



UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT

MASTER 2 BIOLOGIE-INFORMATIQUE /
BIOINFORMATIQUE (BiB)

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2016-2017

Projet de recherche ANR

MISE EN ÉVIDENCE DE L'IMPLICATION DU
MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA PHASE DE
CRISE DU SYNDROME DE L'INTESTIN
IRRITABLE

Auteur :
Florence JORNOD

Numéro étudiant :
21104855

12 décembre 2016

Table des matières

1	Contexte, positionnement et objectif(s) de la proposition	4
1.1	Objectifs et hypothèses scientifiques	4
	Généralités	4
	Description du syndrome	4
	Objectif du projet	5
1.2	Originalité et pertinence par rapport à l'état de l'art	5
1.3	Méthodologie et gestion des risques	6
	Méthodologie	6
	Justification de l'organisme utilisé	7
	Verrous techniques	7
2	Organisation du projet et moyens mis en œuvre	7
2.1	Consortium et coordinateur scientifique	7
2.2	Moyens mis en œuvre pour atteindre les objectifs	7
	Objectif 1	7
	Objectif 2	8
2.3	Planning prévisionnel	9
3	Impact et retombé du projet	9
4	Budget	10
4.1	Cout total	10
4.2	financement demandé	10
	Références	11

Résumé

Le syndrome de l'intestin irritable (en anglais irritable bowel disease IBS) touche 10% de la population mondiale. Il se caractérise par des phases de crises et des phases asymptomatiques. Ces phases de crises se caractérisent par des problèmes gastriques, principalement une modification du rythme et de la consistance des selles. À ce jour la cause de la crise n'est pas connue. Les études précédentes tendent à montrer le rôle du microbiote au niveau du syndrome. Dans notre cas nous nous intéresserons à l'implication du microbiote dans la phase de crise. Pour cela nous ferons dans un premier temps une étude métagénomique sur le microbiote intestinal de 90 patients prélevé à différentes phases de la maladie. Nous espérons ainsi caractériser qualitativement et quantitativement les souches des bactéries présentes dans le microbiote. Dans un deuxième temps nous conforterons ces résultats avec une étude sur les rats. Nous grefferons du microbiote de patients en phase asymptomatique sur ces rats afin de voir si l'on peut, à partir de la phase asymptomatique, obtenir une phase de crise qui nous permettrait alors de confirmer l'implication du microbiote.

1 Contexte, positionnement et objectif(s) de la proposition

1.1 Objectifs et hypothèses scientifiques

Généralités De nos jours, de plus en plus de gens sont touchés par des maladies intestinales [9]. Dans le cadre de ce projet nous nous intéresserons au syndrome de l'intestin irritable (IBS de l'anglais : irritable bowel syndrom). Ce syndrome touche 11% de la population mondiale [3] et 5% de la population française[6], et, même si il n'est pas mortel[4], impacte énormément les conditions de vie des malades[8].

Description du syndrome Cette maladie chronique se caractérise par une alternance de phases de crises symptomatiques et de phases asymptomatiques. Les phases de crises se caractérisent par des douleurs abdominales récidivantes, comme par exemple des crampes intestinales, des ballonnements et ou des flatulences à cela s'ajoute une modification du rythme et de la consistance des selles. Ces modifications peuvent consister en une accélération du transit (diarrhées), un ralentissement (constipation) ou une alternance de ces deux modifications [3].

À ces symptômes digestifs peuvent s'ajouter nausées, maux de tête, douleurs musculaires, fatigue, irritabilité, symptômes urinaires ou encore symptômes dépressifs [17] [7]. La diversité de symptômes rend de l'identification difficile[13].

Il existe plusieurs formes de ce syndrome : IBS-D (diarrhea), IBS-C (constipation), IBS-M (mixed). [10].

À ce jour, la cause précise des crises du IBS est inconnue. Pendant longtemps on a attribué au syndrome des origines psycho-somatique, mais son origine organique est maintenant reconnue. Une origine génétique du syndrome a pendant un temps été évoquée [16]. En effet certains patients observaient une mutation du gène SCN5A [1]. Le stress a aussi été évoqué, notamment dans le cas de maltraitance durant l'enfance [15]. De récentes études tendent à montrer une responsabilité d'un déséquilibre du microbiote intestinal [14], c'est-à-dire de l'ensemble des micro-organismes, principalement des bactéries, présents dans l'intestin. Il a été

en effet constaté que les patients atteints du IBS présentaient une différence avec les témoins négatifs bien que les études ne soient pas unanimes quand à l'identification de cette différence [2]. Des études ont essayé de traiter le IBS avec des probiotiques, mais les résultats n'ont pas été concluants. De même l'utilisation d'antibiotiques telle la rifaximine n'a pas montré de réels résultats[12].

Objectif du projet Le premier objectif de ce projet est de mettre en évidence la cause du déclenchement de la phase de crise de l'IBS. En effet, sans forcément éliminer la maladie, empêcher les crises seraient une grande avancée pour le bien-être des patients et aucune étude n'a encore abordé le problème sous cet angle.

Le second objectif sera de confirmer les résultats obtenus pendant la première étape et, dans le meilleur des cas, obtenir une piste thérapeutique d'empêcher ou espacer les crises, ou voire même soigner définitivement le patient.

1.2 Originalité et pertinence par rapport à l'état de l'art

originalité du projet Les précédentes études se centrent sur une comparaison entre malades et témoins sans prendre en compte la notion de crises présente dans la maladie. De plus les précédentes études ne différencient pas forcément la forme du syndrome étudié. Pourtant on pourrait s'attendre à ce que le IBS-D et le IBS-C ne se comportent pas de la même manière et donc que cela ne soit pas les mêmes bactéries impliquées.

Notre étude va donc comparer chez un même patient l'évolution de son microbiote intestinal entre les phases de crises et les phases asymptomatiques. Avec cette comparaison nous espérons trouver une différence entre les phases symptomatiques et asymptomatique. Les hypothèses résultant de la première étape seront ensuite mises à l'épreuve par une phase de tests effectuée sur le rat. En fonction des résultats, nous pourrions essayer de soigner les rats par une greffe de microbiote intestinale. Il a en effet été montré que cette approche avait un bon potentiel dans les maladies gastro-intestinales [11].

1.3 Méthodologie et gestion des risques

Méthodologie Pour répondre au premier objectif nous allons monter une cohorte de 30 patients en essayant au mieux d'avoir un équilibre entre les différents types de syndromes. L'idéal serait d'avoir 10 patients de chaque type. Nous aurons aussi 10 témoins négatifs non malade. Nous réaliserons des échantillons de microbiote intestinal pour chaque patient en cas de crise et de non crise. Dans le cas de l'IBS-M on échantillonnera les différentes crises. Nous espérons ainsi mettre en évidence les souches de bactéries responsables de la maladie, ou spécifiques au moment de la crise. Les différences possibles peuvent être de différents types.

- Cas 1 : On observe une différence entre sain et phase de non crise. Puis on observe une prolifération des bactéries spécifiques à la phase asymptomatique dans la crise.
- Cas 2 : On observe une différence entre sain et phase de non crise. Puis on observe une apparition de nouvelles bactéries spécifiques à la crise.
- Cas 3 : On n'observe pas de différence entre sain et phase de non crise. Puis on observe une apparition de nouvelles bactéries spécifiques à la crise.
- Cas 4 : On observe une différence entre sain et phase asymptomatique, mais on n'observe pas de différences entre les deux phases.

Pour répondre au deuxième objectif nous nous baserons sur une étude sur les rats qui a montré qu'il était possible de leur transmettre les symptômes de la maladie[5]. Nous allons donc effectuer des greffes de microbiote intestinal malade en phase de non crise sur ces rats afin de voir si ce microbiote est capable de déclencher une crise. Nous aurons trois types de témoins, les rats non greffés, les rats greffés avec un microbiote sain afin de vérifier que la greffe ne déclenche pas les symptômes et une greffe de microbiote en phase de crise afin de vérifier que la crise est bien transmise.

Dans le cas où l'on arrive à déclencher la crise avec le microbiote en phase asymptomatique on greffera un microbiote sain afin de voir si l'on arrive à soigner le rat.

Justification de l'organisme utilisé La deuxième partie de notre étude utilisera le rat comme organisme. Nous ne savons pas avec certitude si l'organisme du rat se comporte de la même façon que celui de l'humain. Cependant l'étude sur laquelle on se base montre qu'il est possible de mimer les symptômes de l'IBS en greffant un microbiote intestinal chez les rats. Cela nous laisse penser qu'on pourra de la même façon vérifier si une greffe peut entraîner un arrêt des symptômes.

Verrous techniques La principale difficulté sera d'avoir une cohorte représentative pour effectuer notre étude. Une liste d'aliment interdit sera donné aux patients fin de limiter le biais d'un dérèglement intestinal provoqué par l'alimentation. Ce point est assez délicat car il est assez difficile de surveiller l'alimentation d'une personne sans la garder en observation. Cependant on sait que l'alimentation influe sur le microbiote. Faire adopter aux patients une alimentation similaire permettraient ainsi d'être plus sûr que les variations du microbiote seront liées à la maladie.

2 Organisation du projet et moyens mis en œuvre

2.1 Consortium et coordinateur scientifique

Cette étude sera sous la direction d'un médecin chercheur spécialisé dans le SII. Son équipe sera composé d'experimentateurs et de bioanalystes. Son laboratoire aura une animalerie.

Il aura comme partenaire un laboratoire spécialisé dans les études métagénomiques. L'analyse des données métagénomiques récoltées lors de la première partie de l'étude pourra être réalisé par un stagiaire de 6 mois de master 2 de biologie informatique.

2.2 Moyens mis en œuvre pour atteindre les objectifs

Objectif 1 Pour atteindre le premier objectif, nous allons mettre en place une cohorte de patient atteint d'IBS. Nous allons essayé au mieux d'avoir dix patients pour chaque type de syndrome et que ces patients présentent les mêmes symptômes annexes (douleur abdominale).

Nous aurons aussi 10 témoins négatifs. Nous auront 40 personnes à prélever. Nous effectuerons 6 prélèvements pour les IBS-C et IBS-D, 3 en phase de crise et 3 en phase de non crise. Pour le IBS-M nous effectuerons 9 prélèvements 3 en phase de non crise et 3 pour chaque type de crise. Les témoins négatifs seront prélevés 3 fois à intervalle régulier. Ces prélèvements et l'extraction du microbiote à partir de matières fécales sera effectuée par deux bioanalystes. Tous les prélèvements fécaux seront analysés par une étude métagénomique où l'on séquencera à haut débit le microbiote intestinal et on l'analysera bioinformatiquement afin d'identifier et de quantifier les souches y étant présentes. Cette analyse sera faite par un stagiaire encadré par un ingénieur d'étude.

Objectif 2 Pour atteindre le deuxième objectif nous ferons notre étude chez le rat. Nous prendrons 10 rats par cas afin d'avoir des résultats analysables, concluant statistiquement. Nous aurons donc :

- 10 rats sain
- 10 rats recevant une greffe de patient sain
- 10 rats recevant une greffe de patient IBS-C non crise
- 10 rats recevant une greffe de patient IBS-C crise
- 10 rats recevant une greffe de patient IBS-D non crise
- 10 rats recevant une greffe de patient IBS-D crise
- 10 rats recevant une greffe de patient IBS-M non crise
- et 20 rats recevant une greffe de patient IBS-M crise (10 par type de crise)

Ce qui porte le nombre de rats nécessaire à notre étude à 90.

Cette étude sera effectuée par deux ingénieurs d'étude et quatre expérimentateurs sous la direction du directeur de recherche.

Cette analyse sera reproduite une deuxième fois afin de confirmer ces premiers résultats.

Dans les cas où la maladie aura été transmise à partir de la phase asymptomatique, nous effectuerons sur la moitié des rats une greffe de patient sain afin de vérifier si nous obtenons une guérison. Si c'est le cas, cela nous indiquera qu'une greffe de microbiote intestinal pourrait avoir un effet positif chez les patients atteints d'IBS.

2.3 Planning prévisionnel

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cohorte												
Prélèvement+séquençage												
Analyse												
Résultats + publication												
Etude sur le rat												
Analyse												
Résultats et publication												

TABLE 1 – Planning prévisionnel des étapes de l'étude au cours des différents trimestres

3 Impact et retombé du projet

Ce projet permettra une avancée en médecine. Dans le meilleur des cas on pourra espérer améliorer directement le bien-être des patients. On pourra aussi espérer mettre en évidence l'implication du microbiote intestinale dans l'apparition de la phase de crise du syndrome de l'intestin irritable.

Nous pouvons imaginer valoriser ce travail en publiant deux articles. Le premier portera sur la la différence entre les phases asymptomatique et symptomatique en fonction des différents types de syndrome. Le deuxième portera sur le résultat de l'étude de la transplantation chez le rat.

Nous pouvons aussi envisager de présenter les travaux lors d'une conférence sur les maladies intestinales.

4 Budget

4.1 Cout total

Type de personnel	Nombre d'intervenant	Cout annuel par personne	cout total
Directeur de recherche (coordinateur)	1	100 000	300 000
Ingénieur d'étude	3	75 000	700 000
Stagiaire	1	500	3 000
Expérimentateur	4	50 000	300 000
Bioanalyste	2	50 000	150 000
Total			1 453 000

TABLE 2 – Tableau récapitulatif des coûts en euros envisagés pour la gestion du personnel intervenant dans le projet pour une durée de trois ans.

Equipements et fonctionnements	cout en euros
sequençage haut débit	200 000
Rats (achat et élevage)	30 000
Frais de mission	20 000
Petit matériel, consommables	20 000
Total	270 000

4.2 financement demandé

Pour les besoins de notre études nous aurons donc besoin de 1 723 000 euros. Les salaires des collaborateurs sont payés par les deux laboratoires. Nous demandons donc un financement de 273 000 euros pour pouvoir réaliser notre étude.

Références

- [1] A. Beyder, A. Mazzone, P. R. Strege, D. J. Tester, Y. A. Saito, C. E. Bernard, F. T. Enders, W. E. Ek, P. T. Schmidt, A. Dlugosz, et al. Loss-of-function of the voltage-gated sodium channel *Na_v 1.5* (channelopathies) in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 146(7) :1659–1668, 2014.
- [2] Y. Bhattarai, D. A. M. Pedrego, and P. C. Kashyap. Irritable bowel syndrome : A gut microbiota-related disorder ? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, pages ajpgi–00338, 2016.
- [3] C. Canavan, J. West, and T. R. Card. The epidemiology of irritable bowel syndrome. *Clinical epidemiology*, 6 :71–80, 2014.
- [4] J. Y. Chang, G. R. Locke, M. A. McNally, S. L. Halder, C. D. Schleck, A. R. Zinsmeister, and N. J. Talley. Impact of functional gastrointestinal disorders on survival in the community. *The American journal of gastroenterology*, 105(4) :822–832, 2010.
- [5] L. Crouzet, E. Gaultier, C. Del'Homme, C. Cartier, E. Delmas, M. Dapoigny, J. Fioramonti, and A. Bernalier-Donadille. The hypersensitivity to colonic distension of ibs patients can be transferred to rats through their fecal microbiota. *Neurogastroenterology & Motility*, 25(4) :e272–e282, 2013.
- [6] M. Dapoigny, J. Bellanger, B. Bonaz, S. B. des Varannes, L. Bueno, B. Coffin, P. Ducrotté, B. Flourié, M. Lémann, A. Lepicard, et al. Irritable bowel syndrome in france : a common, debilitating and costly disorder. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 16(10) :995–1001, 2004.
- [7] M. A. Daulatzai. Chronic functional bowel syndrome enhances gut-brain axis dysfunction, neuroinflammation, cognitive impairment, and vulnerability to dementia. *Neurochemical research*, 39(4) :624–644, 2014.
- [8] B. B. Dean, D. Aguilar, V. Barghout, K. H. Kahler, F. Frech, D. Groves, and J. J. Ofman. Impairment in work productivity and health-related quality of life in patients with ibs. *The American journal of managed care*, 11(1 Suppl) :S17–26, 2005.

- [9] G. Enders. *Le charme discret de l'intestin : tout sur un organe mal aimé*. Éditions Actes Sud, 2015.
- [10] G. F. Longstreth, W. G. Thompson, W. D. Chey, L. A. Houghton, F. Mearin, and R. C. Spiller. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*, 130(5) :1480–1491, 2006.
- [11] J. L. McCarville, A. Caminero, and E. F. Verdu. Novel perspectives on therapeutic modulation of the gut microbiota. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, page 1756283X16637819, 2016.
- [12] S. B. Menees, M. Maneerattannaporn, H. M. Kim, and W. D. Chey. The efficacy and safety of rifaximin for the irritable bowel syndrome : a systematic review and meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*, 107(1) :28–35, 2012.
- [13] H. Miwa. Prevalence of irritable bowel syndrome in japan : Internet survey using rome iii criteria. *Patient preference and adherence*, 2 :143, 2008.
- [14] E. M. Quigley. Bacterial flora in irritable bowel syndrome : role in pathophysiology, implications for management. *Journal of digestive diseases*, 8(1) :2–7, 2007.
- [15] C. A. Ross. Childhood sexual abuse and psychosomatic symptoms in irritable bowel syndrome. *Journal of child sexual abuse*, 14(1) :27–38, 2005.
- [16] R. Waehrens, H. Ohlsson, J. Sundquist, K. Sundquist, and B. Zöller. Risk of irritable bowel syndrome in first-degree, second-degree and thirddegree relatives of affected individuals : a nationwide family study in sweden. *Gut*, pages gutjnl–2013, 2014.
- [17] W. E. Whitehead, O. Palsson, and K. R. Jones. Systematic review of the comorbidity of irritable bowel syndrome with other disorders : what are the causes and implications ? *Gastroenterology*, 122(4) :1140–1156, 2002.