ; ces récepteurs, appelés PRR, sont exprimés à la fois par les cellules immunitaires et par les cellules épithéliales intestinales. À destination de la cellule immunitaire, on trouve notamment parmi

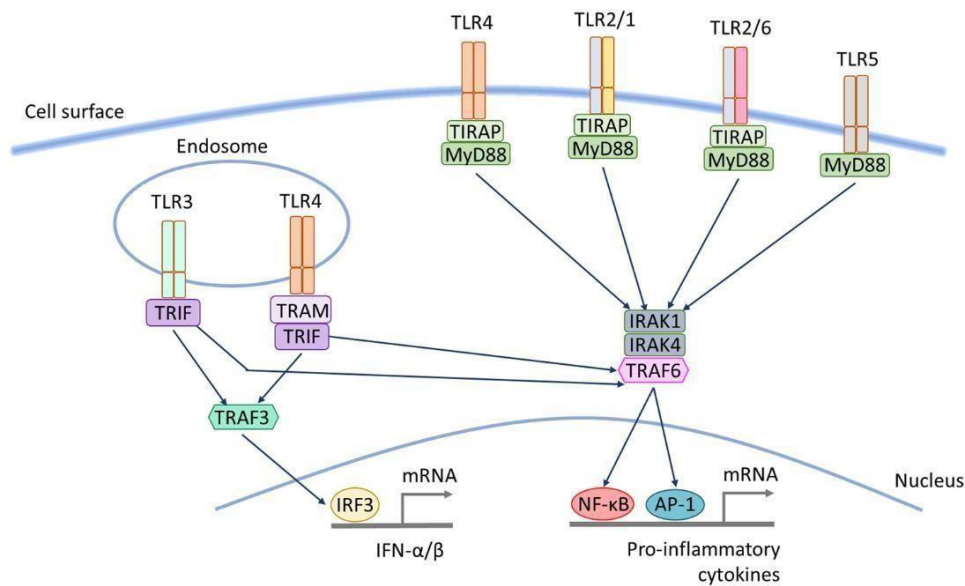


ces récepteurs les TLR et les récepteurs NLR, qui participent à la perception des signaux microbiens et à la modification des réponses immunitaires (Akira et al., 2006 ; Kawai & Akira, 2010).

Chaque TLR est spécialisé dans la détection de motifs microbiens distincts :

- **TLR2** permet d'identifier les lipoprotéines bactériennes et les peptidoglycanes, favorisant ainsi le constat de la présence de bactéries Gram-positives (*Chen et al., 2024*).
- **TLR4** est le principal récepteur du lipopolysaccharide (LPS), qui est un élément propre aux bactéries à Gram négatif. Son activation va déclencher une cascade inflammatoire via l'activation de la voie NF- $\kappa$ B qui, à son tour, active des gènes responsables de la production de cytokines pro-inflammatoires (*Chen et al., 2024*).
- **TLR5** détecte, quant à lui, la flagelline, protéine structurale propre aux bactéries à mobilité, et joue un rôle important dans la surveillance des infections intestinales (*Chen et al., 2024*)

La stimulation des TLR induit une réponse immunitaire précoce très rapide, via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens – comme l'IL-6, le TNF- $\alpha$  - qui freine le développement bactérien (*Chen et al., 2024*). Cependant, il importe que cette activation soit rigoureusement contrôlée afin d'éviter l'établissement d'une réponse inflammatoire trop intense, qui dans le cas d'un déséquilibre de l'activation des TLR pourrait contribuer au développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique) (*Rakoff-Nahoum et al., 2004*).



**Figure 5 :** Représentation schématique des Voies de signalisation intracellulaire induites par les récepteurs Toll-like (McKiel et *al.*, 2020).

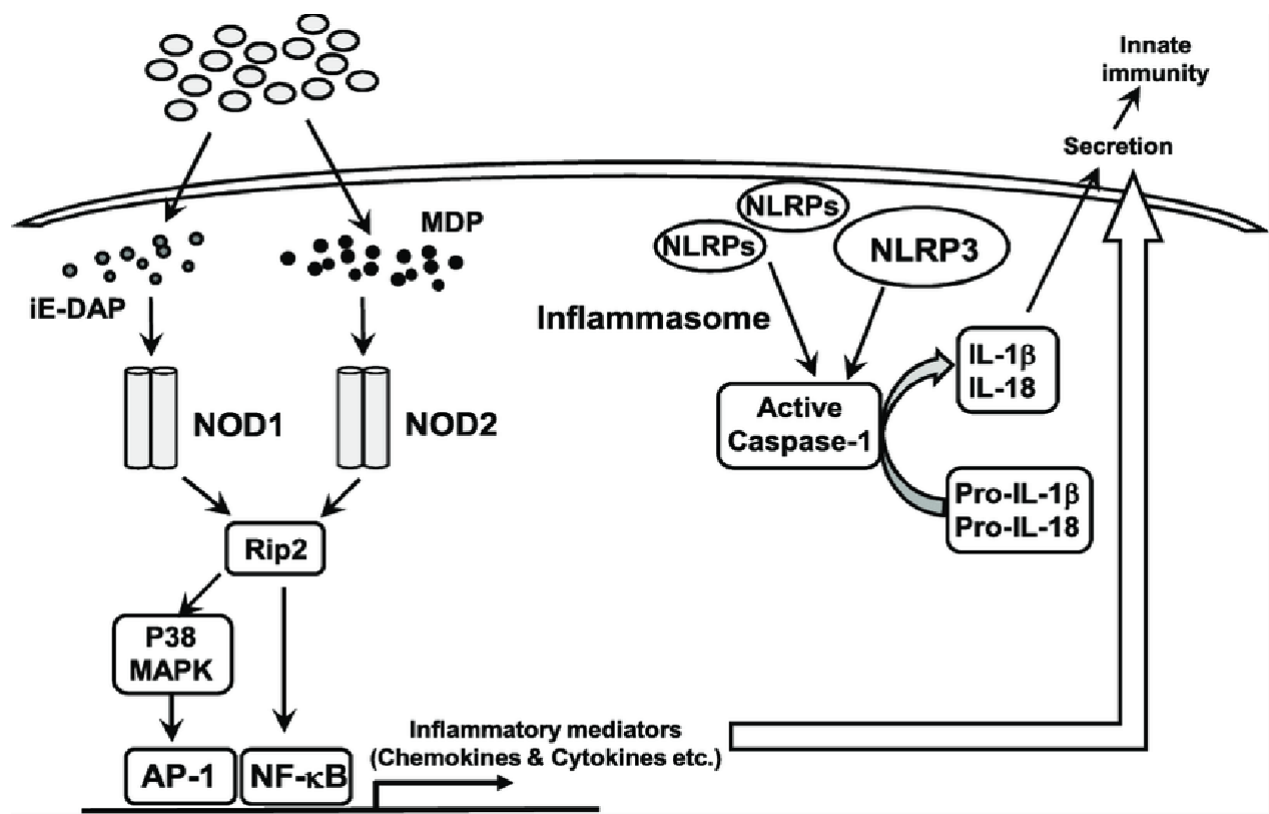
## 2.2/ Rôle des NOD-like receptors (NLR) :

Les récepteurs de type NOD-like (NLR) jouent un rôle essentiel dans la surveillance intracellulaire des infections en détectant les composants bactériens qui pénètrent dans le cytoplasme des cellules intestinales. Contrairement aux TLR, qui sont principalement situés à la surface cellulaire ou dans les endosomes, les NLR assurent une ligne de défense complémentaire contre les pathogènes (Almeida-da-Silva, *et al.* 2023).

- **Détection des pathogènes :** NOD1 et NOD2 reconnaissent des fragments de peptidoglycane issus de bactéries, déclenchant l'activation des voies NF-κB et MAPK. Cette activation entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires, renforçant ainsi la réponse immunitaire (Almeida-da-Silva, *et al.* 2023).
- **Régulation de l'homéostasie intestinale :** NOD2 joue un rôle clé dans le maintien de l'équilibre immunitaire de l'intestin. Des mutations du gène NOD2 ont été associées à une susceptibilité accrue à la maladie de Crohn, soulignant .

son importance dans la régulation de l'inflammation intestinale (Almeida-da-Silva, *et al.* 2023).

- **Formation des inflammasomes** : Certains NLR participent à l'assemblage des inflammasomes, des complexes protéiques qui activent la caspase-1 et favorisent la maturation de l'IL-1 $\beta$ , une cytokine essentielle à la défense immunitaire et aux processus inflammatoires intestinaux. (Almeida-da-Silva, *et al.* 2023).



**Figure 6 :** Activation des récepteurs NOD1 et NOD2 et formation de l'inflammasome dans l'immunité intestinale. ResearchGate. (2018). Functions of NOD-like receptors (NLRs).

### 3 / Barrière intestinale et immunité muqueuse :

L'intestin est une interface clé entre l'organisme et l'environnement extérieur. Il abrite un microbiote dense tout en assurant une barrière protectrice contre les agents pathogènes. Cette barrière repose sur un épithélium intestinal spécialisé, des jonctions serrées entre les cellules et un système immunitaire muqueux performant, notamment via la production

d'immunoglobulines A sécrétoires (IgA). L'équilibre entre ces éléments est essentiel pour prévenir l'inflammation excessive et les infections intestinales (Heyman, M. 2010).

### **3.1/Rôle des cellules épithéliales et des jonctions serrées :**

L'intestin est un organe unique habité par un nombre considérable de micro-organismes. Les cellules épithéliales intestinales jouent un rôle important dans le maintien de la relation symbiotique entre le microbiote intestinal et l'hôte en construisant des barrières muqueuses, en sécrétant divers médiateurs immunologiques et en délivrant des antigènes bactériens (Okumura & Takeda, 2024). .

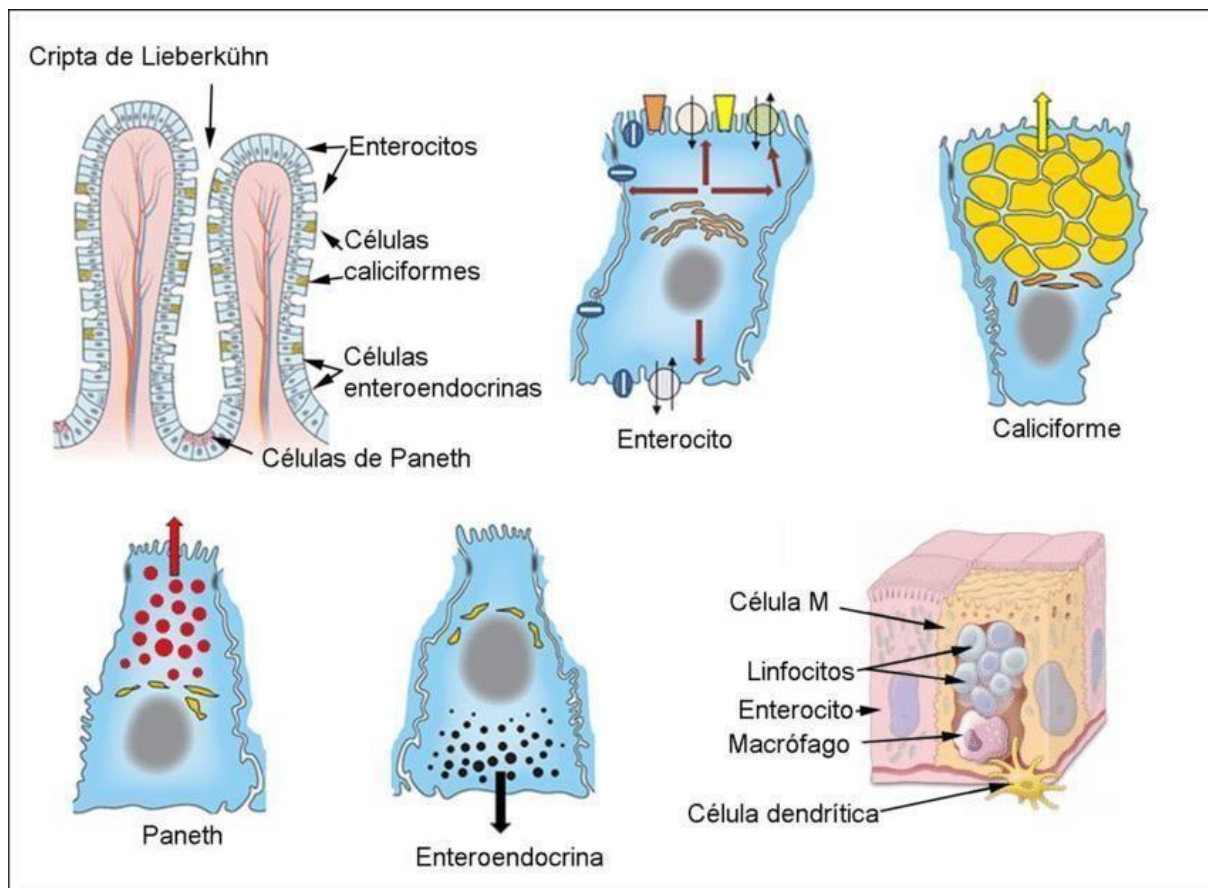
Les entérocytes, qui sont les plus abondantes de l'épithélium intestinal, avec un rôle essentiel dans l'assimilation des nutriments, et la fonction protectrice en produisant des peptides antimicrobiens empêchent la prolifération des bactéries dans l'intestin (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013).

La fonction des cellules caliciformes consiste à produire du mucus qui constitue une couche protectrice à la surface de l'épithélium intestinal empêche les bactéries de se fixer sur les cellules intestinales, ce qui protège l'intestin de l'invasion *microbienne* ( Zouiten-Mekki *et al.*, 2013).

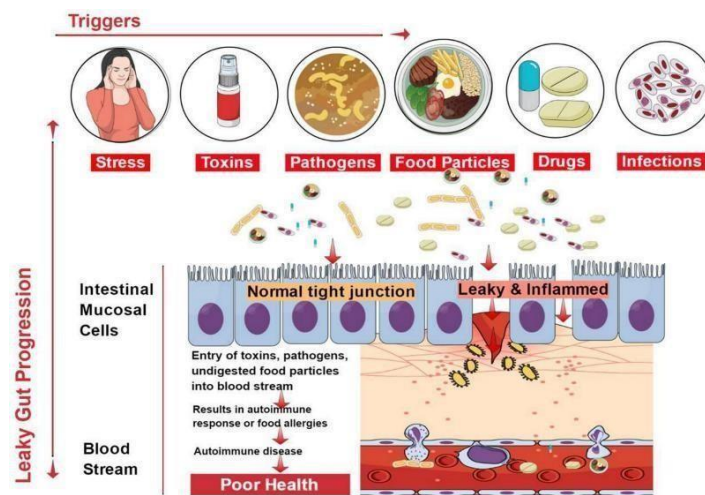
Les cellules de Paneth produisent des peptides antimicrobiens comme les défensines, situées au fond des cryptes intestinales. Selon Zouiten-Mekki *et al.*, (2013),

L'intégrité de la barrière intestinale est maintenue par un complexe jonctionnel intercellulaire composé de jonctions serrées (SJ), de jonctions d'ancrage (desmosomes et jonctions *adherens*, liés au cytosquelette d'actine et aux filaments intermédiaires) et des jonctions communicantes (*gapjunctions*) ( Assimakopoulos *et al.* , 2011 ) . Il a été démontré que la perméabilité membranaire est accrue chez les patients atteints de MICI. En effet, une altération de la structure des jonctions serrées, ainsi qu'une réduction de leur nombre chez les patients atteints de MICI, ont été décrites. Une altération de la perméabilité intestinale a également été décrite chez des parents au premier degré de patients atteints de la maladie de Crohn, ainsi que chez des conjoints, ce qui suggère le rôle de facteurs environnementaux dans cette pathologie ( Breslin *et al.* , 2001 : Thjodleifsson *et al.* , 2003).

Les jonctions intercellulaires ne sont pas des éléments statiques, car leur structure et leur nombre peuvent être modulés par de nombreux facteurs ; tels que les cytokines, les agents pathogènes, les toxines, etc



**Figure 7 :** Épithélium intestinal de mammifère. (Ross et Pawlina ,2016.)



**Figure 8 :** Facteurs contribuant au développement de l'hyperperméabilité intestinale et son lien avec les maladies auto-immunes. (Paray *et al.*, 2020)

### 3.2/Production d'IgA sécrétoires :

L'immunoglobuline A (IgA) est l'anticorps le plus abondant dans la muqueuse et joue un rôle important dans la protection intestinale. Contrairement aux autres immunoglobulines, les IgA sécrétoires (sIgA) fonctionnent principalement en neutralisant les micro-organismes et en modulant la composition du microbiote sans provoquer d'inflammation excessive (Pabst, 2012) .

Sa production commence dans la lamina propria, où les cellules B naïves subissent une commutation d'isotype et se différencient en plasmocytes sécrétant des IgA sous l'influence du TGF- $\beta$ , de l'IL-6 et de l'IL-10 (Carreto-Binaghi, Szein, & Booth, 2024). Ces plasmocytes produisent une forme dimère d'IgA associée à la chaîne J, facilitant son transport à travers l'épithélium intestinal. Ce transport est assuré par le récepteur polymère des Ig (pIgR), qui capture les IgA dimères et les transporte à travers les cellules épithéliales par transcytose. Une fois libérées dans la lumière intestinale, les IgA sécrétoires conservent une partie des pIgR appelées composants sécrétoires, les protégeant ainsi de la dégradation enzymatique (Carreto-Binaghi, Szein, & Booth, 2024).

Les IgA sécrétoires jouent plusieurs rôles importants dans l'homéostasie immunitaire intestinale. Il empêche l'adhésion des pathogènes aux cellules épithéliales et favorise l'élimination des pathogènes du mucus intestinal (Carreto-Binaghi, Szein, & Booth, 2024) ,Il module également la composition du microbiote en recouvrant certaines bactéries commensales, limitant ainsi leur interaction avec l'épithélium et évitant des réponses inflammatoires excessives (Fagarasan *et al.*, 2010). En maintenant l'intégrité de la barrière

intestinale et en réduisant l'invasion d'antigènes microbiens, les IgA préviennent la suractivation du système immunitaire et le développement de maladies inflammatoires chroniques (Slack *et al.*, 2020).

Un déficit en IgA peut être associé à une susceptibilité accrue aux infections intestinales et aux maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Palm *et al.*, 2014). De plus, certaines études suggèrent que des altérations de la production d'IgA pourraient être associées à des maladies auto-immunes, telles que la polyarthrite rhumatoïde et le diabète de type 1 (Kawamoto *et al.*, 2012).

En bref, les IgA sécrétoires sont un élément clé de l'immunité intestinale, exerçant des effets protecteurs et régulateurs sur le microbiote. Son bon fonctionnement est essentiel au maintien de l'homéostasie et à la prévention des maladies inflammatoires et auto-immunes.

# **CHAPITRE 03 : Dysbiose intestinale et maladies auto- immunes**



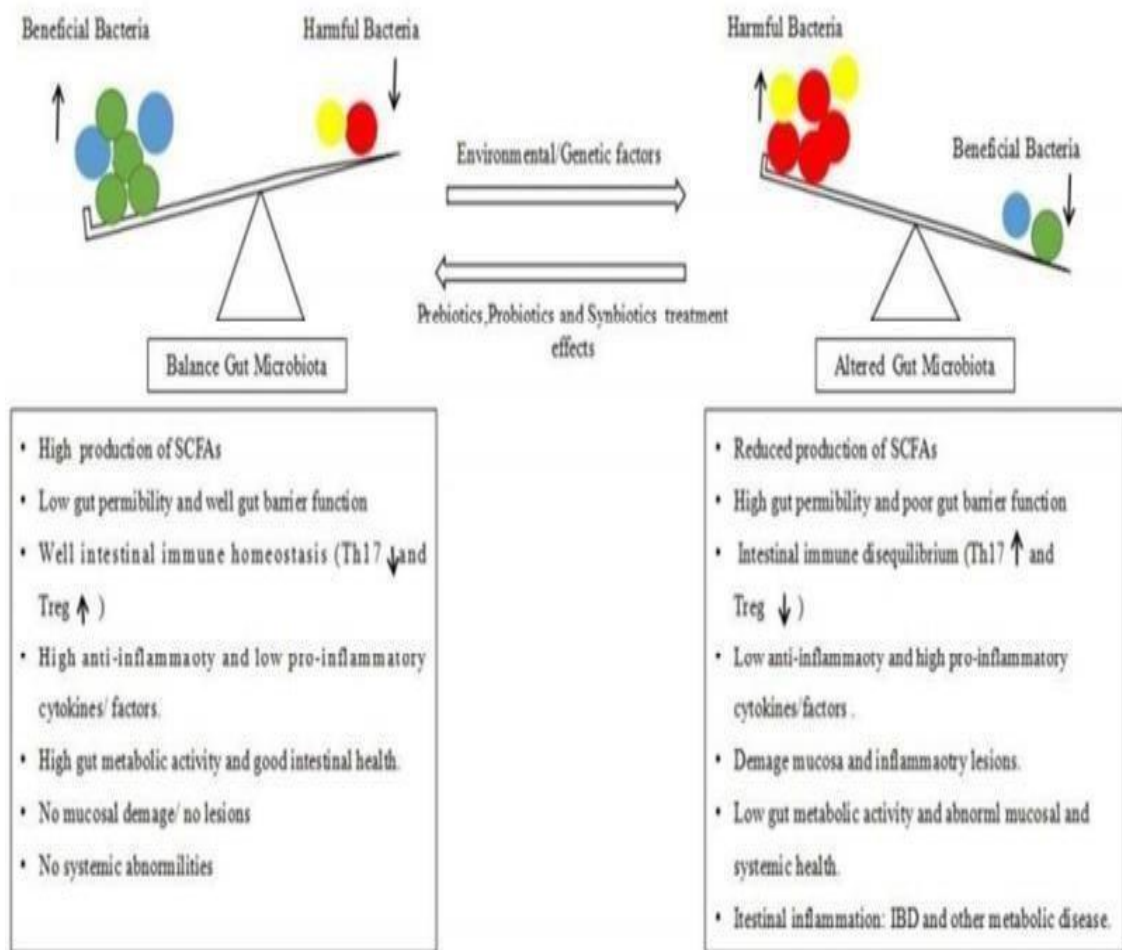
**1/Définition :**

Le microbiote intestinal est essentiel pour préserver l'homéostasie de l'organisme en participant à la digestion, au métabolisme et à la régulation du système immunitaire. Sous des conditions normales, un équilibre dynamique est conservé entre les diverses espèces microbiennes présentes dans l'intestin, favorisant une interaction fluide avec l'hôte (Degruttola et al., 2016). Toutefois, lorsque cet équilibre est dérangé, une condition anormale nommée dysbiose se manifeste.

La dysbiose intestinale est définie comme une modification qualitative et quantitative du microbiote, marquée par diverses altérations (Doré & Corthier, 2010).:

- Une diminution de la diversité microbienne : baisse du nombre d'espèces bactériennes avantageuses.
- Une altération dans la composition bactérienne : accroissement des bactéries pathogènes au détriment des espèces commensales défensives (Doré & Corthier, 2010).
- Un effet sur la barrière intestinale et la réaction immunitaire : une dysbiose peut mettre en péril l'intégrité de l'épithélium intestinal, ce qui peut engendrer une augmentation de la perméabilité et une stimulation excessive du système immunitaire inné et adaptatif.

L'affaiblissement de cette barrière intestinale facilite le passage de bactéries et de leurs produits métaboliques dans la circulation sanguine, ce qui peut induire une inflammation systémique et jouer un rôle dans le développement de maladies auto-immunes et inflammatoires (Degruttola et al., 2016).



**Figure 9 :** le microbiote intestinal sain et du patient atteint d'une dysbiose intestinale (Khan et al., 2019)

## **2 / Mécanismes physiopathologiques de la dysbiose intestinale :**

La dysbiose intestinale dérègle la barrière intestinale, le système de défense et le métabolisme, ce qui induit l'inflammation et les troubles auto-immuns (Belkaid & Hand, 2014). En outre, certaines maladies montrent des empreintes microbiennes distinctives, mettant en évidence l'importance cruciale du microbiote dans leur physiopathologie (De Vos & De Vos, 2012). Ce changement amplifie la perméabilité de l'intestin, rendant plus aisé l'introduction de molécules pro-inflammatoires dans la circulation sanguine .

### **2.1/ Altération de la barrière intestinale et inflammation :**

L'épithélium intestinal fait office de barrière physique et immunitaire primordiale contre les agents infectieux(Coutry *et al.*, 2024). Dans des circonstances normales, son intégrité est assurée par :

- des jonctions étanches (claudine-1, occludine),
- une épaisse couche de mucus générée par les cellules caliciformes.
- des IgA sécrétoires qui neutralisent les agents pathogènes.

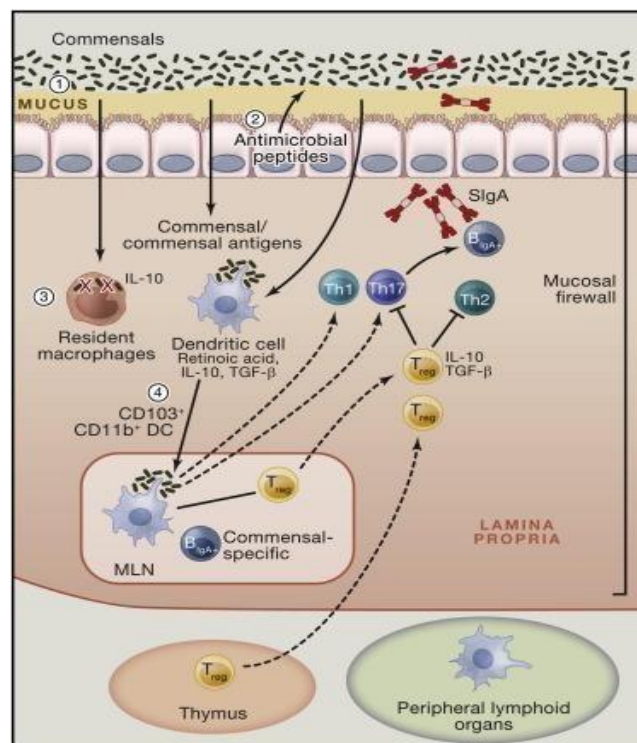
La dysbiose dérange cet équilibre en diminuant la production des AGCC, par exemple butyrate, qui sont des métabolites cruciaux pour l'énergie des entérocytes et le maintien des jonctions serrées (Belkaid & Hand, 2014). En même temps, elle modifie la production de mucus (Johansson *et al.*, 2011) et la libération d'IgA (Coutry *et al.*, 2024),ce qui facilite l'attachement des bactéries et l'inflammation.

Un accroissement de bactéries pathogènes peut aussi provoquer une surproduction de lipopolysaccharides (LPS), qui sont des éléments de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif. Ces molécules stimulent les récepteurs de type Toll des cellules de défense, conduisant à une inflammation persistante et à une intensification de la perméabilité intestinale, un processus communément appelé « leaky gut » (Cani *et al.*, 2008).

## 2.2 / Activation du système immunitaire :

Un équilibre du microbiote intestinal est crucial pour la régulation de l'immunité innée et adaptative, soutenant la tolérance immunitaire et restreignant les réactions inflammatoires démesurées. Lors d'une dysbiose, cet équilibre est altéré, ce qui provoque une hyperstimulation du système immunitaire. Les cellules dendritiques et les macrophages de la lamina propria identifient des antigènes bactériens anormalement présents, ce qui stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , favorisant ainsi une condition inflammatoire persistante (Belkaid & Hand, 2014).

De plus, la dysbiose est liée à un déséquilibre entre les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les lymphocytes T effecteurs pro-inflammatoires (Th1, Th17), ce qui entraîne une condition pro-inflammatoire qui favorise l'auto-immunité et l'inflammation chronique. Ce déséquilibre, régulé par le microbiote intestinal, est essentiel dans le développement de plusieurs affections inflammatoires chroniques, comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), la polyarthrite rhumatoïde et le diabète de type 1 (Omenetti & Pizarro, 2015).



**Figure 10 :** Interaction entre le microbiote intestinal et le système immunitaire dans la lamina propria (Belkaid & Hand, 2014).

### **2.3/Influence sur le métabolisme :**

Le microbiote intestinal influence le métabolisme énergétique en régulant l'absorption des nutriments et la production de métabolites tels que AGCC . La dysbiose réduit la synthèse du butyrate, altère la sensibilité à l'insuline et favorise l'inflammation métabolique (Harris., 2024).

En outre, l'augmentation des bactéries LPS-productant accroît l'inflammation systématique de bas grade, un facteur essentiel dans la pathogenèse de l'obésité, du syndrome métabolique et du diabète de type 2 (Harris., 2024). Certaines études ont également émis une hypothèse de lien entre la structure du microbiote et la régulation des hormones impliquées dans l'appétit, comme la leptine et la ghréline, qui contribuent ainsi aux déséquilibres métaboliques observés chez les patients atteints de dysbiose (Bäckhed *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces mécanismes illustre le rôle fondamental du microbiote dans l'équilibre physiologique et les conséquences de son altération sur la santé humaine. L'étude approfondie de ces interactions est essentielle pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques visant à rétablir un microbiote fonctionnel et prévenir l'apparition de pathologies associées.

### **3/ Dysbiose intestinale et maladies inflammatoires et auto-immunes :**

La dysbiose microbienne est le principal moteur des maladies inflammatoires et auto-immunes locales telles que la colite et les maladies inflammatoires de l'intestin. La dysbiose intestinale peut également être à l'origine de maladies auto-immunes systémiques telles que le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques. (WK Mousa *et al* 2022 )

#### **3.1/Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) :**

La communication microbe-hôte est essentielle au maintien des fonctions vitales d'un hôte sain et toute perturbation de celle-ci a été associée à plusieurs maladies, notamment la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, les deux principales formes de maladies inflammatoires de l'intestin (MII). (PT Santana, *et al.* 2022) .

Ces deux maladies caractérisées par un dysfonctionnement immunitaire intestinal et systémique (N Kaur, *et al*, 2011) .

### 3.1.1 / La Maladie de Crohn :

La maladie de Crohn se caractérise par une inflammation profonde, granulomateuse, transmurale et parfois fistulisante, qui peut survenir n'importe où dans le tractus gastro-intestinal, bien qu'elle affecte le plus souvent l'intestin grêle distal. Ces deux processus pathologiques présentent des manifestations extra-intestinales, notamment des arthralgies et des éruptions cutanées, qui sont le résultat d'une inflammation systémique (N Kaur, *et al*, 2011) .

La perturbation de système immunitaire induit une activation excessive de l'immunité inné et adaptif , résultant a une inflammation continue de la muqueuse intestinale , les cellules dendritique présente des antigène bactérienes au cellules T naifs ( Th0 ) qui se défferncient vers des lymphocytes de sous population Th1 et Th17 par un déséquilibre des cytokines IL12 ,IL6 et IL23 au lieu de défferencier en Treg par l'IL10 et le TGF-  $\beta$  ( E Caparrós, *et al* , 2021 )

Les cellule Th1 sécrète lr TNF  $-\alpha$  qui entraine la formation des lésions intestinales , et favorise l'extravasation des lymphocytes et neutrophiles afin de provoquer l'infiltration inflammatoire , et participe dans l'augmentation de la perméabilité intestinale qui résulte a une implication de la réponse inflammatoire ( E Caparros , *et al* , 2021 ) .

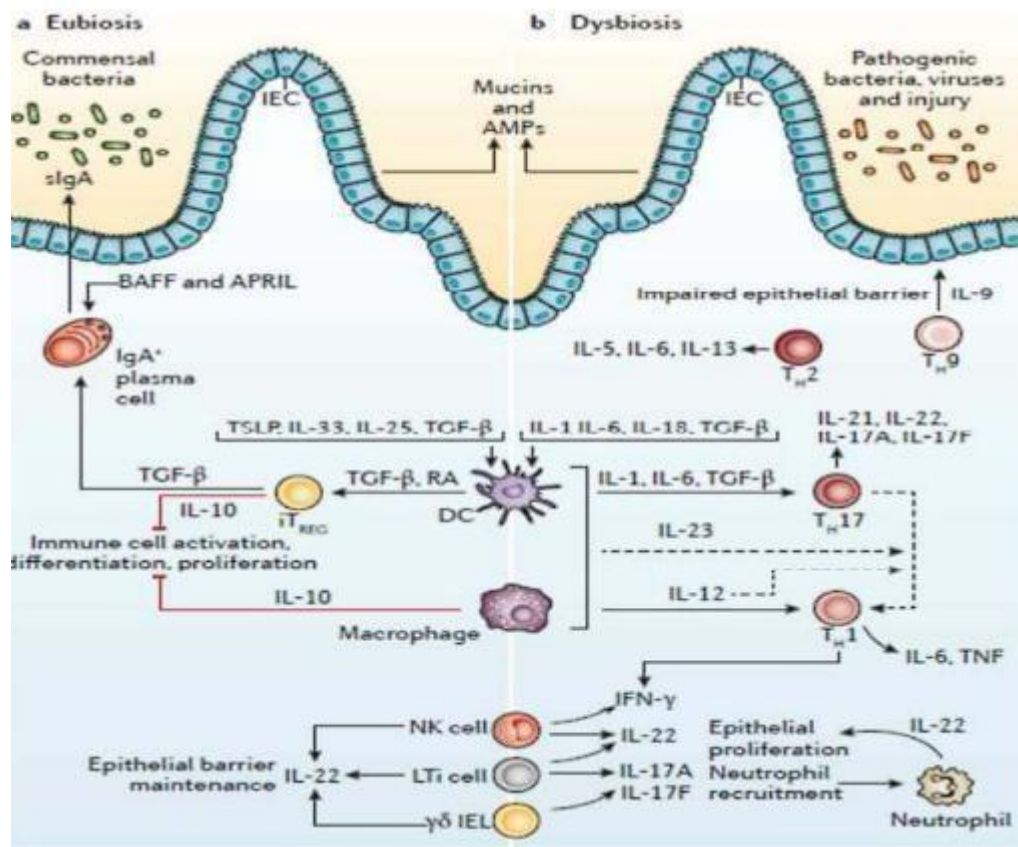
### 3.1.2 Rectolite hémorragique :

La rectocolite hémorragique (RCH) résulte d'une inflammation de la muqueuse, qui est déclenchée par une activation des réponses immunitaires cellulaires et humorales. L'activation des cellules intestinales, essentielles à la réponse immunitaire, conduit à une augmentation de la production de cytokines. Ces molécules jouent un rôle clé dans la régulation locale de la réponse immunitaire, en renforçant et en attirant de nouvelles cellules intestinales au cours du processus inflammatoire. Bien que l'origine précise de cette activation reste encore inconnue, il paraît évident qu'elle découle d'une anomalie dans la régulation du système immunitaire des muqueuses (Al-Shukry, R. 2019 ) .

La pathogenèse se caractérise par une rupture de la barrière épithéliale, permettant ainsi aux bactéries commensales de pénétrer et d'activer l'immunité innée par le biais des récepteurs TLR et NLR . Ce phénomène engendre une production excessive de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8, tandis que les mécanismes régulateurs, comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , montrent des signes de

déficience (Neurath, 2020). La rectocolite hémorragique (RCH) se distingue par une signature immunitaire typique de type Th2/Th9, où l'IL-13 joue un rôle crucial dans l'apoptose des cellules épithéliales (Al-Shukry, 2019).

L'inflammation est persistante est entretenue par une activation lymphocytaire chronique et une dysbiose intestinale (Neurath, 2020) .



**Figure 11 :** Homéostasie immunitaire intestinale et inflammation.( De Souza, H. S., & Fiocchi. 2016 )

### 3.2/Rôle du microbiote dans les maladies auto-immunes systémiques :

La pathogenèse des maladies auto-immunes (MAI) n'est pas seulement attribuée à des susceptibilités génétiques mais aussi à des facteurs environnementaux, parmi lesquels le microbiote intestinal perturbé a attiré de plus en plus d'attention. Des modifications de la composition et de la fonction du microbiote intestinal ont été signalées dans diverses maladies auto-immunes, et de plus en plus d'éléments suggèrent qu'un microbiote intestinal perturbé contribue à leur immunopathogénie. Les mécanismes acceptés comprennent la translocation microbienne anormale, le mimétisme moléculaire et la dysrégulation de l'immunité locale et systémique (Zhang *et al.*, 2020).

#### 3.2.1 / Polyarthrite rhumatoïde :

Les patients souffrant de PR présente des différences marquées de la composition de microbiote intestinale par rapport a celle des individus sain , on observe notamment une diminution significative des familles *Bifidobacterium* et *Bacteroides* et une augmentation de *Prevotella*, notamment *Prevotella copri* (Zhang *et al.*, 2017) .

Cette dysbiose pourrait influencer le système immunitaire avec le déclenchement des réponse inflammatoire inappropriées , le microbiote avec son rôle de modulation des cellules Th17 , et lorsqu'elles sont activées d'une façon excessive en raison de déséquilibre du microbiote intestinale elles augmentent la production des cytokines pro-inflammatoire aggravant ainsi les lésions articulaires typiques de la polyarthrite rhumatoïde ( Romero-Figueroa., *et al.* , 2023) .

Un aspect essentiel de la polyarthrite rhumatoïde (PR) est le processus de citrullination des protéines, au cours duquel l'arginine est convertie en citrulline, ce qui entraîne des modifications peptidiques. Ce mécanisme est influencé par le microbiote intestinal, en particulier par certaines bactéries telles que *Prevotella copri*, qui sont responsables de la production d'enzymes de citrullination. Les peptides citrullinés sont alors perçus comme étrangers par le système immunitaire, ce qui entraîne la production d'auto-anticorps, notamment d'anticorps anti-CCP, un marqueur spécifique de la PR. Cette réponse auto-immune joue un rôle important dans la dégradation des tissus articulaires (Li *et al.* , 2024 ; Zhang *et al.* , 2017).



### 3.2.2 /Diabète de type 1 :

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune , se caractérise par la destruction des cellules bêta du pancréas, résultant a un déficit de l'insuline , des études récentes mentionnent l'impact de la dysbiose et ça contribution dans l'apparition de DT1 ( Han,*et al.* , 2018 ) .

Des études récentes ont mentré que le microbiote intestinale chez un patient de DT1 présente une réduction anormale des bacteries bénéfiques telles que Bifidobacterium et Lactobacillus accompagnée d'une augmentation des pathogène potentiel (Han *et al.*, 2018) . et la diminution des cellules Treg est une activation des T CD 4 + , cette dérégulation des cellules T permet aux cellules T autoréactives d'attaquer et détruire les cellules bêta de pancréas .

Un autre rôle de microbiote intestinal dans le DT1 est la présentation des Ag par des bactéries de l'intestin en interagissant avec les cellules dendritiques, module la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, activant la réponse immunitaire face aux auto-antigènes du pancréas, Les bactéries capables de produire des peptides mimétiques, semblables aux protéines des cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas, ont le potentiel de provoquer une réponse immunitaire ciblant ces cellules, Ce phénomène, associé à une diminution de la tolérance immunitaire, constitue l'un des principaux facteurs de l'auto-immunité dans le diabète de type 1 (Han *et al.*, 2018) .

### 3.2.3 /Sclérose en plaques :

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie chronique, inflammatoire et neurodégénérative. Elle résulte de réactions auto-immunes qui entraînent une démyélinisation progressive du système nerveux central (SNC) ainsi que de la moelle épinière (Dobson & Giovannoni 2019) .

La recherche a révélé que des changements spécifiques dans la composition du microbiote intestinal sont associés à la SEP. Chez les patients atteints de SEP récurrente-rémittente, un déséquilibre entre certaines populations de bactéries bénéfiques et pathogènes a été observé. Par exemple, ces patients présentent des niveaux élevés de bactéries telles que Pedobacteria, Pseudomonas et Akkermansia, tandis que les bactéries protectrices telles que Bifidobacterium et Lactobacillus se trouvent en quantités réduites (Han *et al.* , 2018 ; Zhang *et al.* , 2017).

Ce déséquilibre perturbe l'axe intestin-cerveau par activation des cellules Th1 et Th17 et les cytokines issues de leur activation, augmentant la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, facilitant l'infiltration des cellules immunitaires dans le système nerveux central, en parallèle une réduction des AGCC, en particulier le butyrate nuit à la régulation des cellules Treg et l'intégrité de la barrière intestinale et contribue à l'inflammation (Ouyang *et al.*, 2024).

Des recherches récentes soulignent également l'importance des métabolites microbiens, tels que les dérivés du tryptophane et les acides biliaires, dans la régulation des réponses immunitaires et la protection des neurones (Ouyang *et al.*, 2024 ; Han *et al.*, 2018).

### **3.3/Rôle du microbiote dans les maladies métaboliques :**

La dysbiose du microbiote intestinal constitue un facteur de risque important dans l'émergence des maladies métaboliques. En raison de sa complexité et diversité (Auger & Chatel 2025). En plus des données scientifiques récentes ont montré cette association à des maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète de type 2 (DT2) ou la stéatose hépatique non alcoolique.

#### **3.3.1 /Dysbiose et Obésité :**

L'obésité présente généralement une diversité microbienne diminuée au sein du microbiote intestinal (Ley *et al.*, 2006). Cette réduction induit une baisse notable des espèces bénéfiques telles qu'*Akkermansia muciniphila* (Depommier *et al.* 2019) et Christensenellaceae (Goodrich *et al.*, 2014). Et certaines souches potentiellement nuisibles voient leur abondance augmenter (Million *et al.*, 2013). Ces changements dans la composition du microbiote intestinal sont liés à des perturbations métaboliques et inflammatoires, aussi dans le développement et le maintien de l'obésité.

La dysbiose favorise l'extraction d'énergie des aliments en augmentant la présence de bactéries productrices d'enzymes hydrolytiques, telles que les Firmicutes (Turnbaugh *et al.*, 2006). En outre, elle perturbe la production d'AGCC (le butyrate et le propionate), influence la régulation de la glycémie et la sensation de satiété (Canfora *et al.*, 2015). De plus, elle induit une inflammation chronique de bas grade due à la translocation de LPS qui active les récepteurs TLR4 (Chen *et al.*, 2024). Enfin, elle perturbe la régulation hormonale de l'appétit en altérant la signalisation de la leptine et du GLP-1 (Frost *et al.*, 2014).

**3.3.2 /Dysbiose et diabète :**

Le diabète de type 2 se caractérise par une altération du microbiote intestinale par une baisse significative des bactéries bénéfiques productrice de butyrate telles que *Faecalibacterium prausnitzii* et *Roseburia intestinalis*. Avec une augmentation des espèces pro-inflammatoires comme *Escherichia coli* et *Bacteroides caccae* (Qin *et al.* , 2012).

Le microbiote intestinal contrôle la sensibilité à l'insuline par la production des AGCC comme le butyrate et le propionate, et stimule la production de GLP-1, une hormone essentielle pour améliorer la réponse à l'insuline (Canfora *et al.* , 2015).

Au cours de la dysbiose des composés bactériens tels que les LPS peuvent traverser la paroi intestinale. Cela active les récepteurs TLR4, entraînant une réponse inflammatoire qui perturbe la signalisation de l'insuline (Chen *et al.*, 2024).

**3.3.3 /la stéatose hépatique :**

La maladie hépatique non alcoolique est en partie une maladie nutritionnelle, avec une évolution par étapes, dans laquelle les rôles des facteurs alimentaires, de la dysbiose , du surpoids sont essentiels (Cassard *et al.*, 2020), De nombreuses études révèlent que la pathogenèse de la NAFLD chez l'humain est étroitement associée à un déséquilibre de la microflore intestinale. (Leung C *et al.* , 2016).

La stéatose hépatique est caractérisée par une augmentation de la production d'éthanol intestinale toxique pour le foie et sa capacité d'altérer la perméabilité intestinale (Zhu *et al.*, 2013). Et l'induction de l'inflammation par les récepteurs TLR hépatique qui sont activés par la translocation des PAMPs (LPS), De plus elle perturbe le métabolisme hépatique par la dégradation de la choline provoquant une accumulation de triglycérides , encore elle induit un excès en AGCC , qui stimule la lipogenèse en inhibant l'AMPK (den Besten *et al.*, 2013 ; Bäckhed *et al.*, 2004 Spencer *et al.*, 2011 ; Bäckhed *et al.*, 2004 ) .

# **CHAPITRE 04: Méthodes d'analyse et stratégies thérapeutiques de la dysbiose**

## **1/ techniques de diagnostic :**

L'analyse de la composition du microbiote humain suscite un intérêt croissant, car les composants structuraux et les métabolites des micro-organismes influencent fondamentalement tous les aspects de la physiologie de l'hôte. L'exploration de ces écosystèmes était à l'origine dominée par des méthodes dépendant de la culture, mais le développement de techniques moléculaires telles que le séquençage à haut débit a permis d'accroître considérablement les connaissances (Hiergeist et *al* ; 2015 ).

### **1.1 / Techniques Moléculaires de Détection du Microbiote Intestinal :**

#### **1.1.1/ PCR et PCR Quantitative en Temps Réel (qPCR) :**

Diverses techniques sont utilisées dans la recherche du microbiome intestinal, chacune ayant ses propres forces et limites. La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est très sensible, mais dépend de la qualité de l'extraction de l'ADN (Jansen et *al.*, 2024).

Ces technique repose sur l'extraction de l'ADN a partir des échantillon fécaux La ,qualité de l'ADN obtenue est verifier par spectrophotométrie et l'implification de gène 16S RNAr (Salonen et *al* .,2020 ; Lim et *al* .,2020 ) .

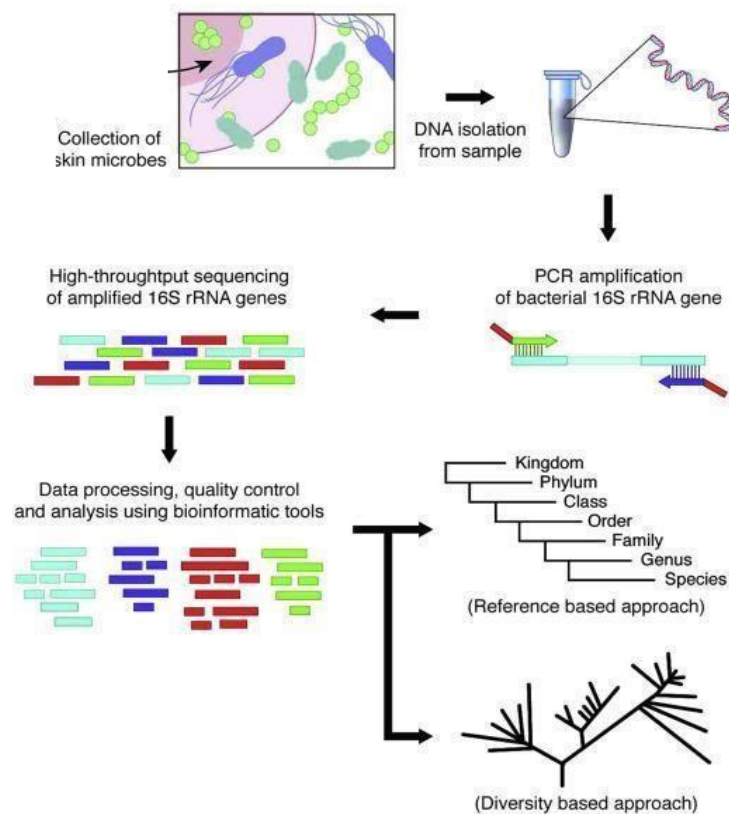
Dans qPCR, la conception d'amorces spécifiques ciblant différents groupes bactériens (tels que Bacteroidetes ou Firmicutes) ou des gènes de virulence (comme TCDB de *Clostridium difficile*) est de la plus haute importance (Salonen et *al* .,2010 ) . Dans les conditions d'amplification standard, les températures d'hybridation sont optimisées pour chaque couple d'initiation, et le processus implique 40 cycles.

Ces techniques permettent la compréhension de l'écosystème intestinal et la quantification précise d'espèces spécifiques, comme *Faecalibacterium prausnitzii* un micro-organisme qui possède des propriétés anti-inflammatoire , ou l'évaluation du ratio Firmicutes / Bacteroidetes dans l'obésité ( Li, O'Toole . , 2024 ) .

### 1.1.2/ Séquençage de l'ARNr 16S :

La technique de séquençage de l'ARNr 16S est une méthode essentielle pour l'analyse du microbiote intestinal, elle repose sur l'amplification et le séquençage de l'ARNr 16S présent chez toutes les bactéries avec des régions variables spécifiques à chaque espèce, ce qui facilite leur identification taxonomique (Klindworth et *al.*, 2013) .

le gène ARNr 16S avec ces régions stable et régions hypervariables, les segments constants permet l'amplification par PCR et les régions hypervariables pour obtenir des signatures uniques permettent de distinguer les différentes espèce bactériennes ( J. M., & Abbott, S. L. 2007 ) .



**Figure 12 :** Schéma du séquençage 16S(Kong 2011).

Cette méthode a été couramment utilisée pour étudier l'implication du microbiote intestinal dans différentes maladies, telles que les troubles auto-immunes.

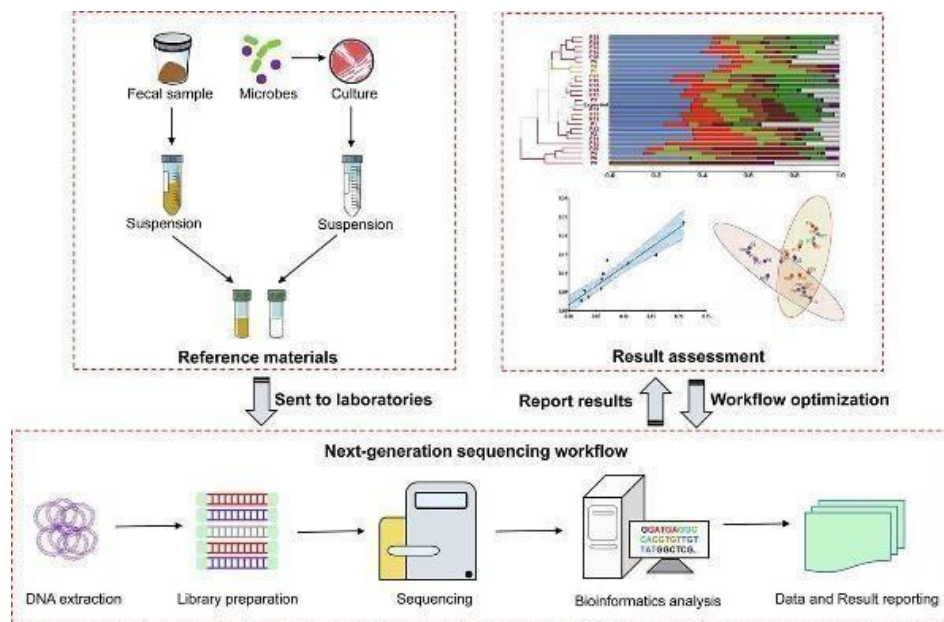
### 1.1.3/La Métagénomique :

La métagénomique offre une vision plus large et précise de l'écosystème intestinale et sa structure et de sa perturbation dans certaines maladies (Blottière & Doré, 2016).

Cette méthode est une technique de séquençage du génome bactérien entier s'effectue en quatre étapes principales : l'extraction de l'ADN génomique ; le séquençage de l'ADN, avec ou sans amplification préalable ; l'assemblage bioinformatique du génome séquencé et l'analyse des séquences obtenues (Diene et *al.*, 2014)

il existe deux approches différentes pour déterminer la diversité microbienne :

- métagénomique ciblé : qui consiste à amplifier des régions spécifiques de l'ADN microbien en utilisant des amorces ciblant des marqueurs taxonomiques comme le gène de l'ARNr 16S (Sharpton, 2014) .
- métagénomique shotgun : cette technique peut aider à reconstruire de grands fragments ou même des génomes complets d'organismes d'une communauté , permettant la caractérisation d'un grand nombre de séquences codantes et non codantes qui peuvent être utilisées comme marqueurs phylogénétiques (Escobar-Zepeda et *al.*, 2015) .



**Figure 13 :** métagénomique shotgun (Han et al. 2020)

## **1.2. Dosage des cytokines et marqueurs de l'inflammation :**

Au cours d'une dysbiose , une surproduction de cytokines, peut entraîner le développement de réponses immunitaires anormales. De nombreuses études ont ainsi montré que la dysbiose intestinale est associée à des anomalies dans la régulation des cytokines et participe au développement de maladies auto-immunes et inflammatoires (Kosiewicz et *al.* , 2011 , Gevers et *al.* , 2014, Paun et *al.* , 2016).

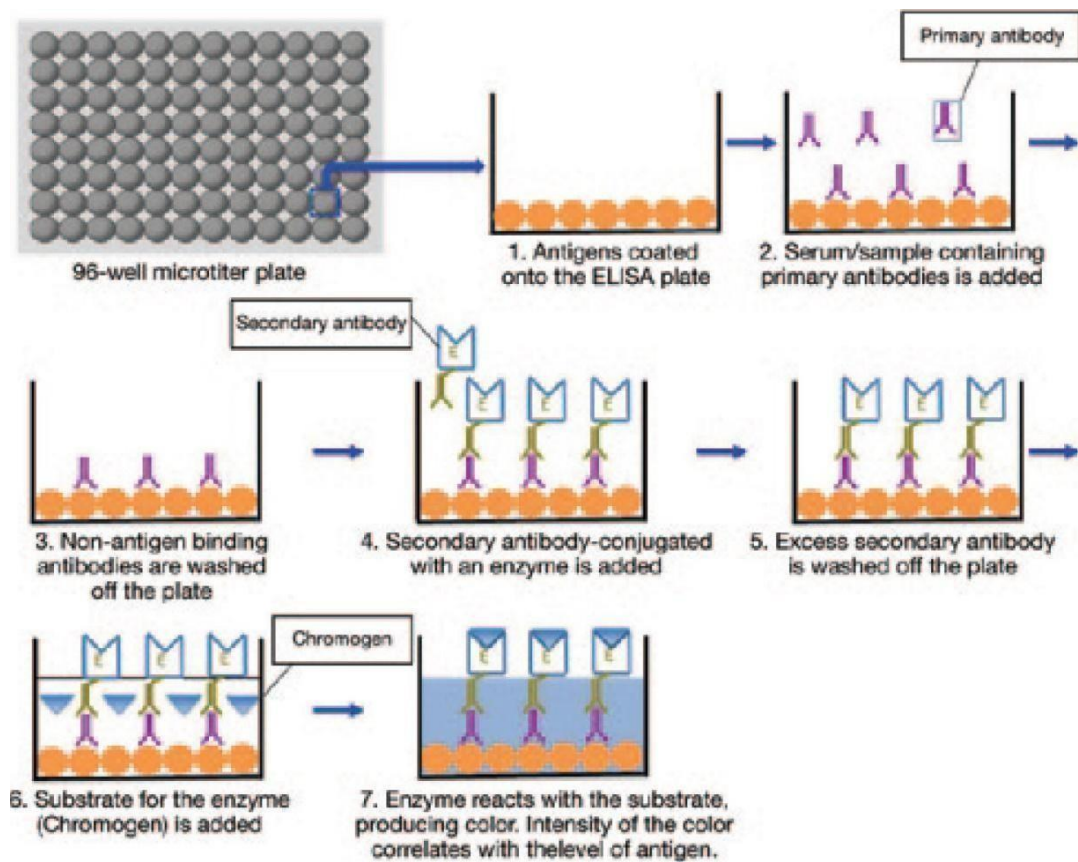
### **1.2.1/ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) :**

La mesure précise des niveaux de cytokines est une méthode puissante et cruciale dans l'étude de l'inflammation. Le dosage immuno-enzymatique (ELISA) est un outil analytique simple et rentable qui offre à la fois la spécificité et la sensibilité nécessaires à l'étude des cytokines en laboratoire ou dans les organismes vivants ( Chiswick et *al.* , 2012 ) .

liquide. ELISA utilise des antigènes et des anticorps marqués par des enzymes pour détecter des molécules biologiques. L'antigène en phase liquide est immobilisé, généralement dans des plaques de microtitration à 96 puits. L'antigène peut se lier à un anticorps spécifique, qui est ensuite détecté par un anticorps secondaire couplé à une enzyme. Un substrat chromogène pour l'enzyme produit un changement de couleur visible ou une fluorescence, indiquant la présence de l'antigène. Les mesures quantitatives ou qualitatives peuvent être évaluées sur la base de cette lecture colorimétrique. Les substrats fluorogènes ont une plus grande sensibilité et peuvent mesurer avec précision les niveaux de concentration de l'antigène dans l'échantillon (Gan & Patel, 2013).

Les techniques ELISA sont classées en quatre type qui sont , ELISA direct, indirect, sandwich et compétitif, qui varient en fonction des anticorps , des antigènes, des substrats et des conditions d'étulisations (Hayrapetyan et *al.*, 2023).

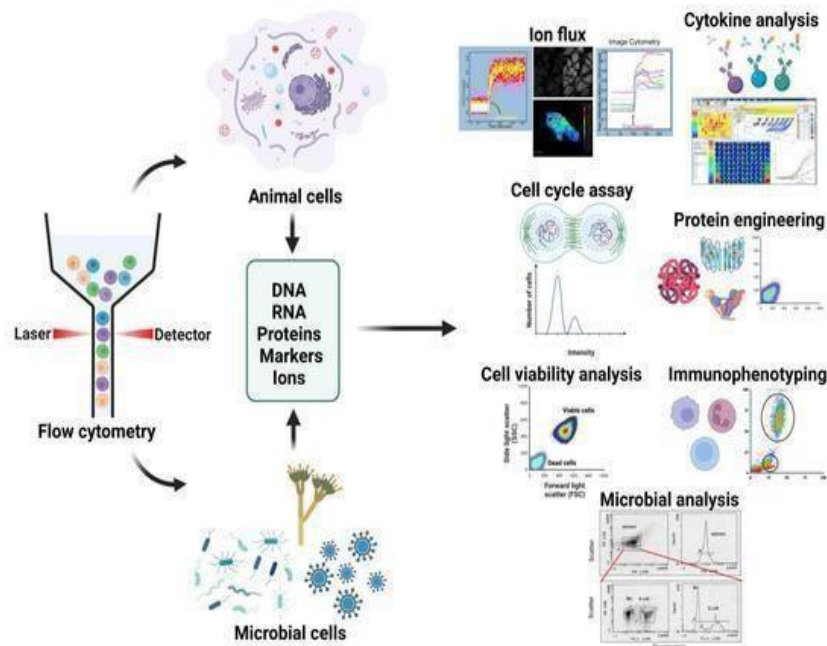




**Figure 14 :** Technique d'immuno-absorption enzymatique (ELISA) utilisée pour détecter un antigène dans un échantillon donné (Gan & Patel, 2013).

### 1.2.2/ La cytométrie en flux :

La cytométrie en flux ( FMC ) est une technique analytique permettant l'analyse individuelle des cellules . avant de passer devant un faisceau laser les cellules sont alignées selon le principe du centrage hydrodynamique , cette interaction génère des phénomènes optiques qui permettent l'analyse des caractéristiques physiques et biologiques des cellules après l'incubation avec des réactifs fluorescents (Jouault & Imbert, 1995) .



**Figure 15 :** applications de la cytométrie en flux (Robinson et *al.*, 2023)

## 2/ Modèles expérimentaux pour l'étude de la dysbiose intestinale :

L'étude de la dysbiose repose largement sur l'utilisation de modèles animaux et *in vitro* pour reproduire, analyser et manipuler les interactions complexes entre le microbiote intestinal, l'hôte et l'environnement. Les modèles de microbiote intestinal, en particulier les modèles axéniques (sans germe, GF) et humanisés (colonisés avec du microbiote humain), sont largement utilisés pour étudier les effets causaux du microbiote sur des pathologies telles que l'obésité, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD) et le cancer colorectal (Harris ; 2024 ; Aguanno *et al.*, 2022)

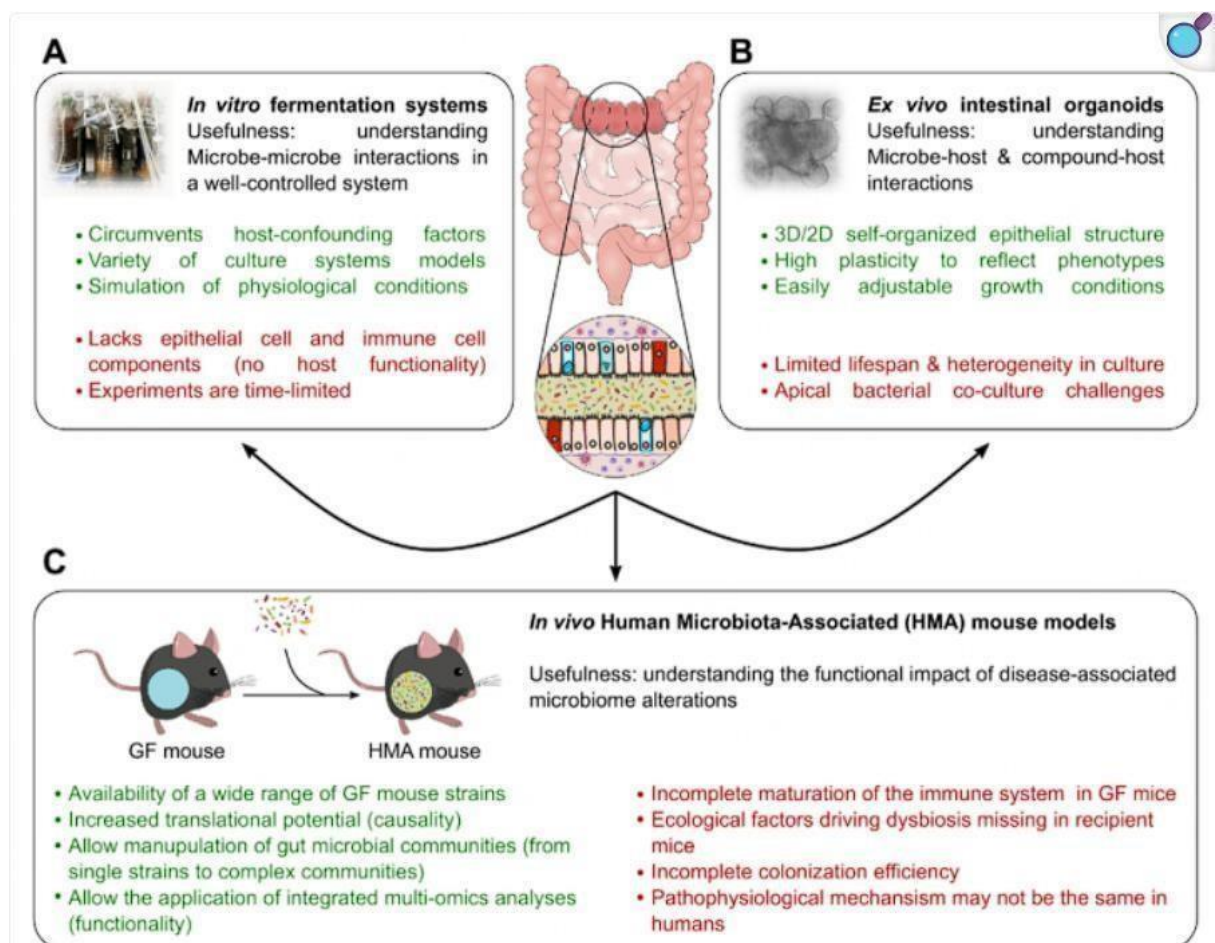
Parallèlement, des modèles *in vitro* tels que les systèmes de fermentation, les organoïdes intestinaux et les dispositifs microfluidiques (par exemple, les « intestins sur puce ») sont utilisés pour reproduire des environnements microbiens contrôlés. Ces modèles permettent une évaluation précise des réponses du microbiote à différents stimuli ou traitements sans qu'il soit nécessaire d'utiliser des animaux variables (Aguanno *et al.*, 2022)

Les modèles animaux, notamment :

Les souris axéniques (gnotobiotiques), dépourvues de microbiote, chez lesquelles on peut introduire des microbiotes spécifiques (mono-associations ou microbiotes complexes), permettent d'explorer des effets causaux dans des pathologies comme l'obésité, les MICI ou le cancer colorectal (Aguanno *et al.*, 2022).

Les modèles humanisés (HMA), où des souris sont colonisées par un microbiote humain, permettent une meilleure transposition des résultats vers la physiologie humaine, bien qu'il persiste des différences notables inter-espèces (Aguanno *et al.*, 2022).

Ces modèles ont conduit à des progrès significatifs dans la connaissance des maladies liées aux troubles métaboliques, inflammatoires et tumoraux associés à des modifications du microbiote intestinal. L'emploi conjoint de ces éléments accentue la pertinence des observations et simplifie l'élaboration de traitements visant spécifiquement la dysbiose (Aguanno *et al.*, 2022).



**Figure 16 :** Principaux modèles expérimentaux utilisés pour l'étude du microbiote intestinal et de la dysbiose (Aguanno *et al.*, 2022).

### **3 / Approches thérapeutiques :**

#### **3.1/ L'utilisation des probiotiques :**

Les probiotiques ont de nombreuses souches différentes et sont définis comme des micro-organismes vivants qui ont un effet positif sur la santé de l'hôte lorsqu'ils sont pris correctement et en quantité suffisante.(Hill C *et al.* , 2014) . Grâce à leurs effets multiples, les probiotiques améliorent l'intégrité de la muqueuse altérée et la réponse immunitaire, interagissent avec les micro-organismes pathogènes et maintiennent la flore saine existante (M Pesce *et al.* , 2020) .

Après l'administration, les bactéries probiotiques orales interagissent avec les cellules épithéliales intestinales ou les cellules immunitaires associées à la lamina propria via des récepteurs TLR et induisent la production de différentes cytokines ou chimiokines. Ils activent notamment les cellules T régulatrices qui libèrent de l'IL-10 (C Maldonado *et al.* , 2019 ) .

De plus , ils inhibent la croissance des bactéries pathogènes sans perturber l'homéostasie de l'intestin à long terme. Ils stimulent la réponse immunitaire innée via les macrophages et les cellules dendritiques, sans provoquer d'inflammation importante. En cas de malnutrition ou d'obésité, ils renforcent la réponse immunitaire et restaurent la structure des tissus intestinaux comme, ils pourraient prévenir les allergies en favorisant une réponse immunitaire de type Th1 et la production d'IgG plutôt que d'IgE (C Maldonado *et al.* , 2019 ) .

#### **3.2/ L'utilisation des prébiotiques :**

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires non viables métabolisés de manière sélective par des bactéries intestinales bénéfiques. La modulation alimentaire de la microflore intestinale par les prébiotiques vise à améliorer la santé en stimulant le nombre et/ou l'activité des bifidobactéries et des lactobacilles. Une microflore intestinale « optimale » peut accroître la résistance aux bactéries pathogènes, abaisser le taux d'ammoniaque dans le sang, renforcer la réponse immunitaire et réduire le risque de cancer.

Les bifidobactéries stimulent le système immunitaire, produisent des vitamines B, inhibent la croissance des agents pathogènes, et baissent les taux d'ammoniaque et de cholestérol dans le sang et contribuent à restaurer la flore normale après la prise des antibiotiques (Gibson & Roberfroid, 1995).

Les lactobacilles peuvent réduire la constipation et la diarrhée infantile, résister aux infections telles que les salmonelles et contribuer à soulager le syndrome du côlon irritable , comme ils peuvent faciliter la digestion du lactose chez les personnes intolérantes au lactose (Manning & Gibson, 2004).

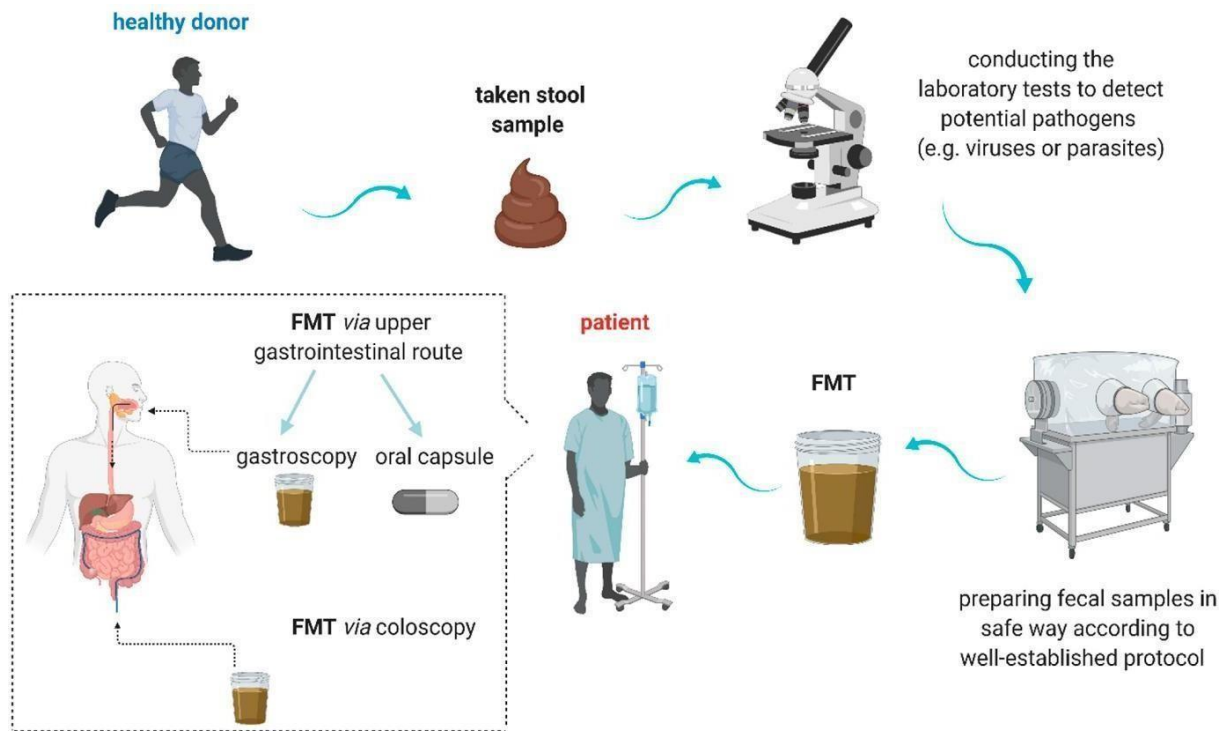
### **3.3/ La transplantation fécale :**

La transplantation de microbiote fécal (TMF) est l'infusion d'un filtrat liquide de matières fécales provenant d'un donneur sain dans l'intestin d'un receveur afin de guérir une maladie spécifique , ( Choi., & Cho. ,2016).

Le produit transféré est très complexe et variable, il ne se compose pas d'espèces bactériennes uniquement , mais englobe un écosystème complet des bactéries, des virus, des cellules humaines, des champignons, du mucus, des métabolites ( Bourlioux, P. 2015 ).

Le processus consiste généralement à sélectionner d'abord un donneur sans antécédents familiaux de maladies auto-immunes, métaboliques et malignes et à le soumettre à un dépistage de tout agent pathogène potentiel ( Gupta, S *et al.* , 2016.)

Les selles sont ensuite préparées en les mélangeant avec de l'eau ou du sérum physiologique et en les filtrant pour éliminer les particules. Le mélange peut être administré par sonde nasogastrique, sonde nasojejunale, œsophagogastroduodénoscopie (OGD), coloscopie ou lavement de rétention. La plupart de l'expérience clinique de la FMT provient du traitement des infections récurrentes ou réfractaires à *Clostridium difficile* (CDI) ( Smits *et al.* 2013 ).



**Figure 16 :** Procédure de transplantation fécale de microbiote intestinal (Kaźmierczak-Siedlecka K *et al.*, 2021)

# **PARTIE PRATIQUE**

## **1/Type de l'étude et objectifs**

L'étude pratique a été réalisée dans le but de mettre en évidence l'intérêt de deux techniques fondamentales utilisées en biologie moléculaire et immunologique en biologie : l'ELISA et la PCR.

La première partie a été effectuée au sein du laboratoire d'hémobiochimie, situé au centre de transfusion sanguine (CHU Constantine), où des échantillons de sérum issus de dons de sang ont été utilisés pour la réalisation d'un test ELISA à l'aide du kit IVCOMB AgAb. Cette étape visait essentiellement à illustrer le principe de détection immuno-enzymatique dans un contexte descriptif et non pathologique.

La seconde partie a été conduite dans le laboratoire de sérologie moléculaire du CHUC, où la technique de PCR a été appliquée sur l'ADN extrait de leucocytes provenant de sang total. L'amplification ciblait le gène *MSN*, impliqué dans des processus cellulaires et immunitaires, dans le cadre d'un apprentissage méthodologique.

L'ensemble des travaux pratiques s'est déroulé sur une durée de 15 jours

### **1/Analyse des échantillons sanguins par ELISA sandwich Anticorps/Antigène (HIV Ab/Ag) :**

#### **1-1 /Principe :**

L'analyse des échantillons sanguins par la méthode ELISA sandwich pour la détection combinée des anticorps et de l'antigène du VIH repose sur un principe immuno-enzymatique sensible et spécifique. Ce test, dit de quatrième génération, permet d'identifier simultanément les anticorps anti-VIH (IgG et IgM) ainsi que l'antigène p24, une protéine virale détectable précocement après l'infection. Les puits de la plaque ELISA sont préalablement sensibilisés avec des anticorps de capture spécifiques. Lors de l'ajout de l'échantillon, les anticorps anti-VIH et/ou l'antigène p24, s'ils sont présents dans le sérum du patient, se fixent sur ces anticorps. Un conjugué enzymatique est ensuite ajouté : il s'agit d'un anticorps marqué par une enzyme qui se lie aux complexes formés. L'ajout du substrat chromogène (comme le TMB) permet une révélation colorimétrique, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de cibles immunologiques présentes. Enfin, la densité optique est mesurée à l'aide d'un



lecteur de plaque à 450 nm. Ce test permet ainsi un diagnostic plus précoce du VIH, grâce à la détection simultanée de la réponse immunitaire et de l'antigène viral circulant.

## 1-2 / Protocole expérimental :

### Préparation des échantillons :

On procède par un prélèvement du sang veineux dans un tube sans anti coagulant ce dernier est centrifugé pour récupérer le sérum puis conservé à 4°C. Fig 18 A,B



**Figure 18 :** mise des échantillons en centrifugation

Suivant les instructions du kit, on laisse la cupule A1 vide pour le blanc, puis on distribue le diluant échantillon sur la plaque à un volume de 50  $\mu$ L. Fig 19 A,B

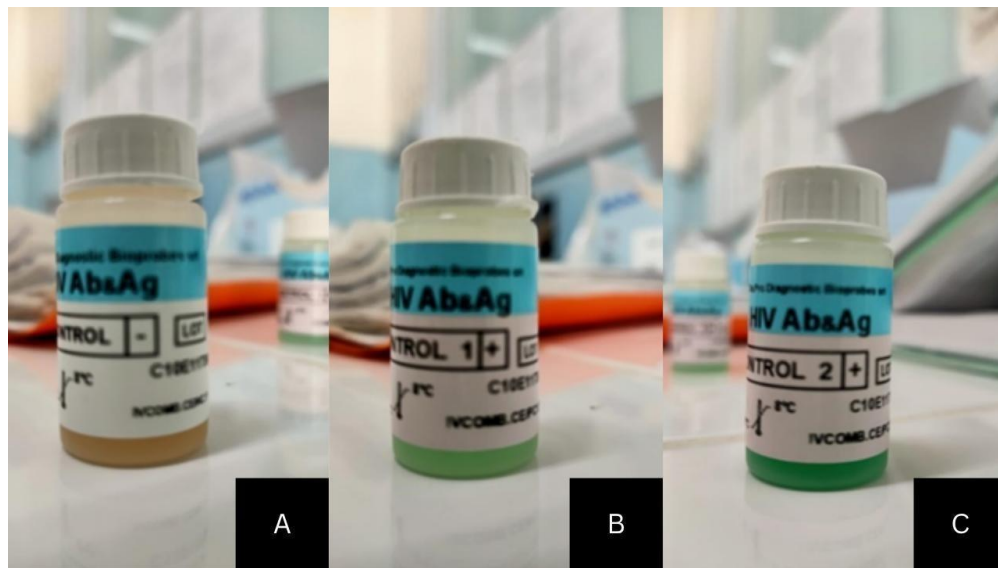


**Figure 19 :** plaque avec puits et diluant échantillon ( DILSPE )

Une fois le diluant échantillon distribué dans les puits, l'étape suivante consiste à ajouter de manière rigoureuse les différents témoins (contrôle négatif et positifs), le calibrateur ainsi

que les échantillons de sérum, selon une disposition précise sur la plaque, afin d'assurer la validité du test et permettre une interprétation fiable des résultats :

- Contrôle négatif : ajouter 150  $\mu$ L dans les puits B1, C1 et D1. Fig 20 A
- Calibrateur : ajouter 150  $\mu$ L dans les puits E1 et F1.
- Contrôle positif n°1 : ajouter 150  $\mu$ L dans le puits G1. Fig 20 B
- Contrôle positif n°2 : ajouter 150  $\mu$ L dans le puits H1. Fig 20 C
- Échantillons à tester : ajouter 150  $\mu$ L dans les autres puits restants de la plaque



**Figure 20 :** contrôle négatif et les contrôles positifs

La plaque est homogénéisée délicatement puis couverte et placée dans un incubateur à 37° C pendant 60 minutes. Fig 21 A,B

Après incubation la plaque déjà préparée, passe au lavage (x5) par un laveur de microplaque. Fig 21 C

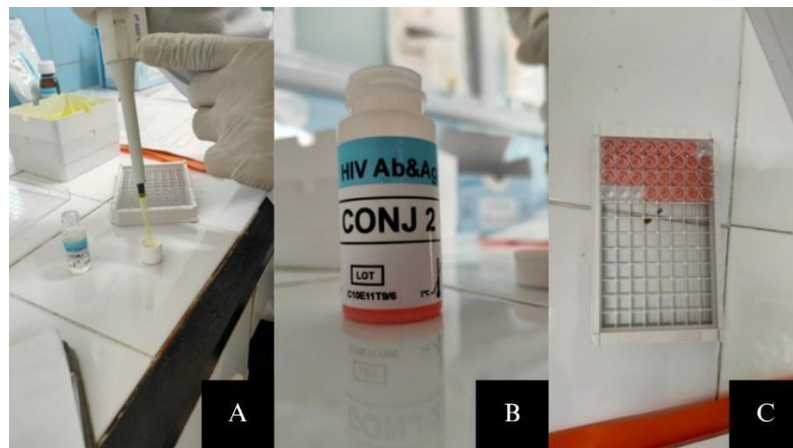


**Figure 21 :** incubation de la plaque et lavage

### **Formation du complexe sandwich et incubation :**

On commence à distribuer le conjugués n° 1 dans les puits sauf A1 (150  $\mu$ L) et l'incuber pour la deuxième fois .Fig 22A

Après la deuxième incubation on ajoute le conjugué n° 2 sauf A1 (100  $\mu$ L) . Fig 22B,C



**Figure 22 :** Distribution du conjugué n°1 et le conjugué n° 2 sur la plaque.

Une fois le deuxième conjugué est distribuer la plaque est homogéniser et subir une troisième incubation pendant 30 minutes a 37 °C et un deuxième lavage .

### **Révélation enzymatique :**

puis la plaque est placée en incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. . On freine la réaction en ajoutant l'acide sulfurique à tous les puits faisant ainsi virer la couleur du bleu au jaune. Fig 23



**Figure 23 :** Révélation du complexe immunitaire par le substrat TMB ,

### Lecture :

La lecture finale est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre, mesurant l'absorbance à 450 nm. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-HIV et/ou d'antigène p24 présents dans l'échantillon. Fig 24



**Figure 24 :** lecture par spectrophotométrie.

## **2 / Détection du gène *MSN* par PCR :**

### **2-1/ principe :**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode de biologie moléculaire qui permet d'amplifier spécifiquement une région d'ADN cible, à partir d'une faible quantité initiale. Cette technique repose sur l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, généralement la Taq polymérase, capable de synthétiser de nouveaux brins d'ADN en conditions contrôlées. La PCR nécessite la présence d'ADN matrice, de deux amorces spécifiques encadrant la séquence d'intérêt, de désoxynucléotides (dNTPs), d'un tampon de réaction et de l'enzyme polymérase. Le processus se déroule en plusieurs cycles successifs comprenant trois étapes principales : la dénaturation (environ 94–95 °C), qui sépare les deux brins d'ADN ; l'hybridation (50–65 °C), où les amorces se fixent sur les séquences complémentaires ; et l'élongation (72 °C), durant laquelle la polymérase synthétise les nouveaux brins d'ADN. Chaque cycle double la quantité d'ADN cible, entraînant une amplification exponentielle. Après 30 à 40 cycles, des millions de copies de la séquence ciblée peuvent être obtenues. Les produits d'amplification (ou amplicons) sont ensuite visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose, ce qui permet de confirmer la taille attendue du fragment amplifié. Cette méthode est largement utilisée dans le diagnostic, la recherche biomédicale et la détection de gènes spécifiques, comme c'est le cas ici pour l'amplification du gène *MSN*.

### **2-1 / Protocole technique :**

#### **Préparation de master mix :**

La Préparation de master mix est faite pour 3 patients donc 7 réactions dans un tube stérile de 1,5 mL ou plus. Le mix est composé de : fig 25

- Tampon 10X : 35 µL
- dNTPs (10 mM) : 17,5 µL
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM) : 14 µL
- ADN polymérase (Taq) : 1,4 µL
- Eau sans nucléase : 268,1 µL



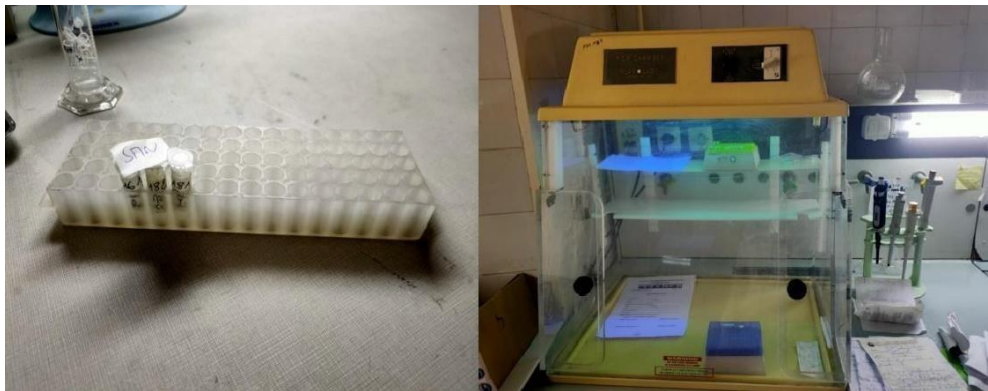


**Figure 25 :** Tampons  $MgCl_2$  Taq , dNTP et amorces d'ADN.

On distribue 40  $\mu L$  de ce mélange dans les tubes PCR stériles. Dans chaque tube ajoute :

- 2  $\mu L$  d'amorce forward MSN
- 2  $\mu L$  d'amorce reverse MSN .
- 4  $\mu L$  d'ADN .

Puis la plaque est mise dans une chambre à UV pour décontaminer les réactifs et les tubes/plaque. Cette étape permet de réduire les risques de contamination par de l'ADN exogène .Fig 26



**Figure 26 :** traitement des échantillons PCR dans la chambre à UV .

## Déroulement de la PCR :

Après l'exposition aux UV, les tubes sont chargés dans le thermocycleur avec le programme adapté aux gènes cible ( MSN ) ou les trois principales étapes sont effectués automatiquement : Fig 27

- la dénaturation de l'ADN à 95 °C
- l'hybridation des amorces à une température entre 55 et 94 °C pendant 30 cycles
- l'élongation du fragment cible par la Taq polymérase à 72 °C.



**Figure 27 :** déroulement de la PCR .

## Visualisation des produits PCR :

Pour l'analyse des produits PCR du gène MSN, on utilise l'électrophorèse sur gel d'agarose. Le produit de la PCR (10 µL) est mélangé à 3 µL de colorant de chargement (FBD), puis il est déposé sur un gel d'agarose à 1,5 % préalablement préparé avec un tampon TBE 1X.

La migration des produits amplifiés se fait dans une cuve d'électrophorèse à l'aide d'un tampon TBE 1X. Les fragments migrent à une tension initiale de 50 V, puis la tension est augmentée à 70 V pour séparer les fragments d'ADN. Fig 28 A

En fin, l'observation des bandes d'ADN est effectuée via un Trans illuminateur UV .  
.Fig 28 B



**Figure 28:** migration des échantillons et lecture des bandes.



# **Conclusion & perspectives**

Le microbiote intestinal ; considéré comme un organe caché de l'organisme, constitue aujourd'hui un domaine central pour la compréhension des mécanismes immunitaires et les pathologies inflammatoires et métaboliques (diabète et obésité). Les recherches récentes ont dévoilé l'implication de cet écosystème dans le maintien de l'hémostase, la tolérance, la modulation du système immunitaire ainsi que son impact sur les différentes maladies auto-immunes (MICI), et les désordres neuropsychologiques (dépression et anxiété).

Notre étude a permis de mettre en évidence les fonctions immunitaires principales du microbiote intestinal et de conclure ainsi qu'il existe un lien intime entre la situation de dysbiose et les déséquilibres prononcés du système immunitaire.

Egalement, au vu de toutes les études citées dans ce travail, il est confirmé que le microbiote intestinal offre une piste prometteuse pour envisager un traitement préventif ou thérapeutique contre toute anomalie multifactorielle. Les prébiotiques et les probiotiques présentent des outils efficaces et sains.

Dans la partie pratique, nous avons décrit deux techniques immunologiques essentielles : la PCR et la technique ELISA réalisées dans un objectif méthodologique afin d'illustrer les outils fréquemment utilisés dans les études concernant les réponses immunitaires associées à la dysbiose.

Par ailleurs, loin d'être une composante digestive simple, le microbiote intestinal semble être un pilier de la santé humaine, à cause de la complexité et l'influence de ses fonctions. Par conséquent, il devient impératif d'approfondir les recherches scientifiques, médicales et technologiques qui s'intéressent à ce domaine.

Ainsi, les études futures sur le microbiote intestinal devraient s'appuyer sur des approches multidisciplinaires combinant l'immunologie, la microbiologie et la bio-informatique.

Le développement de plateformes de séquençage de haut débit et des techniques méta-génomiques permettrait des analyses directes et précises. Il est essentiel de renforcer les recherches pour identifier les profils microbiens spécifiques associés à certaines pathologies inflammatoires ou auto-immunes, afin de mieux comprendre les mécanismes de la dysbiose et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES :**

- Aguanno, D., Reikvam, D. H., Storrø, O., & Hornef, M. W. (2022).** Modeling microbiota-associated human diseases: from minimal models to complex systems. *Cell Host & Microbe*, 30(8), 1142–1156.
- Akira, S. (2006).** TLR signaling. *From innate immunity to immunological memory*, 1-16.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004).** Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, 4(7), 499-511.
- Almeida-da-Silva, C. L. C., Savio, L. E. B., Coutinho-Silva, R., & Ojcius, D. M. (2023).** The role of NOD-like receptors in innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 14, 1122586.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., Van Der Veeken, J., Deroos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., & Coffey, P. J. (2013).** Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451-455.
- Assimakopoulos, S. F., Papageorgiou, I., & Charonis, A. (2011).** Enterocytes' tight junctions : From molecules to diseases. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 2(6), 123.
- Atarashi, K., & Honda, K. (2011).** Microbiota in autoimmunity and tolerance. *Current opinion in immunology*, 23(6), 761-768.
- Azzouz, L. L., & Sharma, S. (2023).** *Physiology, large intestine*. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018).** The gastrointestinal microbiome: A review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 9–25.
- Belkaid, Y., & Hand, T. W. (2014).** Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 157(1), 121-141.
- Berger, A. (2002).** Probiotics. *BMJ*, 324(7350), 1364.

- Bhutta, N. K., Xu, X., Jian, C., Wang, Y., Liu, Y., Sun, J., ... & Javeed, A. (2024).** Gut microbiota mediated T cells regulation and autoimmune diseases. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1477187.
- Blottière, H. M., & Doré, J. (2016).** Impact des nouveaux outils de métagénomique sur notre connaissance du microbiote intestinal et de son rôle en santé humaine-Enjeux diagnostiques et thérapeutiques. *médecine/sciences*, 32(11), 944-951.
- Bourlioux, P. (2015).** Faecal microbiota transplantation : Key points to consider. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 73(3), 163-168.
- Breslin, N. P., Nash, C., Hilsden, R. J., Hershfield, N. B., Price, L. M., Meddings, J. B., & Sutherland, L. R. (2001).** Intestinal permeability is increased in a proportion of spouses of patients with Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology*, 96(10), 2934-2938.
- Cario, E. (2005).** Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa : Toll-like receptors and NOD2. *Gut*, 54(8), 1182-1193.
- Cheng, J., Kalliomäki, M., Heilig, H. G., Palva, A., Lähteenoja, H., de Vos, W. M., Salojärvi, J., & Satokari, R. (2013).** Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease. *BMC gastroenterology*, 13, 1-13.
- Cherbuy, C., Thomas, M., & Langella, P. (2013).** Le microbiote intestinal : Une composante santé qui évolue avec l'âge. *Innovations agronomiques*, 33, 37-46.
- Chiswick, E. L., Duffy, E., Japp, B., & Remick, D. (2012).** Detection and quantification of cytokines and other biomarkers. *Leucocytes: Methods and Protocols*, 15-30.
- Choi, H. H., & Cho, Y.-S. (2016).** Fecal microbiota transplantation : Current applications, effectiveness, and future perspectives. *Clinical endoscopy*, 49(3), 257-265.

- Comtet-Marre, S., Chakoory, O., Rochette, E., Gallot, D., Merlin, E., Pons, M., & Peyret, P.** (2024). *Microbiote intestinale : de la stérilité chez les nouveau-nés à la complexité des interactions chez l'adulte. Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **59**(3), 172–183.
- Coutry, N., Gasmi, I., Herbert, F., & Jay, P.** (2024). *Mechanisms of intestinal dysbiosis: new insights into tuft cell functions. Gut Microbes*, **16**(1), 2379624
- Coombes, J. L., & Powrie, F.** (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature reviews immunology*, **8**(6), 435-446.
- Costa, M., & Weese, J. S.** (2019). Methods and basic concepts for microbiota assessment. *The Veterinary Journal*, **249**, 10-15.
- Derrien, M., & van Hylckama Vlieg, J. E.** (2015). Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, **23**(6), 354-366.
- Diene, S. M., Bertelli, C., Pillonel, T., Schrenzel, J., & Greub, G.** (2014). Génomique et métagénomique. *Rev Med Suisse*, **10**, 2155-2161.
- Dmytriv, T. R., Storey, K. B., & Lushchak, V. I.** (2024). Intestinal barrier permeability : The influence of gut microbiota, nutrition, and exercise. *Frontiers in Physiology*, **15**, 1380713.
- Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K.** (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, **14**(1), 20–32.
- Doré, J., & Corthier, G.** (2010a). Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie clinique et biologique*, **34**(4), 7-16.
- Doré, J., & Corthier, G.** (2010b). The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie clinique et biologique*, **34**, S7-S15.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A.** (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, **308**(5728), 1635-1638.

- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A., & Sanchez-Flores, A. (2015).** The road to metagenomics : From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in genetics*, 6, 348.
- Fang, H., Robin, N., Bhatwa, A., Marko, D. M., & Schertzer, J. D. (2023).** *Microbiota and Nod-like receptors balance inflammation and metabolism during obesity and diabetes. Biomedical Journal*, 46(5), 100610.
- Ferrad, N. (2025).** *Microbiote et pathologies : De l'équilibre à la dysbiose.*
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012).** The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(10), 577-589.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., & Kato, T. (2013).** Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504(7480), 446-450.
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013).** Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1-3.
- Gérard, P., & Bernalier-Donadille, A. (2007).** *The main functions of intestinal microbiota.*
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Lemair, T., Kaufmann, P., & De Paula, J. A. (2012).** World gastroenterology organisation global guidelines : Probiotics and prebiotics october 2011. *Journal of clinical gastroenterology*, 46(6), 468-481.
- Harris, C. (2024).** *Le rôle du microbiote intestinal dans la santé humaine : mécanismes, implications et potentiel thérapeutique.* Public Health Spectrum (Éd. française), 1(1).
- Hassan, E. K., Abdallah, S., Abdelrahman, A. A., Azab, M. M., Gomaa, M. R., & Adel, K. (2024).** Unveiling the Smoking and Obesity Impact on the Orointestinal Axis Microbiome : Pilot study. *Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 8(2), 1-9.

- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001).** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099-1103.
- Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., & Madiraju, C. (2023).** Enzyme-linked immunosorbent assay : Types and applications. *ELISA: methods and protocols*, 1-17.
- Heyman, M. (2010).** Antigènes alimentaires, barrière intestinale et immunité muqueuse. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 45(2), 65-71.
- Hiergeist, A., Gläsner, J., Reischl, U., & Gessner, A. (2015).** Analyses of intestinal microbiota : Culture versus sequencing. *ILAR journal*, 56(2), 228-240.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., & Salminen, S. (2014).** Expert consensus document : The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.
- Honda, K., & Littman, D. R. (2016).** The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535(7610), 75-84.
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012).** Interactions between the microbiota and the immune system. *science*, 336(6086), 1268-1273.
- Jian, C., Luukkonen, P., Yki-Järvinen, H., Salonen, A., & Korpela, K. (2020).** Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PloS one*, 15(1), e0227285.
- Jo, J.-H., Kennedy, E. A., & Kong, H. H. (2016).** Research techniques made simple : Bacterial 16S ribosomal RNA gene sequencing in cutaneous research. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(3), e23-e27.



- Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010).** Polymerase chain reaction : Methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.
- Jouault, H., & Imbert, M. (1995).** La cytométrie en flux : Intérêt et applications en hématologie. *Revue Francaise des Laboratoires*, 1995(275), 29-35.
- Kawai, T., & Akira, S. (2006).** TLR signaling. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 816-825.
- Kawai, T., & Akira, S. (2010).** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity : Update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373-384.
- LAABOUB, K. (2019).** *Le Microbiote Intestinal et Modulation Thérapeutique*.
- Landman, C., & Quévrain, E. (2016).** Le microbiote intestinal : Description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de médecine interne*, 37(6), 418-423.
- Lin, C.-S., Chang, C.-J., Lu, C.-C., Martel, J., Ojcius, D., Ko, Y.-F., Young, J., & Lai, H.-C. (2014).** Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. *Biomedical journal*, 37(5).
- Lorenz, T. C. (2012).** Polymerase chain reaction : Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 63, 3998.
- Magalhães, M. I., Azevedo, M. J., Castro, F., Oliveira, M. J., Costa, Â. M., & Sampaio Maia, B. (2024).** *The link between obesity and the gut microbiota and immune system in early-life*. *Critical Reviews in Microbiology*, 51(2), 264–284.
- Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E., & Perdígón, G. (2019).** Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(2), 115-124.
- Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004).** Prebiotics. *Best practice & research clinical gastroenterology*, 18(2), 287-298.

- McKiel, L. A., Woodhouse, K. A., & Fitzpatrick, L. E. (2020).** The role of Toll-like receptor signaling in the macrophage response to implanted materials. *MRS Communications*, 10(1), 55-68.
- Million, M., Lagier, J.-C., Yahav, D., & Paul, M. (2013).** Gut bacterial microbiota and obesity. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(4), 305-313.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., & Cheroutre, H. (2007).** Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317(5835), 256-260.
- Okumura, R., & Takeda, K. (2017).** Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, 49(5), e338-e338.
- Ortega, M. A. M., & Torres, J. S. S. (2023).** *The Cleveland Clinic: Gastrointestinal symptoms in cancer patients with advanced disease.*
- Paray, B. A., Albeshr, M. F., Jan, A. T., & Rather, I. A. (2020).** Leaky gut and autoimmunity : An intricate balance in individuals health and the diseased state. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9770.
- Pesce, M., Seguella, L., Del Re, A., Lu, J., Palenca, I., Corpetti, C., Rurgo, S., Sanseverino, W., Sarnelli, G., & Esposito, G. (2022).** Next-generation probiotics for inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5466.
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014).** Intestinal epithelial cells : Regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews immunology*, 14(3), 141-153.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., & Yamada, T. (2010).** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 464(7285), 59-65.

- Quévrain, E., & Seksik, P. (2012). Intestinal microbiota : From antibiotic-associated diarrhea to inflammatory bowel diseases. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*, 42(1), 45-51.
- Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*, 35(9), 833-844.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229-241.
- Rambaud, J.-C. (2004). *Flore microbienne intestinale : Physiologie et pathologie digestives*. John Libbey Eurotext.
- Reynolds, L. A., & Bettini, M. (2023). Early-life microbiota–immune homeostasis. *Frontiers in Imm*

# **ANNEXES :**

<b>Pathologies</b>	<b>Observations les plus pertinentes et corrélations potentielles</b>
Maladie de Crohn	Diminution de la diversité du microbiote Réduction de F. Prausnitzii
Rectocolite hémorragique	Diminution de la diversité du microbiote Réduction de A. muciniphila
Syndrome de l'intestin irritable	Augmentation de Dorra et de Ruminococcus
Infection à Clostridium difficile	Forte diminution de la diversité du microbiote Présence de C. difficile
Cancer colorectal	Variation des Bacteroides Augmentation des Fusobacteria
Allergie / Atopie	Diversité altérée Signatures microbiennes spécifiques
Diabète de type 1	Signature microbienne particulière
Diabète de type 2	Signature microbienne particulière
Obésité	Rapport Bacteroidetes / Firmicutes spécifique

**Tableau : Caractéristiques et différences des probiotiques et des prébiotiques (S Vijayaram, S Kannan ., 2018**

probiotique	Prebiotique
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microorganisme vivantes</li> <li>• lutte contre les espèces de bactéries nocives dans l'intestin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• substances non digestibles non vivantes</li> <li>• nourrissent les bacteries de l'intestin</li> </ul>

### **Kit ELISA IVCOMB.CE :**

- microplaques. contenant des peptides spécifiques du VIH et un anticorps monoclonal anti – p24 .
- Contrôle négatif prêt à l'emploi. Il contient du sérum animal négatif pour les anticorps du VIH et pour l'antigène p24.
- Contrôle positif prêt à l'emploi. contient du sérum inactivé Sérum positif aux anticorps anti-VIH 1.
- Contrôle négatif contient du sérum inactivé HIV2 .
- Calibrateur HIV-1 P24 Ag .
- Tampon de lavage concentré (WASHBUF 20X)
- Conjugué n°1 prêt a l'emploi .
- Diluant de conjugué n°1
- Conjugué n° 2 (streptavidine-HRP).
- Substrat chromogène (TMB).
- Solution d'arrêt (acide sulfurique dilué).
- Diluant pour échantillons (DILSPE)

### **Matériel et méthode :**

- Kit ELISA IVCOMB.CE
- Incubateur a 37° .
- Laveuse de microplaques
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre

# HIV Ab&Ag

**Fourth generation Enzyme Immunoassay  
for the determination of antibodies to  
Human Immunodeficiency Virus or HIV  
type 1&2&O and P24 HIV-1 Antigen  
in human serum and plasma**

- for "in vitro" diagnostic use only -



## **DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl**  
Via G. Carducci n° 27  
20099 Sesto San Giovanni  
(Milano) - Italy

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: [info@diapro.it](mailto:info@diapro.it)

REF IVCOMB.CE  
96/192/480/960 Tests

## **Matériel et réactifs utilisés :**

### **Matériel**

- Chamber UV
- Thermocycleur (PCR machine)
- Micropipettes (P10, P20, P200, P1000) et embouts stériles
- Microtubes PCR (0,2 mL)
- Support pour tubes
- Système d'électrophorèse sur gel d'agarose
- Bain-marie ou bloc chauffant (pour dénaturation thermique préalable si nécessaire)
- Transilluminateur UV

### **Réactifs :**

- ADN génomique ou ADN complémentaire (cDNA)
- Master Mix 2X contenant Taq polymérase, tampon,  $MgCl_2$ , dNTPs
- Amorces spécifiques du gène ciblé
- Eau ultrapure stérile sans nucléase ( $H_2O$  PCR grade)
- Gel d'agarose 1,5%
- Tampon TBE pour électrophorèse
- Colorant intercalant (GelRed, bromure d'éthidium)



**Résumé :**

## Résumé

Le microbiote intestinal humain représente un écosystème complexe, indispensable à la santé. Il intervient dans la digestion, la régulation du système immunitaire et la protection contre les agents pathogènes. Un déséquilibre de cette flore, appelé dysbiose, est impliqué dans diverses pathologies, notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les maladies auto-immunes et les troubles métaboliques. Dans ce contexte, l'étude du microbiote est devenue un domaine de recherche prioritaire.

Ce travail a pour objectif d'explorer les caractéristiques histologiques et physiologiques du microbiote intestinale et de mettre en lumière les liens entre cette composante microbienne et la réponse immunitaire, tout en abordant les déséquilibres microbiens associés à certaines pathologies.

L'étude vise également à illustrer l'intérêt des techniques d'analyse immunologique dans le contexte de la dysbiose, malgré les limitations techniques locales.

En l'absence d'outils de séquençage et d'analyse directe du microbiote dans notre région, nous avons eu recours à deux techniques accessibles en laboratoire :

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne), utilisée pour détecter l'expression de certains gènes impliqués dans la réponse immunitaire.

La méthode ELISA, permettant de quantifier des cytokines et marqueurs inflammatoires dans des échantillons biologiques.

Ces méthodes ont été appliquées à titre pratique, sans analyse directe du microbiote, afin de mettre en évidence leur potentiel d'utilisation dans des contextes cliniques liés à la dysbiose.

**Mots-clefs :** microbiote intestinal , dysbiose , immunité , inflammation , tolérance , maladies autoimmunes .

## **Abstract**

The human gut microbiota represents a complex ecosystem essential to health. It plays a key role in digestion, immune system regulation, and protection against pathogens. An imbalance in this microbial community, known as dysbiosis, is associated with various pathologies, including chronic inflammatory bowel diseases, autoimmune disorders, and metabolic syndromes. In this context, studying the gut microbiota has become a major area of scientific research.

The aim of this work is to highlight the relationship between the intestinal microbiota and the immune response, while addressing microbial imbalances associated with certain diseases. It also seeks to demonstrate the value of immunological analysis techniques in the context of dysbiosis, despite local technical limitations.

Due to the lack of sequencing and direct microbiota analysis tools in our region, we focused on two laboratory techniques that were accessible:

- PCR (polymerase chain reaction), used to detect the expression of specific genes involved in immune response.
- The ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) method, used to quantify cytokines and inflammatory markers in biological samples.

These methods were applied for practical purposes only, without direct microbiota analysis, to demonstrate their potential use in clinical contexts related to dysbiosis.

**Keywords:** gut microbiota, dysbiosis, immunity, inflammation, tolerance, autoimmune diseases.

## الملخص

يُعدّ الميكروبيوتا المعوي لدى الإنسان نظاماً بيئياً معقداً، وله دور أساسي في الحفاظ على الصحة. يساهم في عمليات الهضم، وتنظيم الجهاز المناعي، والحماية ضد العوامل الممرضة. وقد ثبت أن اختلال هذا التوازن الميكروبي، المعروف باسم الخلل الميكروبي (الديسبيوز)، يرتبط بعدة أمراض، منها الأمراض الالتهابية المزمنة للأمعاء، وأمراض المناعة الذاتية، واضطرابات التمثيل الغذائي. وفي هذا السياق، أصبحت دراسة الميكروبيوتا المعوية من المجالات البحثية ذات الأولوية.

يهدف هذا العمل إلى تسليط الضوء على العلاقة بين الميكروبيوتا المعوية والاستجابة المناعية، مع التطرق إلى حالات الاختلال الميكروبي المرتبطة ببعض الأمراض. كما يسعى إلى إبراز أهمية استخدام تقنيات التحليل المناعي في سياق دراسة الخلل الميكروبي، رغم القيود التقنية المحلية.

نظراً لغياب أدوات التسلسل الجيني وتحليل الميكروبيوتا المباشر في منطقتنا، تم الاعتماد على تقنيتين متوفرتين في المختبر:

- تقنية PCR تفاعل البوليميراز المتسلسل، التي تُستخدم للكشف عن تعبير بعض الجينات المتعلقة بالاستجابة المناعية.
- تقنية ELISA الاختبار المناعي المرتبط بالأنزيم، التي تسمح بقياس السيتوكينات والعلامات الالتهابية في العينات البيولوجية.

تم تطبيق هاتين التقنيتين لأغراض عملية فقط، دون تحليل مباشر للميكروبيوتا، وذلك من أجل إبراز إمكانية استخدامهما في السياقات السريرية المرتبطة بالخلل الميكروبي.

**الكلمات المفتاحية:** الميكروبيوتا المعوية، اختلال التوازن الميكروبي (الديسبيوز)، المناعة، الالتهاب، التحمل المناعي، أمراض المناعة الذاتية.

<b>Année universitaire : 2024-2025</b>	<b>Présenté par : Fatmi Abdeldjallil</b>
Interprétation immunologique du microbiote intestinal: pistes théorique et methodologique	
<b>Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Immunologie moléculaire et cellulaire</b>	
<p style="text-align: center;"><b>Résumé</b></p> <p>Le microbiote intestinal humain constitue un écosystème complexe et essentiel à la santé, impliqué dans la digestion, la régulation immunitaire et la protection contre les agents pathogènes. Un déséquilibre de cette flore, appelé dysbiose, est désormais reconnu comme un facteur clé dans l'apparition de nombreuses pathologies, notamment les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les maladies auto-immunes et les troubles métaboliques.</p> <p>L'objectif principal de ce mémoire est d'explorer le rôle immunologique du microbiote intestinal, en mettant en évidence ses mécanismes de modulation du système immunitaire et les déséquilibres associés à certaines pathologies. Ce travail vise également à souligner l'intérêt de certaines techniques immunologiques dans l'étude indirecte du microbiote, notamment dans des contextes où les outils de séquençage font défaut. À titre illustratif, deux méthodes accessibles ont été utilisées :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ La PCR (réaction de polymérase en chaîne), pour analyser des gènes liés à l'immunité.</li><li>▪ La méthode ELISA, pour doser des cytokines et marqueurs inflammatoires dans des échantillons biologiques.</li></ul> <p>Ces approches ont permis d'envisager des pistes d'évaluation indirecte de l'état du microbiote intestinal dans un cadre de recherche appliquée.</p>	
<b>Mots-clefs :</b> microbiote intestinal , dysbiose , immunité , inflammation , tolérance , maladies autoimmunes	
<b>Laboratoires de recherche :</b> laboratoire de d'hémobiologie et laboratoire de sérologie Centre Hopitale-Universitaire de Constantine	
<b>Président du jury :</b> Mme CHAIB Aouatef (MCB-Université des Frères Mentouri, Constantine 1)	
<b>Encadrant :</b> Mme AGGOUN Cherifa (MCB-Université des Frères Mentouri, Constantine 1)	
<b>Examineur(s) :</b> Mme MECHATI Chahinez (MAA-Université des Frères Mentouri, Constantine 1)	