



HAL
open science

Impact de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal chez l'enfant atteint de mucoviscidose

Raphaël Enaud

► **To cite this version:**

Raphaël Enaud. Impact de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal chez l'enfant atteint de mucoviscidose. Human health and pathology. 2016. dumas-01583360

HAL Id: dumas-01583360

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01583360>

Submitted on 7 Sep 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE BORDEAUX
U.F.R DES SCIENCES MEDICALES**

Année 2016

Thèse n° 3173

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et publiquement soutenue par

Raphaël ENAUD

Né le 8 mai 1988, à Nîmes (30)

Le Vendredi 4 Novembre 2016
A L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

**IMPACT DE L'ANTIBIOTHERAPIE INTRA VEINEUSE
SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL CHEZ L'ENFANT
ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE**

Directeur de thèse : Pr Thierry LAMIREAU

Composition du Jury :

Professeur Thierry SCHAEVERBEKE	Président du Jury
Professeur Laurence DELHAES	Rapporteur
Professeur David LAHARIE	Membre
Docteur Haude CLOUZEAU	Membre
Professeur Thierry LAMIREAU	Directeur de thèse

A ma mère,

A mon père,

A mes frères.

RESUME

Le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière. Une perturbation de son équilibre – appelée dysbiose – est impliquée dans la physiopathologie de certaines maladies, et notamment dans l'évolution de la mucoviscidose, première maladie génétique pédiatrique. Parmi les organes atteints dans cette maladie, l'intestin est le siège d'une inflammation intestinale chronique de bas grade et de perturbations du microbiote. L'étude de la flore intestinale dans la mucoviscidose met en évidence une dysbiose caractérisée notamment par une diminution de la diversité et une augmentation de l'abondance bactérienne. Il a été montré que les anomalies du microbiote intestinal apparaissent progressivement au cours des premiers mois de vie chez l'enfant atteint de mucoviscidose. Ces perturbations pourraient être influencées par différents facteurs environnementaux, notamment le recours à des antibiothérapies répétées, prescrites pour exacerbations pulmonaires.

L'objectif principal de ce travail était d'étudier l'évolution du microbiote intestinal après une cure d'antibiothérapie intraveineuse chez l'enfant atteint de mucoviscidose.

Vingt et un patients, atteints de mucoviscidose et suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) de l'Hôpital des Enfants de Bordeaux, ont été inclus et suivis pendant 3 mois. Sept d'entre eux ont reçu une cure ATB IV pendant 15 jours et 14 patients étaient dans le groupe contrôle. Une étude du microbiote intestinal par séquençage haut débit et de l'inflammation digestive par le dosage de la calprotectine fécale a été effectuée et répétée durant le suivi des participants.

L'impact des cures d'ATB IV sur le microbiote intestinal semblait être modéré. Sa composition variait après une cure d'ATB IV, puisque 60,7 % des bactéries présentes initialement étaient retrouvées 3 mois après la cure chez un même patient. Pour autant nous n'avons pas pu mettre en évidence de nœud taxonomique sous ou surreprésenté en post antibiothérapie. Une inflammation intestinale était présente chez 71% des patients et semblait être corrélée à une surreprésentation de *Streptococcus* (ratio = 2,50, p-value = 0,042) chez les patients ayant une calprotectine fécale supérieure à 250 µg/g. Ces résultats peuvent encourager la mise en place d'une étude interventionnelle évaluant l'efficacité de cures courtes d'antibiothérapie orale pour traiter l'inflammation intestinale. Enfin, la présence de diarrhée semblait être inversement corrélée à la présence d'inflammation

intestinale, suggérant que ce symptôme puisse être un mécanisme régulant la pullulation bactérienne, afin de prévenir l'inflammation intestinale.

Cette étude préliminaire retrouve un impact limité de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal mais semble conforter le lien entre la dysbiose et l'inflammation intestinale.

Titre en anglais : Impact of intravenous antibiotics on the gut microbiota in children with cystic fibrosis.

Discipline : Pédiatrie.

Mots-clés : Microbiote intestinal, Dysbiose, Mucoviscidose, Antibiothérapie intraveineuse, Calprotectine fécale, Inflammation digestive, Streptococcus.

Université de Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **ADN** : acide désoxyribonucléique
- **AMP** : adénosine monophosphate
- **ARN** : acide ribonucléique
- **ARN_m** : acide ribonucléique messenger
- **ARN_r** : acide ribonucléique ribosomique
- **ARN_r 16S** : constituant ARN de la sous-unité ribosomale du 30S des procaryotes
- **ATB** : antibiotique
- **ATB IV** : antibiotique intraveineux
- **CFTR** : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
- **dNTP** : désoxyribonucléotides
- **ELISA** : méthode immuno-enzymatique (de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay)
- **DeltaF508** : Mutation la plus fréquente dans la mucoviscidose, qui désigne la délétion de l'acide aminé phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR
- **MALDI-TOF MS** : Méthode de spectrométrie de masse, de l'anglais Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry
- **NaOH** : hydroxyde de sodium
- **PAI** : phosphatase alcaline intestinale
- **PAMPs** : motifs moléculaires associé aux pathogènes (de l'anglais Pathogen-associated Molecular Pattern)
- **pb** : paires de bases
- **PCR** : réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais polymerase chain reaction)
- **PLS-DA** : de l'anglais Partial Least Squares Discriminant Analysis
- **S** : Le Svedberg, de symbole S, est une unité de mesure du taux de sédimentation

TABLE DES MATIERES

RESUME	3
LISTE DES ABREVIATIONS	5
TABLE DES MATIERES	6
TABLE DES ANNEXES	8
1. GENERALITES SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL.....	9
1.1. DEFINITION ET FONCTIONS DU MICROBIOTE INTESTINAL	9
1.2. INSTALLATION DU MICROBIOTE INTESTINAL.....	9
1.3. DESCRIPTION DU MICROBIOTE CHEZ LE SUJET SAIN	10
1.4. DYSBIOSE ET PATHOLOGIES	11
1.5. ETUDE DU MICROBIOTE INTESTINAL	12
2. MUCOVISCIDOSE	14
2.1. DEFINITIONS ET PHYSIOPATHOLOGIE	14
2.2. ATTEINTE RESPIRATOIRE ET ANTIBIOTHERAPIE DANS LA MUCOVISCIDOSE	15
2.3. ATTEINTES DIGESTIVES DE LA MUCOVISCIDOSE.....	15
2.3.1. Atteinte pancréatique.....	15
2.3.2. Altération du mucus intestinal.....	15
2.3.3. Inflammation digestive.....	16
2.3.4. Dysbiose intestinale	17
2.3.4.1. Caractérisation de la dysbiose retrouvée dans la mucoviscidose	17
2.3.4.2. Physiopathologie de la dysbiose.....	17
2.3.4.3. Conséquences de la dysbiose.....	19
2.3.4.3.1. Nutritionnelles.....	19
2.3.4.3.2. Inflammatoires	19
2.3.4.3.3. Hépatiques.....	19
2.3.4.3.4. Sur les symptômes digestifs	20
2.3.4.3.5. Sur le microbiote respiratoire	20
2.3.4.4. Probiotiques et mucoviscidose	21
3. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	21

4. MATERIEL ET METHODE	22
4.1. INCLUSIONS DES PATIENTS.....	22
4.2. SCHEMA DE L'ETUDE	22
4.3. ANTIBIOTHERAPIE	24
4.4. QUESTIONNAIRE	24
4.5. ANALYSES DU PRELEVEMENT DE SELLES	25
4.5.1. Coproculture quantitative	25
4.5.2. Calprotectine fécale.....	26
4.5.3. Séquençage haut débit.....	27
4.5.4. Gestion des données et analyse statistique	30
5. RESULTATS	31
5.1. DESCRIPTION DE LA COHORTE	31
5.2. DEROULEMENT DU SEQUENÇAGE.....	34
5.3. COMPARAISON DU MICROBIOTE INTESTINAL A J0 ENTRE LES GROUPES « ATB IV » ET « SANS ATB IV »	35
5.4. EVOLUTION DU MICROBIOTE DANS LES GROUPES « ATB IV » ET « SANS ATB IV » ENTRE J0 ET J90	36
5.5. RESULTATS DE LA CALPROTECTINE FECALE	39
5.6. INFLAMMATION DIGESTIVE ET MICROBIOTE INTESTINAL	41
5.7. ETUDE DE LA CORRELATION ENTRE L'INFLAMMATION INTESTINALE ET LES SYMPTOMES DIGESTIFS OU LA QUALITE DE VIE.....	42
5.8. ETUDE DE LA CORRELATION ENTRE LE MICROBIOTE INTESTINAL ET LES SYMPTOMES DIGESTIFS OU LA QUALITE DE VIE.....	42
5.9. INFLAMMATION DIGESTIVE ET RESULTATS DE LA COPROCULTURE	42
6. DISCUSSION.....	44
7. CONCLUSION.....	48
8. BIBLIOGRAPHIE	49
9. ANNEXES.....	53
10. LE SERMENT D'HIPPOCRATE	78

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : CONSIGNES DE RECUEIL DE SELLES.....	53
ANNEXE 2 : CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURES UTILISES POUR LA COPROCULTURE QUANTITATIVE	54
ANNEXE 3 : PROTOCOLE D'EXTRACTION	57
ANNEXE 4 : PROTOCOLE DE LA PCR DE LA REGION HYPERVARIABLE V4 DU GENE DE L'ARNR 16S	58
ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE LA PCR DE MULTIPLEXAGE.....	58
ANNEXE 6 : TECHNIQUE DE SEQUENÇAGE PAR TERMINATEURS REVERSIBLES UTILISEE PAR ILLUMINA@.....	60
ANNEXE 7 : ECHANTILLONS SEQUENCES AVEC SUCCES POUR CHAQUE PATIENT	61
ANNEXE 8 : COMPARAISON DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL ENTRE J0 ET J45 DANS LE GROUPE « ATB IV ».....	62
ANNEXE 9 : COMPARAISON DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL ENTRE J45 ET J90 DANS LE GROUPE « ATB IV ».....	62
ANNEXE 10 : COMPARAISON DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL ENTRE J0 ET J90 DANS LE GROUPE « ATB IV ».....	62
ANNEXE 11 : COMPARAISON DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL ENTRE J0 ET J90 DANS LE GROUPE « SANS ATB IV »	62
ANNEXE 12 : COMPARAISON DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL ENTRE LES PATIENTS AVEC UNE INFLAMMATION INTESTINALE (CALPROTECTINE $\geq 100 \mu\text{G/G}$) ET CEUX SANS INFLAMMATION INTESTINALE (CALPROTECTINE $< 100 \mu\text{G/G}$)	63
ANNEXE 13 : COMPARAISON DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE INTESTINAL ENTRE LES PRELEVEMENTS ASSOCIES A UNE DIARRHEE ET NON ASSOCIES A UNE DIARRHEE	64
ANNEXE 14 : QUESTIONNAIRE DONNE AUX PATIENTS.....	66

1. Généralités sur le microbiote intestinal

1.1. Définition et fonctions du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est un écosystème complexe qui désigne l'ensemble des micro-organismes résidant dans notre tube digestif, à savoir des bactéries, des archées, des champignons ou encore des virus¹. Nous nous limiterons, dans cette étude, à l'analyse du microbiote bactérien, le mieux caractérisé actuellement.

Le microbiote intestinal est maintenant considéré comme un organe à part entière. De nombreuses fonctions, indispensables à notre homéostasie, lui sont attribuées : des rôles métaboliques comme la fermentation des sucres et des protéines, la maturation de notre système immunitaire, un rôle de barrière vis-à-vis des agents pathogènes, le métabolisme de xénobiotiques ou encore la communication entre notre tube digestif et notre système nerveux central¹⁻³.

1.2. Installation du microbiote intestinal

L'installation du microbiote intestinal débute à la naissance, dès la rupture des membranes fœtales. Le tube digestif du nouveau-né, jusqu'alors considéré comme stérile, va rapidement être colonisé par des bactéries aérobies puis anaérobies provenant du microbiote maternel et de l'environnement⁴. Ainsi, le mode d'accouchement et le type d'alimentation vont influencer l'installation et la composition de la flore intestinale dès les premiers jours de vie. D'autres facteurs vont aussi intervenir tel que le terrain génétique de l'hôte, la présence d'autres micro-organismes ou les propriétés physicochimiques du mucus intestinal (les substrats disponibles, le pH, les acides biliaires ou la pression partielle en oxygène)⁴.

A partir de 3 ans, le microbiote intestinal se rapproche de celui de l'adulte (Figure 1) avec une composition unique, propre à chaque individu^{4,5}. Ensuite, bien que sa composition continue de se complexifier avec l'avancée en âge, les variations au cours du temps apparaissent très réduites. Cependant, tout au long de la vie, de nombreux facteurs tel que les infections, l'alimentation, l'inflammation ou encore les traitements (probiotiques ou antibiotiques) vont moduler, voire perturber, l'équilibre du microbiote intestinal⁶. La notion de résilience définit la capacité du microbiote à récupérer sa composition initiale après un stress. Elle reste néanmoins mal comprise et semble dépendre de facteurs de l'hôte, des caractéristiques propres à chaque espèce et très probablement de l'intensité de la perturbation (et donc d'une notion de seuil d'irréversibilité).

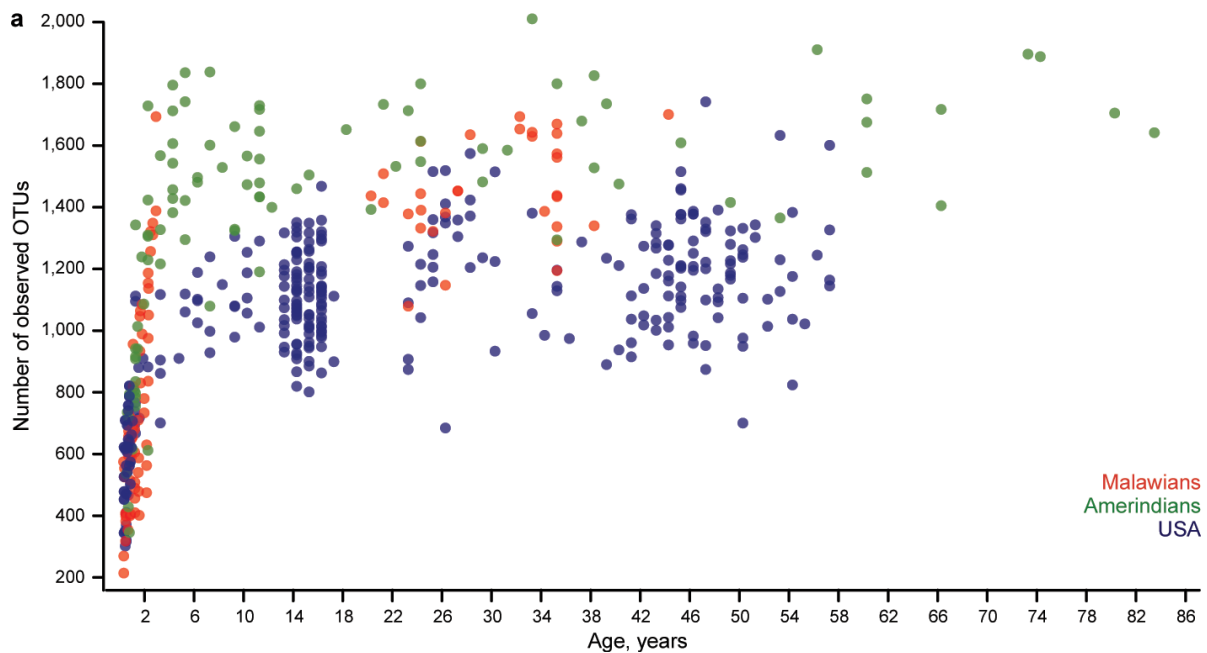


Figure 1 : Augmentation de la diversité bactérienne avec l'âge et selon l'origine géographique, selon Yatsunenko *et al.* ⁵

OTU : Operational Taxonomic Unit

1.3. Description du microbiote chez le sujet sain

Il est composé de 10^{13} bactéries⁷, c'est-à-dire autant que le nombre de cellules eucaryotes dans le corps humain. Chaque individu renferme dans son tube digestif près de 200 espèces différentes⁸, parmi le millier d'espèces qui ont pu être identifiées, formant alors un patrimoine génétique de plus de 5 millions de gènes bactériens (100 fois plus important que le génome humain) impliqués dans les nombreuses fonctions du microbiote intestinal.

La composition du microbiote intestinal, en termes d'espèces, est propre à chacun, mais sa composition au niveau des phyla reste très conservée d'un individu à un autre, permettant de maintenir des propriétés fonctionnelles très proches, définissant ainsi la notion de « noyau fonctionnel ». Chez l'Homme, les 2 phyla dominants sont les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, qui représentent respectivement 50 à 60 % et 30 à 40 % du microbiote^{1,9} (Figure 2). Les deux autres phyla représentés sont les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria*¹.

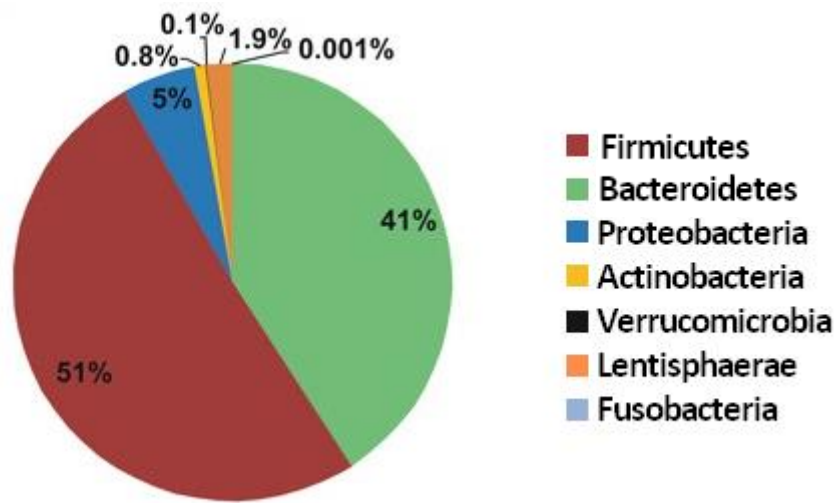


Figure 2 : Composition du microbiote intestinal chez un adulte sain
Répartition des bactéries selon les principaux phyla, d'après Claesson et al. ⁹

1.4. Dysbiose et pathologies

Les nombreuses fonctions associées au microbiote intestinal font que tout déséquilibre¹⁰ — appelé dysbiose (Figure 3) — peut être à l'origine du développement de pathologies. Par exemple, certaines études ont relié la naissance par césarienne ou une naissance prématurée — responsables d'un retard d'établissement du microbiote anaérobie — à un risque accru de développer une allergie^{11,12} ou d'être obèse¹³. Un déséquilibre entre les bactéries pro-inflammatoires (augmentées) et anti-inflammatoires (diminuées, comme le *Faecalibacterium prausnitzii*), semble être un élément clé dans la physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques intestinales, telles que la maladie de Crohn¹⁴. Une dysbiose est aussi retrouvée dans d'autres pathologies impliquant le système immunitaire, telles que le diabète de type 1¹⁵ ou encore la spondylarthrite¹⁶. Enfin, une dysbiose est aussi rencontrée dans l'autisme^{17,18} sans que le lien de causalité soit formellement compris ni démontré.

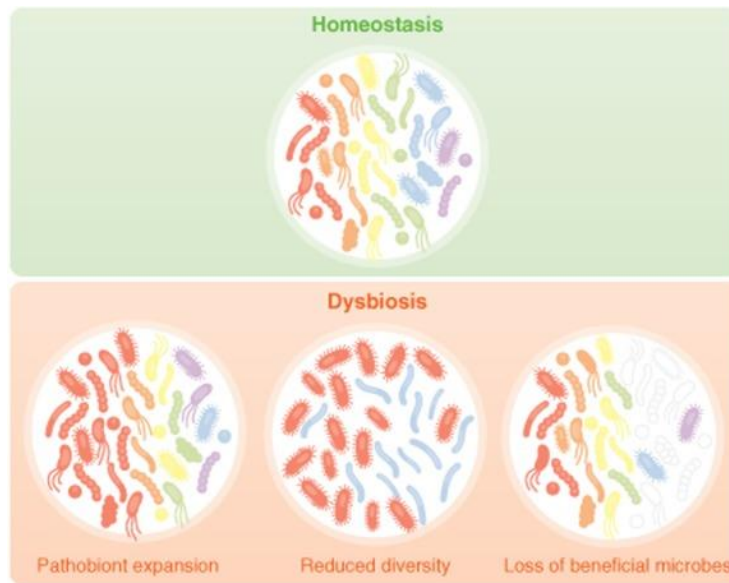


Figure 3 : Définition de la dysbiose, selon Petersen *et al.* ¹⁰

Petersen *et al.* définissent la dysbiose par la prolifération de micro-organismes pathogènes, la diminution de la diversité bactérienne ou encore la perte de bactéries bénéfiques.

1.5. Etude du microbiote intestinal

Etant très difficile de reproduire *ex vivo* les conditions présentes dans l'intestin (milieu anaérobie, composition physicochimique complexe du mucus), seulement 10% des espèces bactériennes du microbiote intestinal sont cultivables en laboratoires¹. L'analyse du microbiote intestinal a été révolutionnée par des techniques culture-indépendantes, avec notamment les techniques de séquençage du gène de l'ARNr 16S.

Les séquenceurs, dits de « seconde génération » ou « haut débit », permettent la lecture de plusieurs millions de séquences en parallèle allant jusqu'à 900 pb et sont donc adaptés à l'analyse d'écosystèmes complexes comme le microbiote intestinal. Deux approches sont possibles : i) l'approche métagénomique, consistant à séquencer tout l'ADN (eucaryote et procaryote) d'un milieu et ii) le séquençage du gène de l'ARNr 16S, consistant à restreindre l'analyse au contenu bactérien, approche que nous avons privilégiée pour cette étude.

Le ribosome, acteur essentiel dans la traduction de l'ARNm en protéines, est un complexe ribonucléoprotéique (fait de protéines et d'ARN). Chez les bactéries, il est composé de deux sous-unités (50S et 30S). L'ARNr 16S est le constituant ARN de la petite sous-unité 30S, codé par un gène d'environ 1500 nucléotides. La fonctionnalité de cet ARNr dépend en grande partie de sa conformation en 3 dimensions. Les régions du gène impliquées dans cette structure en 3 dimensions tolèrent alors très peu les mutations et sont

très conservées d'une espèce à une autre. Tandis que d'autres régions du gène sont moins importantes pour la fonctionnalité de l'ARNr et sont le siège de mutations ponctuelles, permettant alors de discriminer les espèces entre elles. Ainsi, au sein du gène de l'ARNr 16S, neuf régions hypervariables sont décrites¹⁹ (Figure 4). A l'aide d'amorces (s'hybridant avec les régions conservées), il est alors possible de cerner et de séquencer les régions hypervariables, afin d'identifier la souche bactérienne.

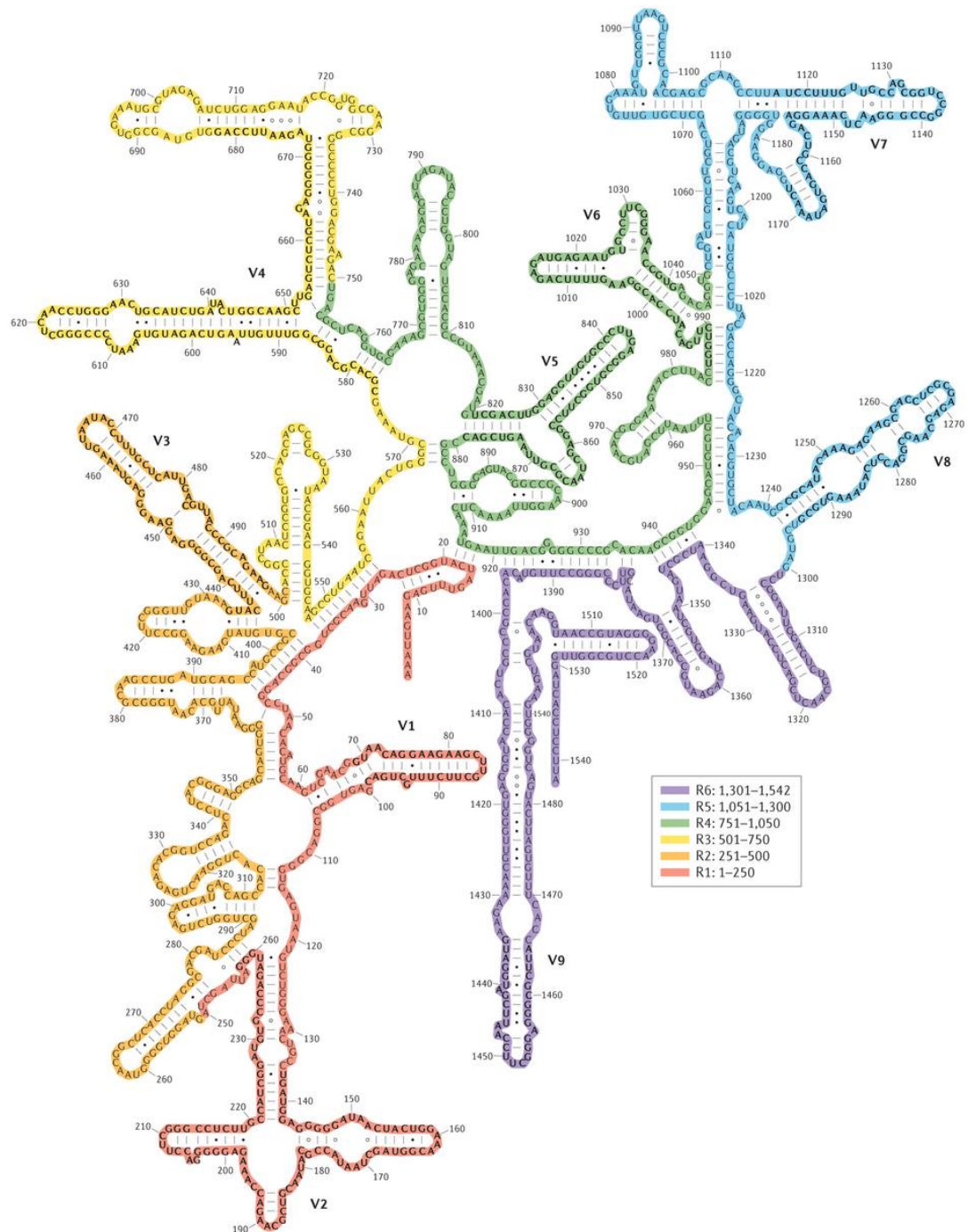


Figure 4 : Schéma du gène codant pour l'ARNr 16S, selon Yarza *et al.*¹⁹

Séquence du gène, avec les 9 régions hypervariables (V1 à V9). Les auteurs, ici, délimitent aussi 6 régions (R1 à R6), pouvant alors comporter une ou plusieurs régions hypervariables

2. Mucoviscidose

2.1. Définitions et physiopathologie

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques pédiatriques. En France, l'incidence est de 1 pour 4 500 naissances (soit 200 nouveaux cas/an) et la prévalence, tous âges confondus, est de 6 500, dont 3000 enfants (de moins de 18 ans)²⁰. Maladie autosomique et récessive, elle est la conséquence de mutations du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) qui code pour une protéine qui se localise au pôle apical des cellules épithéliales. Plus de 1 500 mutations ont été identifiées, la plus commune en France est la DeltaF508 (ou $\Delta F508$) présente dans plus de 60% des cas. Les malades sont homozygotes ou hétérozygotes composites (une mutation différente sur chaque allèle).

La protéine CFTR est présente au niveau de la muqueuse respiratoire et intestinale, au niveau des canaux excréteurs des glandes sudorales, du pancréas, des voies biliaires et des canaux déférents. Elle joue un rôle primordial dans l'équilibre hydro-électrolytique des sécrétions exocrines. Mutée, elle va perdre sa fonctionnalité et être responsable de sécrétions pauvres en chlore et en sodium. Ces sécrétions, déshydratées et trop visqueuses, vont générer une stase dans les organes concernés et aboutir progressivement à leur destruction parenchymateuse. La morbi-mortalité est essentiellement conditionnée par l'atteinte pulmonaire, mais d'autres organes peuvent être touchés, comme le foie, l'intestin ou encore le pancréas. Les phénotypes sont très variables selon les mutations, réparties en 6 classes principales en fonction de leurs conséquences fonctionnelles (Figure 5)²¹.

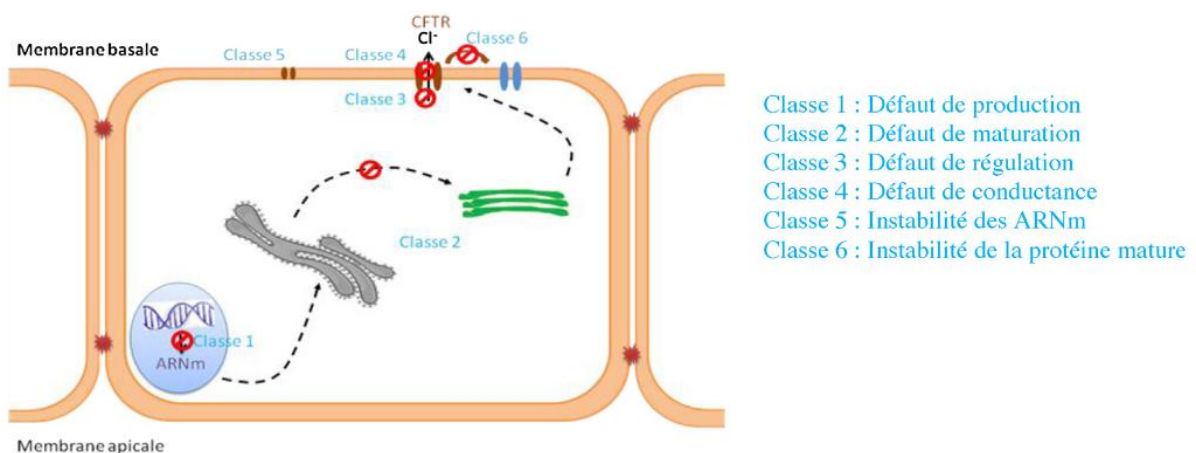


Figure 5 : Différentes classes de mutations du gène CFTR, d'après Covol *et al.*²¹

En fonction de leurs répercussions sur la protéine, on parle de mutations « sévères » (mutations de classe I, II et III) ou « modérées » (mutations de classe IV, V et VI).

La mutation $\Delta F508$, la plus fréquente en France, est une mutation de classe II.

ARNm : acide ribonucléique messager.

2.2. Atteinte respiratoire et antibiothérapie dans la mucoviscidose

L'atteinte respiratoire est quasi constante et conditionne le pronostic de la maladie. Malgré les mesures symptomatiques et préventives, les exacerbations et colonisations sont inévitables, conduisant à des administrations d'antibiotiques, précoces et répétées.

Les exacerbations participent à l'évolution vers l'insuffisance respiratoire. Les colonisations chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* sont considérées comme un tournant dans la maladie, entraînant, à plus ou moins brève échéance, une dégradation de la fonction respiratoire.

Les primo-colonisations à *P. aeruginosa* et les exacerbations sont généralement traitées par une bi antibiothérapie intraveineuse, adaptée à la bactérie, pendant 15 jours.

Les enfants colonisés de façon chronique à *P. aeruginosa* sont traités par antibiotiques inhalés. Si le patient est colonisé à *Staphylococcus aureus* et qu'il est fragile sur le plan pulmonaire, une antibiothérapie alternée *per os* est prescrite sur plusieurs mois.

2.3. Atteintes digestives de la mucoviscidose

Les atteintes digestives doivent être au centre de la prise en charge globale des patients atteints de mucoviscidose. Elles impactent directement sur la qualité de vie (douleurs abdominales, reflux gastro-œsophagien), le pronostic (état nutritionnel) ou encore la morbi-mortalité (cirrhose hépatique).

2.3.1. Atteinte pancréatique

L'insuffisance pancréatique exocrine concerne 90% des patients à l'âge adulte et est corrélée à la sévérité du génotype CFTR. Lorsqu'elle est présente, elle survient de manière précoce, dès la première année dans 80% des cas. L'insuffisance pancréatique exocrine, principal facteur de dénutrition chez le petit enfant, est responsable d'une maldigestion des nutriments et d'une carence en vitamines liposolubles. La prise en charge repose sur la substitution enzymatique et la supplémentation vitaminique.

2.3.2. Altération du mucus intestinal

La protéine CFTR est un canal chlorure, qui contrôle aussi l'absorption du sodium (Na^+) et la sécrétion du bicarbonate (HCO_3^-). La diminution de sécrétion de bicarbonate par les épithéliums hépatobiliaires, pancréatiques et intestinaux chez les patients atteints de mucoviscidose a deux conséquences majeures : l'augmentation de l'acidification de l'écosystème digestif et l'accumulation d'un mucus intestinal trop visqueux^{22,23}.

2.3.3. Inflammation digestive

Une inflammation intestinale chronique est présente chez les patients atteints de mucoviscidose, même en l'absence de symptôme digestif²⁴. Elle est caractérisée par une infiltration de *lamina propria* par des mononucléaires exprimant des marqueurs de l'inflammation (ICAM-1, CD-25, IL-2, IFN γ)²⁵ et des lésions de la muqueuse (œdème, érythème ou ulcérations)²⁶. Le dosage de la calprotectine fécale, un biomarqueur reflétant l'inflammation intestinale, montre des taux plus élevés chez les patients atteints de mucoviscidose que chez les sujets sains^{27,28} (Figure 6). Cette inflammation semble toucher préférentiellement les malades avec une insuffisance pancréatique exocrine²⁸. La physiopathologie et les conséquences de l'inflammation intestinale, notamment sur l'inflammation systémique, sur l'état nutritionnel et sur la fonction pulmonaire, restent encore mal comprises.

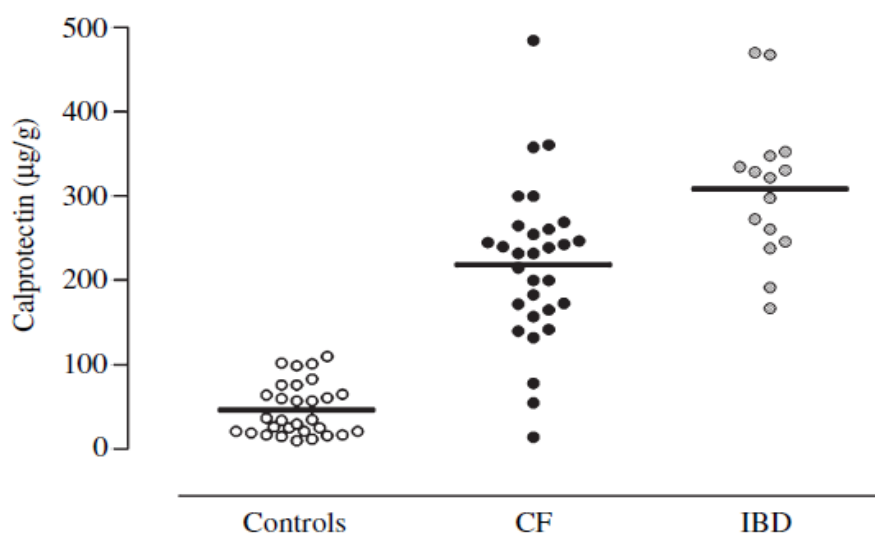


Figure 6 : Dosage de la calprotectine fécale chez des enfants atteints de mucoviscidose (CF), de maladie inflammatoire chronique intestinale (IBD) et des enfants contrôles (Control), d'après Bruzzese *et al*²⁷.

Dans le groupe mucoviscidose, 29 enfants sur 30 avaient une calprotectine supérieure à la normale. La valeur moyenne de calprotectine fécale dans ce groupe était de 219 ± 94 µg/g ($p < 0,01$ vs. Contrôles).

2.3.4. Dysbiose intestinale

2.3.4.1. Caractérisation de la dysbiose retrouvée dans la mucoviscidose

Une différence significative de la composition du microbiote intestinal est retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose²⁹⁻³² avec une baisse des espèces bactériennes bénéfiques (notamment pourvues d'une action anti-inflammatoire) tels que *Bifidobacterium spp.*, *Faecalibacterium prauztnisii* et *Eubacterium limosum*^{31,33,34} et l'émergence de bactéries opportunistes pro-inflammatoires telles que *Escherichia coli* et *Eubacterium bifforme*^{33,35}. La dysbiose dans la mucoviscidose se caractérise aussi par une diminution de la diversité bactérienne et une augmentation de l'abondance bactérienne³⁶⁻³⁸. L'intensité de la dysbiose semble être corrélée à la sévérité de la maladie³³.

2.3.4.2. Physiopathologie de la dysbiose (Figure 7)

Une altération du microbiote intestinal dans la mucoviscidose a été montrée dès les premiers jours de vie dans le modèle murin^{37,38} ou les premiers mois de vie chez l'Homme^{33,34,39,40}, avant toute exposition aux antibiotiques. Les facteurs impliqués dans l'installation de la dysbiose dans la mucoviscidose sont multiples et encore mal élucidés.

Tout d'abord, la stagnation du mucus digestif, trop épais, favoriserait la prolifération bactérienne et diminuerait la diversité du microbiote intestinal³⁶. De plus, un ralentissement du transit semble être aussi présent et serait alors un facteur supplémentaire de stase de mucus³⁷. Enfin, un traitement par laxatif, permettant d'hydrater le mucus et d'accélérer le temps de transit, semble corriger partiellement la dysbiose, notamment en diminuant l'abondance bactérienne³⁷.

L'intégrité de la barrière intestinale semble aussi être en cause, avec une diminution de l'immunité innée⁴¹⁻⁴³ et un mucus trop épais pour que les molécules anti bactériennes des cellules de Paneth puissent remplir correctement leurs fonctions au niveau de la lumière intestinale⁴⁴. Il faut néanmoins rappeler que dans la mucoviscidose, la dysbiose survient dès les premiers jours de vie, avant la différenciation des cellules de Paneth³⁷.

Les modifications du milieu intestinal, avec notamment une acidité accrue, l'accumulation de nutriments mal digérés en cas d'insuffisance pancréatique exocrine ou

encore des lipides mal absorbés en cas d'atteinte biliaire, sont aussi des facteurs impliqués dans la constitution de la dysbiose.

La déglutition des expectorations peut aussi expliquer en partie la composition du microbiote intestinal dans la mucoviscidose⁴⁵.

Les facteurs iatrogènes sont aussi à prendre en compte. La prescription d'inhibiteur de la pompe à protons en cas de reflux gastro œsophagien (plus fréquent dans la mucoviscidose) diminue l'acidité gastrique, élément essentiel de la barrière intestinale, surtout chez ces patients qui déglutissent leurs crachats. Enfin, l'antibiothérapie, utilisée de façon récurrente dans des indications respiratoires, peut moduler de façon importante le microbiote intestinal^{46,47}.

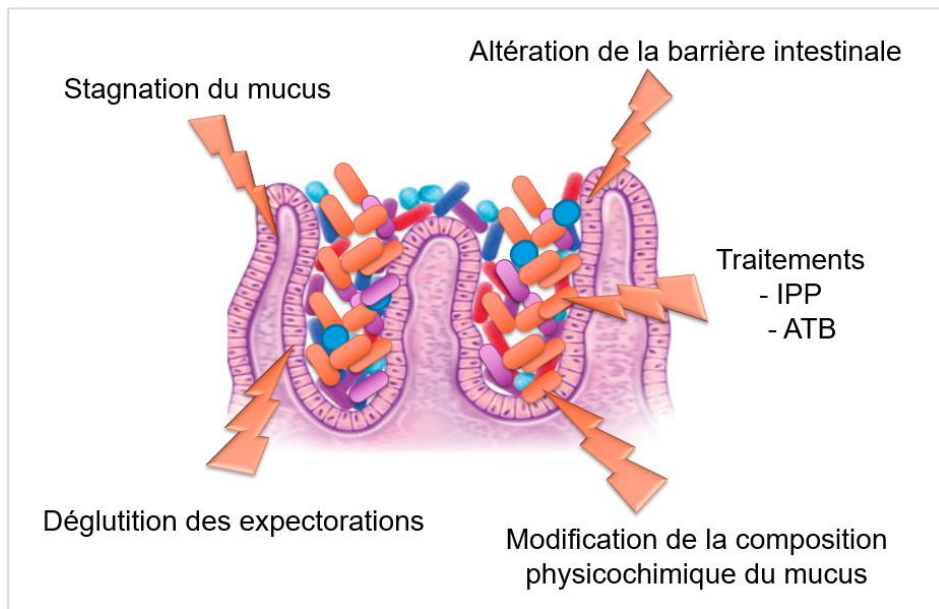


Figure 7 : Résumé des mécanismes possibles expliquant la dysbiose intestinale chez les patients atteints de mucoviscidose

2.3.4.3. Conséquences de la dysbiose (Figure 8)

2.3.4.3.1. Nutritionnelles

Le statut nutritionnel à lui seul est un facteur prédictif de la dégradation de la fonction pulmonaire et de la survie. La malnutrition favorise les infections et réduit l'espérance de vie, indépendamment de la fonction respiratoire⁴⁸. La dénutrition découle d'un déséquilibre multifactoriel de la balance énergétique. D'une part, il y a augmentation des dépenses énergétiques (liée à l'augmentation du travail ventilatoire et aux exacerbations pulmonaires) et une perte calorique digestive (en cas d'insuffisance pancréatique exocrine) et urinaire (en cas de diabète). D'autre part, il y a une diminution des apports du fait d'une anorexie liée à l'infection, l'inflammation ou encore les douleurs abdominales.

Néanmoins, l'amélioration de la croissance pondérale après un traitement antibiotique chez la souris³⁶ suggère aussi le rôle du microbiote dans l'état nutritionnel. La perte de poids peut résulter d'une compétition bactérienne dans l'ingestion de nutriments, de l'inflammation intestinale induite par des métabolites entérotoxiques bactériens ou la perte de certaines fonctions métaboliques bactériennes liée à la dysbiose⁴⁹.

2.3.4.3.2. Inflammatoires

Une prolifération bactérienne intestinale est associée à une majoration de la perméabilité intestinale⁵⁰, pouvant expliquer le rôle de la dysbiose dans l'inflammation intestinale. De plus, Hoffman *et al.* ont montré une corrélation entre l'abondance d'*Escherichia coli* dans le microbiote fécal et l'inflammation intestinale³⁵. Enfin, les souris mutées traitées par antibiotiques ont une diminution significative de l'inflammation intestinale³⁶.

2.3.4.3.3. Hépatiques

L'atteinte hépatique touche plus de 3 patients sur 4 à l'âge adulte, avec des anomalies isolées du bilan hépatique, des lithiases biliaires ou encore la survenue d'une cirrhose multi nodulaire qui se retrouve chez 10% des patients à l'âge de 10 ans^{51,52}. Cette dernière atteinte est grave, puisqu'elle impacte la mortalité avec la survenue d'hémorragies digestives secondaires à l'hypertension portale. Une étude récente retrouve un lien entre la dysbiose intestinale et la survenue de cirrhose, avec notamment une diminution des bactériodes⁵³.

2.3.4.3.4. Sur les symptômes digestifs

Fréquentes et sous diagnostiquées, les douleurs abdominales impactent directement sur la qualité de vie des patients. A côté des causes classiques comme un reflux gastro-oesophagien, des poussées de pancréatite, ou encore une lithiase biliaire, ces douleurs peuvent être dues à l'inflammation intestinale, à la dysbiose⁵⁴, à un mauvais contrôle de l'insuffisance pancréatique exocrine

2.3.4.3.5. Sur le microbiote respiratoire

Madan *et al.* ont étudié l'établissement du microbiote respiratoire et intestinal pendant les deux premières années de vie chez des enfants atteints de mucoviscidose. Dans certains cas, la colonisation intestinale présageait de la colonisation respiratoire par la même bactérie³⁹. Dans une étude plus récente, Hoen *et al.* ont montré que la diminution des *Parabacteroides* dans la flore intestinale précédait les colonisations respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*⁴⁰. Ces deux études ont aussi établi un lien entre l'alimentation, et l'état du microbiote respiratoire^{39,40}. L'efficacité des probiotiques sur la diminution des exacerbations pulmonaires renforce le lien entre le microbiote intestinal et la fonction pulmonaire^{26,31}.

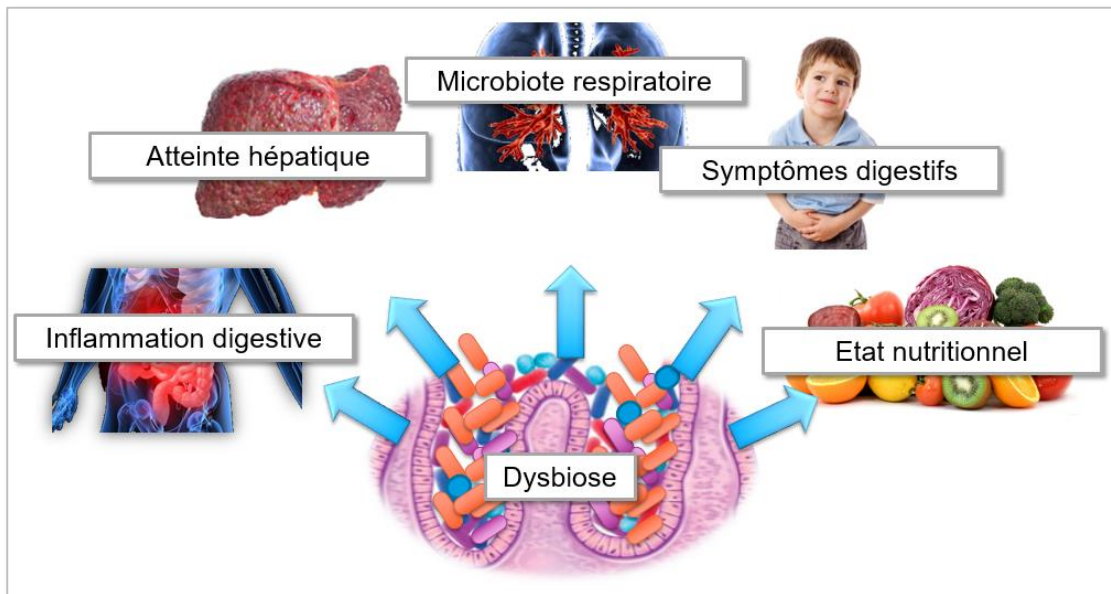


Figure 8 : Résumé des conséquences de la dysbiose intestinale chez les patients atteints de mucoviscidose

2.3.4.4. Probiotiques et mucoviscidose

Des études pilotes, ayant pour but d'évaluer l'efficacité des probiotiques dans la mucoviscidose, ont montré, notamment avec les souches de *Lactobacillus rhamnosus*, une amélioration des symptômes fonctionnels digestifs et une diminution de l'inflammation intestinale^{31,55}, qui s'accompagnaient d'une diminution des anomalies du microbiote intestinal^{31,55}. L'administration de probiotiques conduisait également à une diminution des exacerbations pulmonaires et des hospitalisations^{26,31}, et à une amélioration de la qualité de vie⁵⁶. Ces résultats renforcent le lien étroit entre le microbiote et l'évolution de la maladie.

3. Objectifs de l'étude

L'objectif principal de cette étude était d'étudier l'évolution du microbiote intestinal après une cure d'antibiothérapie intra-veineuse chez des enfants atteints de mucoviscidose.

Les objectifs secondaires étaient d'étudier les corrélations :

- entre la dysbiose et l'inflammation digestive
- entre la dysbiose et la qualité de vie et les symptômes digestifs
- entre l'inflammation digestive et la qualité de vie et les symptômes digestifs

et de corréler les résultats du séquençage à ceux de la coproculture.

4. Matériel et méthode

4.1. Inclusions des patients

Les critères d'inclusion étaient :

- i) Avoir une mucoviscidose et être suivi par le Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) pédiatrique de Bordeaux
- ii) Avoir un âge supérieur à 3 ans, âge à partir duquel le microbiote intestinal est considéré comme stable et proche de celui de l'adulte et
- iii) Avoir une insuffisance pancréatique exocrine, documentée par une élastase fécale < 200 µg/g, afin d'éviter des biais de confusions dans l'analyse du microbiote intestinal, de l'inflammation digestive et des symptômes intestinaux.

Le seul critère d'exclusion était la participation en cours à un protocole thérapeutique, pouvant alors potentiellement moduler le microbiote intestinal.

Nous n'avons pas exclu les patients ayant pris des probiotiques ou des antibiotiques (*per os* ou inhalés) dans les 3 mois précédant l'inclusion, sinon le nombre de patients aurait été trop faible, mais nous en avons tenu compte lors de l'analyse des résultats.

4.2. Schéma de l'étude

Notre étude était une étude observationnelle, monocentrique, prospective. Elle s'est déroulée de novembre 2015 à mai 2016 au sein du CRCM de l'hôpital des enfants de Bordeaux.

Les patients inclus étaient suivis pendant 3 mois. Ils étaient divisés en deux groupes distincts : ceux qui recevaient une cure d'antibiothérapie intraveineuse (ATB IV) durant le suivi, et ceux qui ne recevaient pas de cure d'ATB IV. Les prises d'antibiotiques *per os* ou inhalés n'étaient pas pris en compte pour l'assignation du groupe, mais faisaient partie des critères étudiés dans l'analyse finale des données.

Afin de ne pas multiplier les convocations au CHU pour le patient et sa famille, nous nous sommes basés sur les rendez-vous fixés par le CRCM.

Dans le cadre de l'étude, les patients étaient donc vus (Figure 9) :

- A J0 : Lors de la consultation trimestrielle pour les témoins / Au début de l'hospitalisation pour une cure d'ATB IV pour les patients traités.
- A J45 seulement pour les patients traités par ATB IV, qui venaient pour une consultation post antibiothérapie et un ECBC de contrôle.

- A J90 : Lors de la consultation trimestrielle pour les témoins / Au début de l'hospitalisation pour une cure d'ATB IV ou en consultation trimestrielle pour les patients traités.

A chaque fois, le patient remettait un prélèvement de selles de moins de 24h et un questionnaire sur la qualité de vie et les symptômes digestifs.

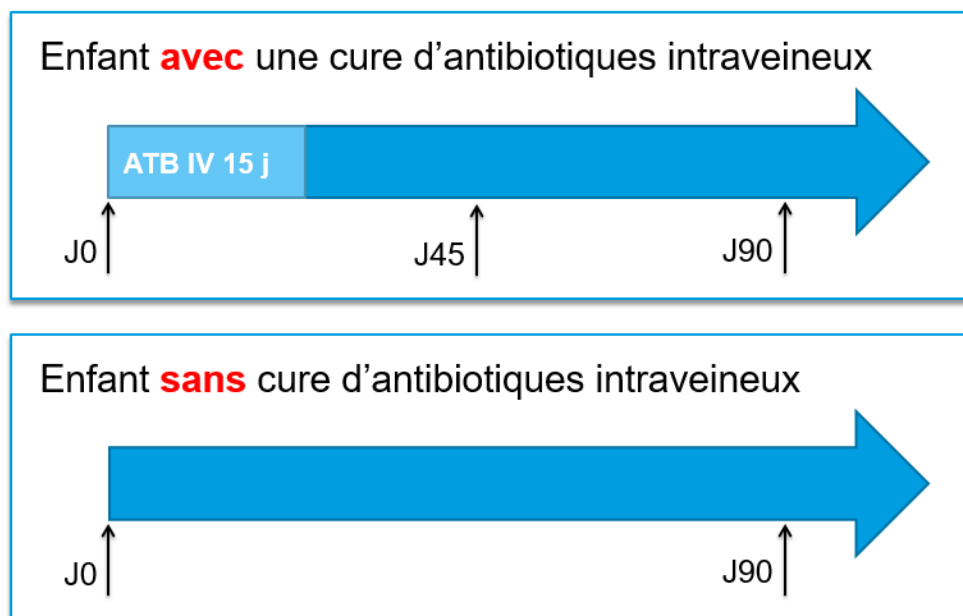


Figure 9 : Suivi du patient sur 3 mois en fonction du groupe dans lequel le patient est inclus.

Les flèches noires indiquent les consultations où le patient était vu. Il devait alors remettre un prélèvement de selles et remplir un questionnaire.

4.3. Antibiothérapie

Les cures d'ATB IV étaient prescrites pour une durée de 15 jours et administrées sur voie centrale (PICC Line ou chambre implantable). Elles comprenaient une bi-antibiothérapie. Le choix des molécules utilisées était adapté à chaque patient en fonction des résultats de l'ECBC et des cures antérieures, selon les recommandations en vigueur⁵⁷.

4.4. Questionnaire

Un questionnaire a été rempli à J0, J45 (si ATB IV) et à J90 et comprenait (Annexe 14):

- i) Une première partie où les parents devaient renseigner les traitements pris au cours des 3 derniers mois
- ii) Une deuxième partie évaluant la qualité de vie sur le dernier mois grâce à un questionnaire validé (le PedsQLTM - Quality of Life Pediatric Inventory 4.0). Les items abordés étaient les activités, les émotions, la relation avec les autres et les études.
- iii) Une dernière partie évaluant les symptômes digestifs sur le dernier mois grâce à un questionnaire validé (le PedsQLTM – Gastrointestinal Symptoms Scales 3.0). Les items abordés étaient les douleurs abdominales, la dyspepsie, l'alimentation, la dysphagie, le reflux gastroœsophagien, les nausées et vomissements, les gaz et ballonnements, la constipation, les rectorragies et la diarrhée.

Ces questionnaires PedsQLTM sont validés pour différentes tranches d'âge et comportent une auto-évaluation par l'enfant et une hétéro-évaluation par les parents.

Un score de 0 (gênes/symptômes permanents) à 100 (gênes/symptômes inexistantes) était attribué à chaque item en fonction des réponses associées.

Enfin, une moyenne était calculée sur 100 pour les 4 grandes parties du questionnaire (qualité de vie selon les parents, qualité de vie selon l'enfant, symptômes digestifs selon les parents et symptômes digestifs selon l'enfant).

4.5. Analyses du prélèvement de selles

Le prélèvement devait dater de moins de 24h avant la venue au CHU et était conservé à l'air ambiant (Annexe 1). Dès réception, les selles étaient conditionnées le jour même, en vue de la réalisation de :

- Une coproculture quantitative
- Une calprotectine fécale
- Un séquençage haut débit

Lorsque la quantité de l'échantillon était insuffisante pour l'ensemble des analyses, le séquençage haut débit était privilégié, et si possible la calprotectine fécale.

4.5.1. Coproculture quantitative

Les coprocultures quantitatives ont été réalisées au laboratoire de bactériologie du Pr MEGRAUD au CHU de Bordeaux, selon le protocole en vigueur pour la numération des bactéries dans les selles des enfants aphasiques. Un gramme de selles était dilué progressivement de 10^{-1} à 10^{-7} dans du sérum physiologique et ensemencé dans différents milieux (Annexe 2).

Les différents milieux étaient analysés à H₂₄ et H₄₈ post-ensemencement (et H₇₂ pour la gélose Karmali). Les différentes colonies bactériennes étaient alors distinguées selon leurs caractéristiques morphologiques (taille, couleurs et aspect des colonies) et phénotypiques (croissance et réactions dans un milieu donné). Puis l'identification des colonies suspectes était effectuée à l'aide du MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry), une technique de spectrométrie de masse permettant de reconnaître une espèce en fonction de son spectre protéique.

La quantification des souches se faisait lors de la lecture des géloses, en tenant compte du nombre de colonies et du degré de dilution de l'échantillon ensemencé. Le seuil de positivité était alors à 1×10^5 UFC/mL sur les géloses BCP et ANC et 1×10^2 UFC/mL sur les autres milieux.

4.5.2. Calprotectine fécale

La calprotectine est une protéine de la famille des protéines S100, aux propriétés antibactériennes et antifongiques. Présente dans le cytoplasme des polynucléaires, des cellules mononuclées et des cellules épithéliales, elle est sécrétée en cas de stress. Dans un contexte d'inflammation intestinale, elle est exsudée dans la lumière du tube digestif. Non dégradée lors de son passage entérique, elle peut être dosée et quantifiée dans les selles par un test ELISA, témoignant alors de l'inflammation digestive.

C'est le biomarqueur le plus utilisé et le plus performant dans le diagnostic et le suivi des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique). Son élévation témoigne d'une poussée, tandis que sa normalisation est associée à une réponse au traitement. La calprotectine fécale est aussi un bon outil pour discriminer une inflammation intestinale d'une atteinte fonctionnelle intestinale. Néanmoins, les études divergent sur les seuils à fixer dans ces différentes situations.

Le dosage de la calprotectine fécale a été fait au sein du laboratoire de Biochimie du CHU de Bordeaux du Pr Hubert Huard-De-Verneuil, à l'aide du kit GHSA d'Eurobio. Le seuil de positivité de ce kit est de 70 $\mu\text{g/g}$ chez l'enfant à partir de 4 ans. En l'absence d'un seuil spécifique à la mucoviscidose, nous avons utilisé le seuil de 100 $\mu\text{g/g}$ proposé par Canani *et al.*⁵⁸ pour discriminer chez l'enfant une pathologie intestinale inflammatoire d'un trouble fonctionnel digestif.

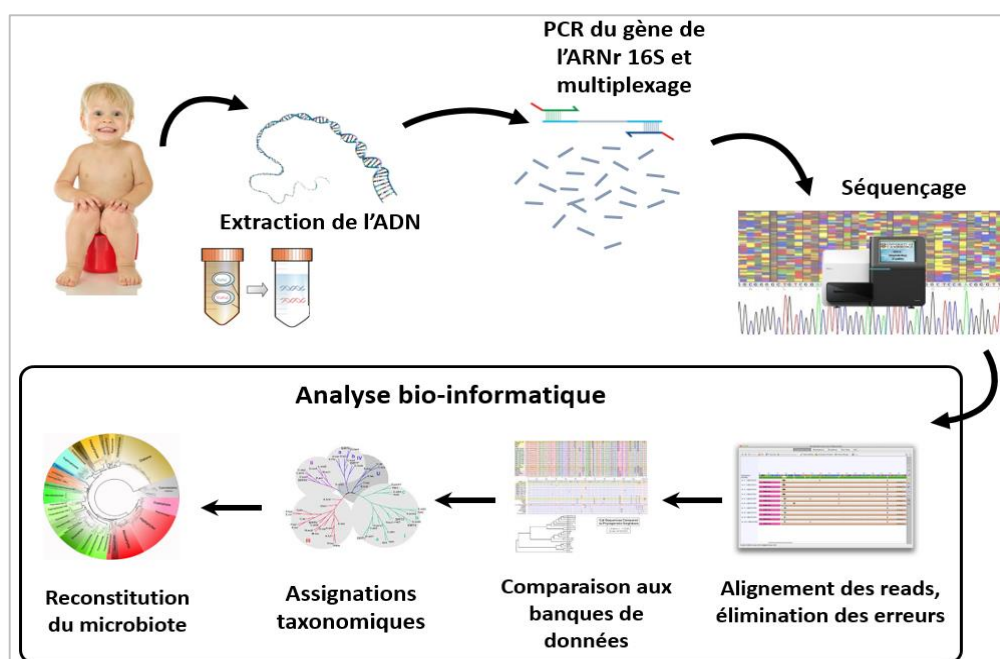


Figure 10 : Les différentes étapes pour le séquençage du microbiote intestinal

4.5.3. Séquençage haut débit

Un échantillon de selles était conservé à -80° en vue du séquençage. Cette analyse s'est déroulée au sein de la Plateforme Génome Transcriptome de l'Université de Bordeaux, et comporte plusieurs étapes (Figure 10).

- L'extraction de l'ADN (Annexe 3).

Nous avons choisi de faire une extraction chimique à l'aide du kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen®. Le choix du kit d'extraction s'est porté sur celui qui donnait les meilleurs résultats en termes de quantité et de diversification d'ADN extrait, parmi tous les kits testés.

- Amplification par PCR de la région hypervariable V4 du gène de l'ARNr 16S (Annexe 4).

Le but de cette étape est de sélectionner et d'amplifier spécifiquement la région hypervariable V4 du gène l'ARNr 16S par PCR (Figure 11). Le choix des amorces utilisées, 515F et 806R, reposait à la fois sur les données de la littérature⁵⁹⁻⁶¹ et sur l'expérience de l'équipe, qui a sélectionné cette paire pour sa rentabilité, en termes de discrimination lors du séquençage. L'ADN polymérase utilisée pour cette PCR était la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

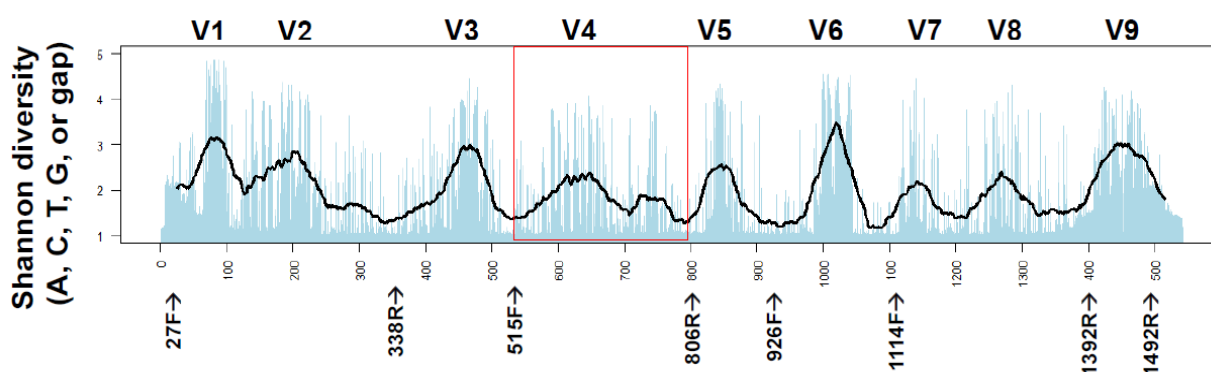


Figure 11. Les différentes régions hypervariables du gène de l'ARNr 16S, d'après Lundberg *et al.*⁵⁸ Cartographie des régions hypervariables de V1 à V9 et de l'emplacement des différentes amorces (flèches noires). L'indice de Shannon (indice de diversité) de chaque base est indiqué par les histogrammes bleus. La moyenne de cet indice, sur une fenêtre de 50 paires de bases, est indiquée par la ligne noire, définissant ainsi les régions hypervariables du gène de l'ARNr 16S. La région séquencée dans notre étude est délimitée par le carré rouge.

- PCR de Multiplexage (Annexe 5)

Cette deuxième PCR est une étape essentielle pour deux raisons :

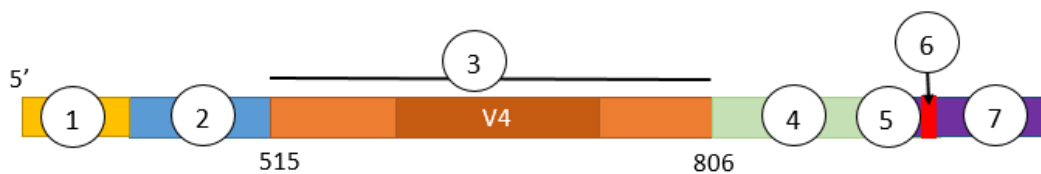
- i) Insérer les séquences requises pour la méthode de séquençage d'Illumina®
- ii) Insérer un index spécifique à chaque prélèvement, afin d'assigner les résultats du séquençage au bon patient.

Cette étape s'est déroulée avec 3 amorces et la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

- Séquençage des amplicons (Figure 12)

Le séquençage haut débit a été réalisé sur le MiSeq d'Illumina® par la technique paired end (seules les 250 premières bases des fragments sens et anti-sens sont lues), compte tenu de la longueur du fragment d'intérêt (291 paires de bases). Ce choix de technique était bien sûr guidé par la disponibilité de ce séquenceur au sein de la Plateforme de Génomique Fonctionnelle, mais il est important de souligner que ce séquenceur avait également l'avantage d'offrir une grande profondeur d'analyse, permettant donc de mieux discriminer des séquences d'ADN susceptibles d'être assez proches les unes des autres. Les principes de la technique Illumina® sont décrits en Annexe 6.

La préparation de la banque et le séquençage ont été supervisés par Christophe Hubert, ingénieur au Centre de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Bordeaux.



1 : Séquence qui va se lier sur la flowcell (sur la séquence P5)

2 : Fragment complémentaire du « Sequencing primer 1 », utilisé pour le séquençage du fragment

3 : Fragment d'intérêt comprenant la région hypervariable « V4 » à séquencer

4 : Fragment complémentaire du « Sequencing primer 2 », utilisé pour le séquençage du fragment

5 : Fragment complémentaire de l' « indexing primer », utilisé pour la lecture de l'index

6 : Index (6 nucléotides)

7 : Séquence complémentaire de la partie qui va se lier sur la flowcell (sur la séquence P7)

Figure 12. Amplicon final sens (412 pb)

- **Analyse bio-informatique des données de séquençage**

L'analyse bio-informatique est une étape essentielle, qui comporte plusieurs phases. Après un filtrage, grâce au logiciel QC-toolkit (version 2.3.3), visant à supprimer les séquences dont la qualité moyenne est insuffisante, les séquences ont été testées pour contamination en les comparant à la séquence du génome humain (Homo sapiens alternate assembly HuRef GCF_000002125.1) en utilisant le logiciel BWA (version 0.7.12). Puis les séquences ainsi filtrées ont été comparées avec une banque de référence (GreenGenes release 10022015) grâce au logiciel BWA afin de connaître leur origine. Cette banque contient 406 997 séquences d'ARN 16S. L'étape d'assignation taxonomique a été effectuée avec le logiciel Tango (version 1.0), afin d'obtenir au final, pour chaque séquence d'origine bactérienne, une assignation à un seul nœud taxonomique.

L'interprétation statistique de ces résultats a été effectuée avec le site MetagenAssist (<http://www.metagenassist.ca/METAGENassist/faces/UploadView.jsp>). L'indice de Cette analyse bio-informatique a été effectuée au Centre de Bio-informatique de la Plateforme Génome Transcriptome par Aurélien Barré, sous la direction de Macha Nikolski.

4.5.4. Gestion des données et analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R et Stata 13.1.

L'analyse statistique était faite nœud taxonomique par nœud taxonomique afin de trouver les nœuds dont la quantité variait significativement entre deux conditions (test de Student & test de Wilcoxon). Les échantillons étaient conservés en paire ou non entre les deux conditions. Le seuil de significativité sur les p-valeurs est fixé à 0,05. Etant donné que le même test était effectué plusieurs fois, une correction sur les p-valeurs a dû être appliquée (correction de test multiple). Celle-ci était effectuée avec la méthode de "Benjamini Hochberg". Les nœuds taxonomiques étaient analysés niveau par niveau dans la phylogénie (Phylum, Classe, Ordre, Famille, Genre, Espèce), les corrections étaient effectuées aussi niveau par niveau et non globalement. Un seuil à 0,05 est appliqué sur ces p-valeurs ajustées.

La diversité de chaque échantillon a été calculée selon l'indice de Shannon et le score de Sorenson.

Les comparaisons inter-groupes ont été effectuées par des tests non paramétriques : Mann-Whitney's rank test pour les comparaisons de variables quantitatives, et test exact de Fisher pour les proportions. Tous les tests étaient bilatéraux, considérant le seuil de 5% comme significatif. Risques relatifs et Odd ratios ont été estimés avec un intervalle de confiance à 95%.

5. Résultats

5.1. Description de la cohorte

Vingt et un patients ont été inclus dans la cohorte, sur les 70 patients incluables. Sept patients étaient dans le groupe « cure IV » et 14 patients dans le groupe « pas de cure IV », soit 49 échantillons séquencés. Les caractéristiques cliniques des patients inclus sont résumées dans le tableau 1.

Pour étudier l'impact de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal, nous avons exclu 3 patients du groupe « pas de cure IV » car ils avaient reçu des antibiotiques *per os* ou inhalés durant le suivi ou dans les 3 mois précédents. Il restait donc 11 patients dans ce groupe, qui n'ont reçu aucun antibiotique (toutes voies d'administration confondues) durant la durée de l'étude (Figure 13). Dans le groupe « cure IV », plus de la moitié des enfants (4 sur 7, soit 57 %) avaient un traitement par antibiothérapie inhalée en place depuis plus d'un an. Nous avons donc choisi de ne pas exclure ces enfants de l'analyse.

Pour étudier la corrélation entre la dysbiose et les symptômes digestifs, entre la dysbiose et l'inflammation digestive et entre l'inflammation digestive et les symptômes digestifs, nous avons pris en compte les 21 patients, car l'exposition aux antibiotiques (quelle que soit la voie) ne constituait pas un biais d'interprétation des résultats.

A noter que 18 patients supplémentaires (dont 6 avec une cure ATB IV) ont donné leur accord et fait les prélèvements, mais le séquençage n'a pas pu être financé (Figure 13).

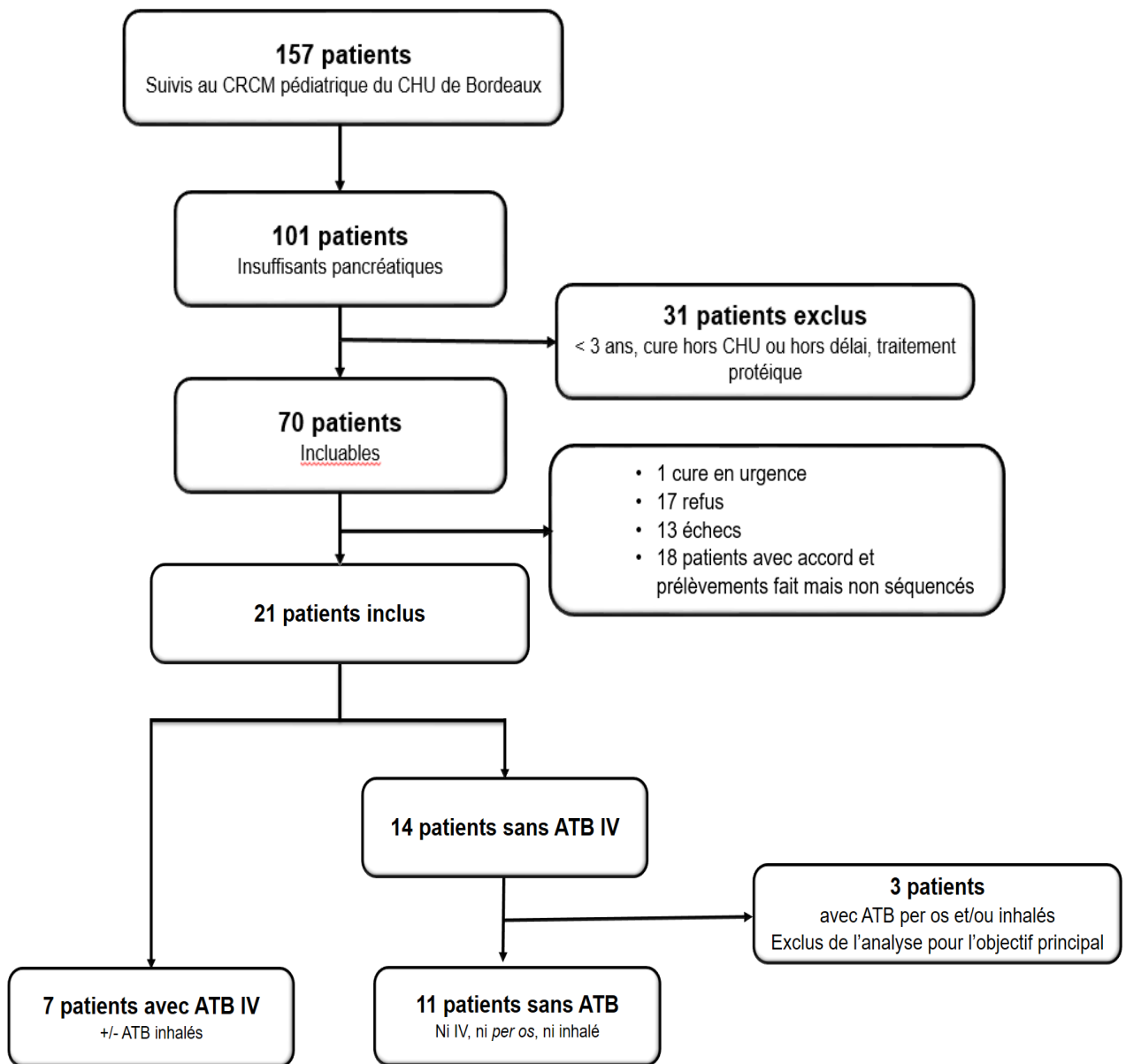


Figure 13. Flow chart

Patient	Age (années)	Sexe	Génotype du CFTR		ATB IV ou <i>per os</i> dans les 3 mois précédents	Prescription d'ATB durant le suivi			Nombre de cures IV précédentes	Colonisation à <i>P. aeruginosa</i>	Colonisation à <i>S. aureus</i>	Prise de probiotiques durant le suivi
			Mutation 1	Mutation 2		IV	<i>Per os</i>	Inhalé				
AMLA	7	F	ΔF508	ΔF508	Non	Non	Non	Non	1	Non	Oui	Oui
BOMA	8	F	ΔF508	1087LT	Oui	Oui	Non	Non	0	Non	Oui	Non
BRAL	8	F	ΔF508	ΔF508	Non	Oui	Oui	Oui	5	Non	Oui	Non
CHLA	7	F	ΔF508	A559T	Non	Non	Non	Non	0	Non	Oui	Non
DEMA	14	M	ΔF508	1221delCT+S1235R	Non	Non	Non	Oui	9	Non	Oui	Non
DUGA	10	M	ΔF508	ΔF508	Non	Non	Non	Non	0	Non	Oui	Non
GATE	10	F	ΔF508	G542X	Oui	Non	Non	Non	0	Non	Oui	Non
HIET	9	M	ΔF508	G85E	Oui	Oui	Non	Oui	11	Non	Non	Non
KANA	5	M	ΔF508	ΔF508	Non	Non	Non	Non	0	Non	Non	Oui
MADA	13	M	ΔF508	3007delG	Oui	Non	Non	Non	1	Non	Oui	Non
MALI	7	F	ΔF508	ΔF508	Non	Non	Non	Non	0	Non	Oui	Non
MEAL	13	M	ΔF508	K135	DM	Oui	Oui	Non	25	Non	Oui	Oui
OPNA	9	M	N1303K	N1303K	Non	Non	Oui	Non	0	Non	Oui	Non
OZGU	11	M	ΔF508	ΔF508	Non	Non	Non	Non	0	Non	Oui	Non
POLE	6	F	ΔF508	ΔF508	Non	Non	Non	Non	5	Non	Non	Non
ROLE	8	F	ΔF508	ΔF508	Oui	Oui	Non	Non	5	Non	Non	Non
SALO	14	M	ΔF508	ΔF508	Oui	Non	Oui	Non	0	Non	Oui	Non
SUJA	7	F	ΔF508	ΔF508	Oui	Oui	Non	Oui	2	Non	Oui	Non
URKE	7	M	ΔF508	ΔF508	Oui	Non	Non	Non	1	Non	Non	Non
VEPA	11	F	ΔF508	ΔF508	Non	Oui	Non	Oui	5	Oui	Non	Non
WIPA	9	M	ΔF508	ΔF508	Non	Non	Non	Non	0	Non	Oui	Non

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'étude

Patient : Deux premières lettres du nom et du prénom

Abréviations : F : féminin, M : masculin, ATB : antibiotique, IV : intraveineux, DM : donnée manquante

5.2. Déroulement du séquençage

Au final, 45 échantillons sur 49 (soit 92%) ont été analysés (Annexe 7). Trois échantillons n'ont pu être amplifiés par PCR malgré plusieurs tentatives (le J0 du patient KANA et le J90 des patients BOMA et MEAL) et le séquençage du J90 de MALI n'a pas fonctionné. Les patients BOMA et MEAL faisaient partie du groupe « ATB IV ». Le séquençage s'est déroulé en 3 runs, comportant respectivement 12, 20 et 14 échantillons par run. Le niveau d'assignation taxonomique est représenté dans la figure 14. Les séquences ont été assignées dans 27 % des cas au niveau de l'espèce, 51 % des cas au niveau du genre, dans 20% des cas au niveau de la famille et dans 2 % des cas au niveau de l'ordre bactérien. Donc, si nous nous plaçons au niveau de l'ordre pour les comparaisons inter groupes, la quasi-totalité des séquences était prise en compte (celles assignées au niveau de l'espèce, du genre, de la famille et de l'ordre), tandis que si nous nous plaçons au niveau du genre, 77 % des séquences étaient pris en compte (celles assignées au niveau de l'espèce et du genre). Pour l'ensemble des échantillons, 704 nœuds taxonomiques différents ont été observés.

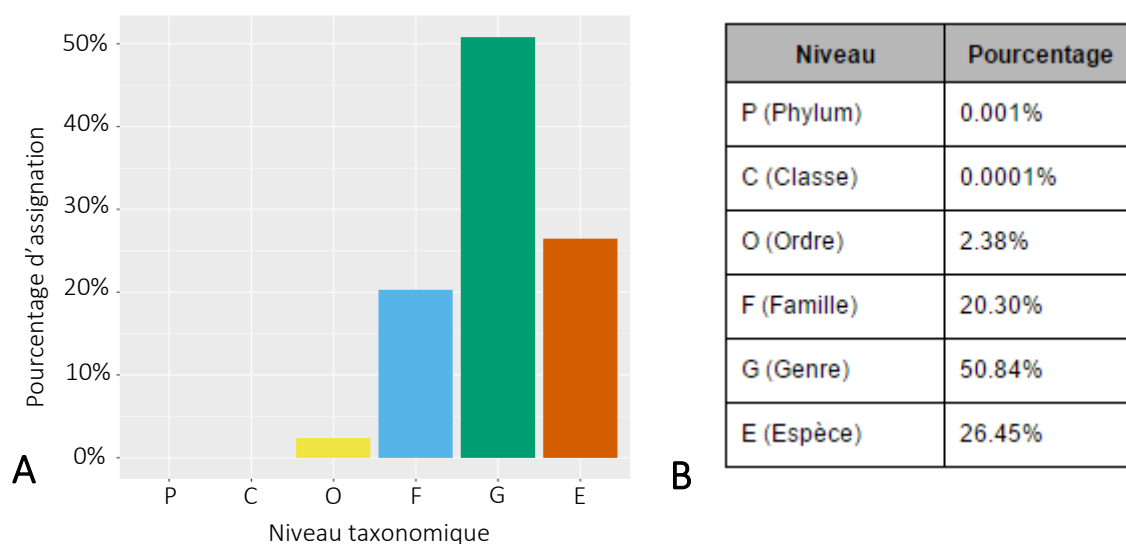


Figure 14 : Niveau assignation taxonomique obtenu avec le logiciel Tango

A : Histogramme et B : Pourcentage d'assignation

5.3. Comparaison du microbiote intestinal à J0 entre les groupes « ATB IV » et « sans ATB IV »

L'analyse finale portait sur 18 patients, 7 dans le groupe « ATB IV » et 11 dans le groupe « sans ATB IV ». Trois patients du groupe « sans ATB IV » ont préalablement été exclus de l'analyse étant donné qu'ils avaient reçu une antibiothérapie *per os* ou inhalée entre J0 et J90 ou dans les 3 mois précédant l'inclusion. Les patients ayant eu une cure d'ATB IV étaient dissociés des patients n'ayant reçu aucun antibiotique (toutes voies confondues) entre J0 et J90. L'analyse statistique a été réalisée sur l'ensemble des noeuds taxonomiques.

Après ajustement des p-valeurs, aucun noeud taxonomique ne semblait statistiquement différent en termes de quantité, à J0, entre les groupes « ATB IV » et « sans ATB IV ». Les deux groupes étaient donc comparables à J0. La figure 15 représente la proportion de chaque phylum dans ces deux groupes.

La figure 16 illustre la répartition de chaque phylum sur l'ensemble des échantillons à J0 (les deux groupes compris).

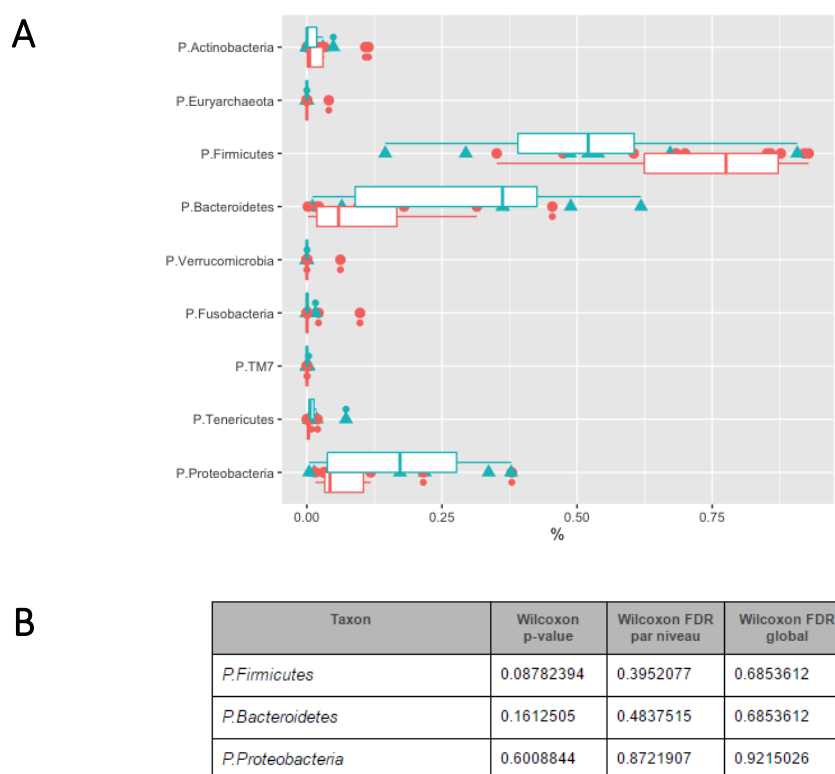


Figure 15 : Comparaison des échantillons à J0 entre les groupes « ATB IV » et « sans ATB IV »
 A : Proportion de chaque phylum à J0 entre les groupes « ATB IV » (bleu) et « sans ATB IV » (rouge)
 B : Analyse statistique des principaux phyla à J0 entre les groupes « ATB IV » et « sans ATB IV »

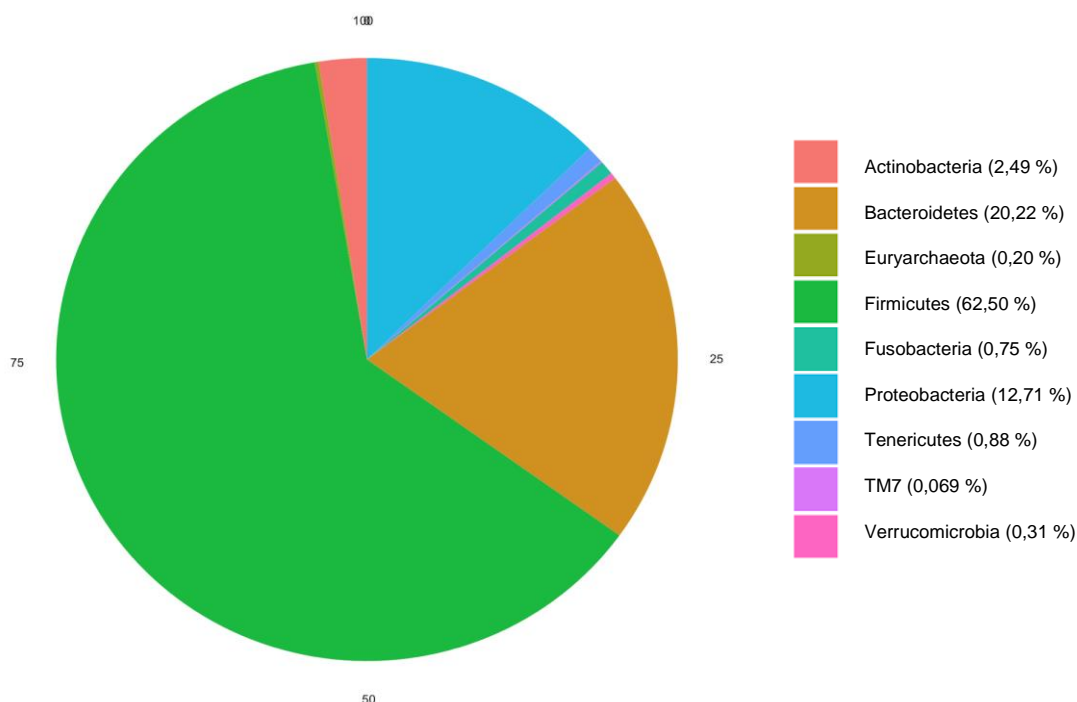


Figure 16 : Proportion de chaque phylum à J0

Les valeurs correspondent à la moyenne de chaque phylum sur l'ensemble des échantillons à J0

5.4. Evolution du microbiote dans les groupes « ATB IV » et « sans ATB IV » entre J0 et J90

L'analyse portait sur les 7 patients du groupe « ATB IV » et les 11 patients du groupe « sans ATB IV ». L'analyse statistique a été faite en mode "non païré", sur l'ensemble des noeuds taxonomiques.

La première question était de savoir si une bactérie était sous ou surreprésentée durant le suivi des patients. Nous avons donc réalisé une comparaison quantitative de chaque noeud taxonomique, entre les différents moments de prélèvement (J0, J45 et J90), à l'aide des tests de Student et Wilcoxon.

Après ajustement des p-valeurs, aucun noeud taxonomique ne semblait statistiquement différent en termes de quantité entre J0 et J45, entre J45 et J90 et entre J0 et J90 dans le groupe « ATB IV » (voir Annexes 8 à 10).

Après ajustement des p-valeurs, aucun noeud taxonomique ne semblait statistiquement différent en termes de quantité entre J0 et J90 dans le groupe « sans ATB IV » (Annexe 11).

La deuxième question était de savoir si la diversité du microbiote intestinal était impactée par la cure d'ATB IV, évaluée grâce à l'indice de Shannon et au score de Sorenson.

L'indice de Shannon est une approche quantitative de la diversité bactérienne, prenant en compte le nombre d'espèces et leur proportion respective. Il n'apporte pas d'information qualitative sur cette diversité, car il ne tient pas compte de la composition des échantillons en termes d'espèces présentes. Il peut donc être identique entre deux échantillons qui ont le même nombre d'espèces, dans la même proportion, mais dont aucune espèce est commune entre ces deux échantillons.

Dans le groupe « ATB IV », en se plaçant au niveau du « genre », l'indice de Shannon semblait diminuer à J45 puis être supérieur à J90 par rapport à J0. Il semblait stable entre J0 et J90 dans le groupe « sans ATB IV » (Figure 17 A).

En se plaçant au niveau de l'« ordre », l'indice de Shannon semblait être stable à J45 puis être augmenté à J90 dans le groupe « ATB IV ». Il semblait stable entre J0 et J90 dans le groupe « sans ATB IV » (Figure 17 B).

Un deuxième indice exprimant la diversité d'un échantillon est le score de Sorenson. Il apporte, cette fois-ci, des renseignements à la fois quantitatifs et qualitatifs. Il se calcule entre 2 échantillons. Le mode « pourcentage » permet d'observer le nombre de nœuds taxonomiques en commun entre deux échantillons (à un niveau phylogénique donné). La valeur est donc comprise entre 0 et 1. Le mode « ratio » permet d'observer l'évolution du nombre de nœuds taxonomiques entre les 2 échantillons (toujours à un niveau phylogénique donné). La valeur du ratio peut être supérieure à 1 si le second échantillon contient plus de nœuds. Quand le pourcentage baisse, il est possible d'observer un ratio constant si les nœuds taxonomiques qui disparaissent sont compensés par d'autres nœuds.

La figure 18 représente le score de Sorenson au niveau du « genre », chez les patients du groupe « ATB IV ». Il y avait en moyenne 60,7 % de nœuds communs entre J0 et J90, tandis que le ratio avait tendance à diminuer entre J0 et J90, signifiant que le nombre de genres bactériens différents était moins important à J90.

La figure 19 représente le score de Sorenson au niveau du « genre », chez les patients du groupe « sans ATB IV ». Il y avait en moyenne 62,7 % de nœuds communs entre J0 et J90, tandis que le ratio avait tendance à rester stable entre J0 et J90.

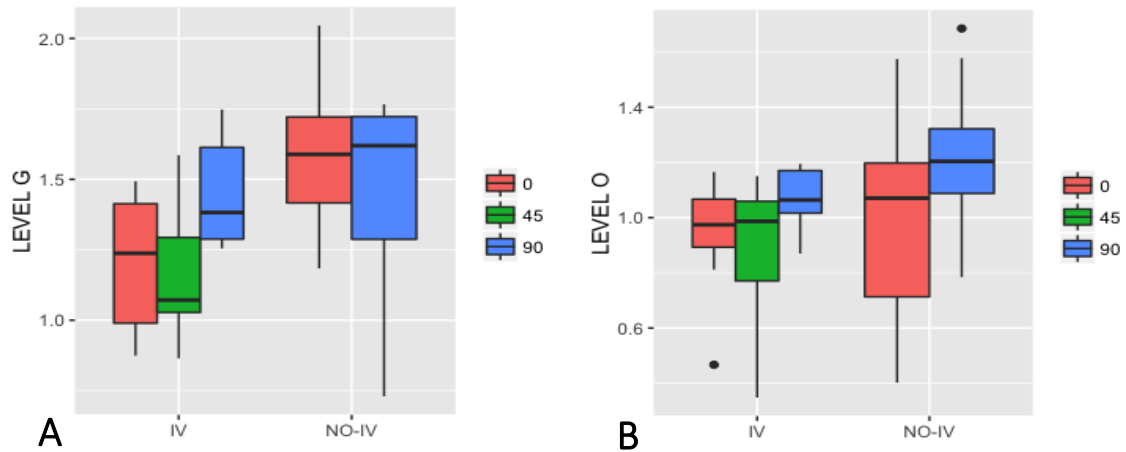


Figure 17 : Indice de diversité de Shannon à J0, J45 et J90 pour le groupe « ATB IV » (IV) et « sans ATB IV » (NO-IV), au niveau du « genre » (A) et de l'« ordre » (B)

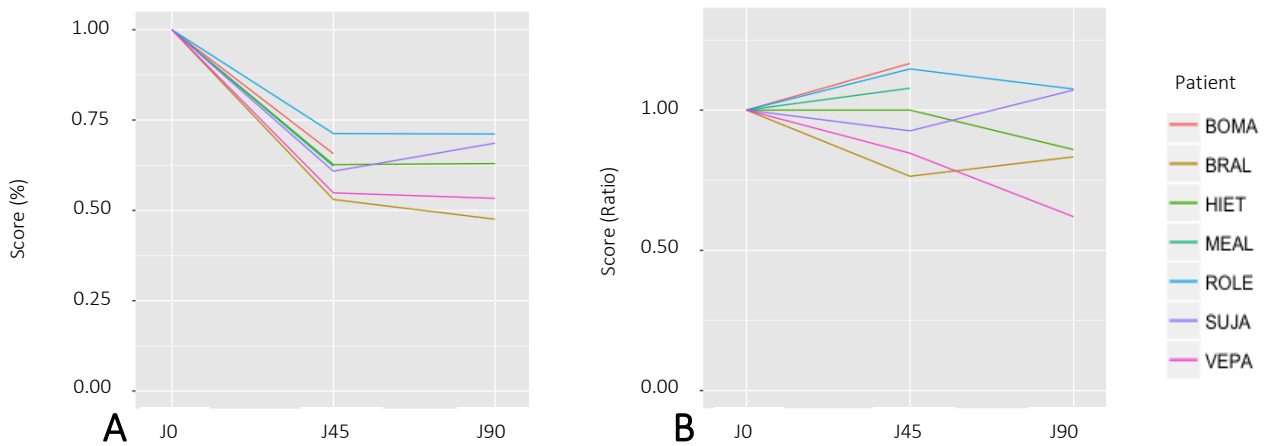


Figure 18 : Score de Sorenson pour le groupe « ATB IV » au niveau du « genre »
 A : mode « Pourcentage » et B : mode « Ratio »

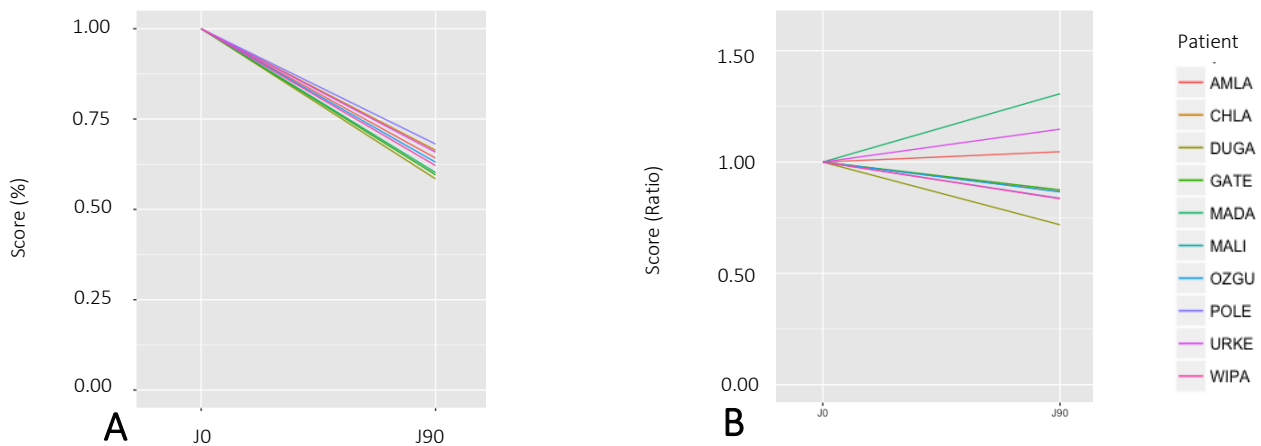


Figure 19 : Score de Sorenson pour le groupe « sans ATB IV » au niveau du « genre »
 A : mode « Pourcentage » et B : mode « Ratio »

5.5. Résultats de la calprotectine fécale

Le dosage de la calprotectine fécale était disponible pour 43 échantillons sur les 49 (soit 88%) (Tableau 2 et Figure 20). Elle n'a pas pu être dosée pour 6 des échantillons car la quantité de selles était insuffisante. Quinze patients (71%) sur les 21 inclus avaient au moins une fois une calprotectine fécale supérieure à 100 µg/g durant le suivi, pouvant témoigner d'une inflammation digestive. La cinétique de la calprotectine fécale durant le suivi est représentée dans la figure 20. Parmi les 7 patients du groupe « cure IV », la calprotectine à J90 (post antibiotique) était supérieure à celle de J0 (pré antibiotique) chez 5 d'entre eux et elle restait stable entre J0 et J90 pour un patient. Il était impossible de conclure pour le dernier patient de ce groupe car la valeur à J90 manquait (Figure 21A). Parmi les 11 patients du groupe « sans cure IV », la calprotectine augmentait entre J0 et J90 chez 7 d'entre eux, restait stable pour 2 patients et baissait pour 1 patient. Il était impossible de conclure pour les 2 derniers patients de ce groupe car les valeurs à J0 ou J90 manquaient (Figure 21B). L'inflammation digestive n'était pas significativement différente entre le groupe « ATB IV » et le groupe « sans ATB IV » (test de Fisher avec une p-value : 0,7483, intervalle de confiance à 95% [0.1603 ; 2.8571]).

Patient	J0	J45	J90
BRAL	70	146	> 300
HIET	50	140	149
MEAL	182	50	227
ROLE	143	200	> 300
SUJA	50	DM	DM
VEPA	50	66	78
BOMA	70	DM	68

A **Groupe « ATB IV »**

Patient	J0	J90
AMLA	> 300	DM
CHLA	50	122
DEMA*	50	> 300
DUGA	70	> 300
GATE	219	> 300
KANA	50	50
MADA	77	> 300
MALI	139	> 300
OPNA*	91	69
OZGU	DM	128
POLE	> 300	> 300
SALO*	91	DM
URKE	236	157
WIPA	104	> 300

B **Groupe « sans ATB IV »**

Tableau 2 : Valeur de la calprotectine fécale dans le groupe « ATB IV » (A) et le groupe « sans ATB IV » (B)

En rouge, les valeurs > 100 µg/g, seuil proposé par Canani *et al.*⁵⁸. DM : donnée manquante

* : exclu de l'analyse car ayant reçu des antibiotiques durant le suivi

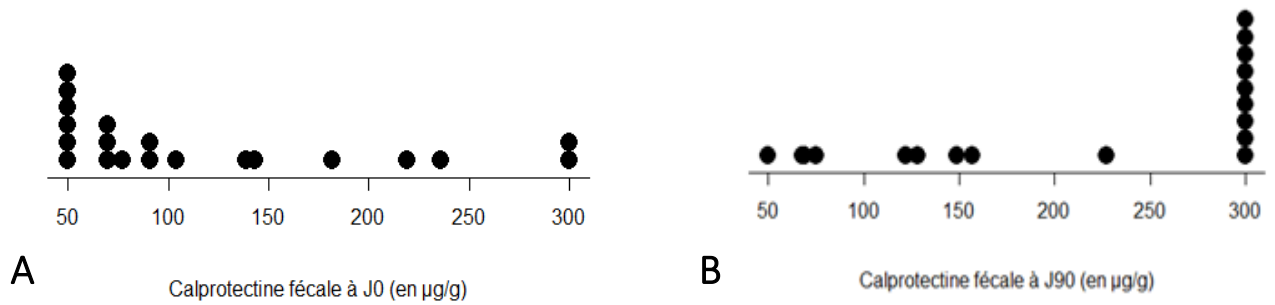


Figure 20 : Répartition de la calprotectine fécale à J0 (A) et à J90 (B) (indépendamment de l'assignation au groupe « ATB IV » ou « sans ATB IV »).
 Les valeurs à 300 µg/g correspondent aux valeurs ≥ 300 µg/g.

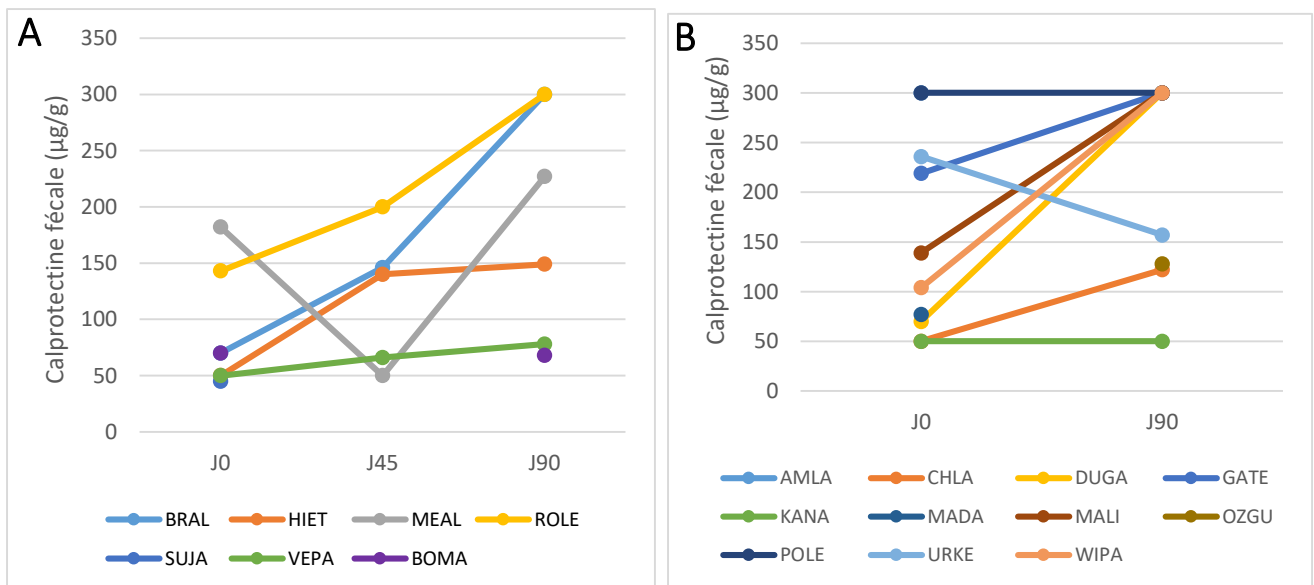


Figure 21 : Cinétique de la calprotectine fécale dans le groupe « ATB IV » (A) et le groupe « sans ATB IV » (B)
 Les valeurs à 300 µg/g correspondent aux valeurs ≥ 300 µg/g (seuil de détection du laboratoire).

5.6. Inflammation digestive et microbiote intestinal

Il n'y avait pas de corrélation significative entre l'inflammation digestive et les résultats du séquençage. En effet, aucune bactérie n'était discriminante entre le groupe « inflammation intestinale » (calprotectine $\geq 100 \mu\text{g/g}$) et « sans inflammation intestinale » (calprotectine $< 100 \mu\text{g/g}$) pour les niveaux taxonomiques « Ordre » et « Genre » (Annexe 12), ni pour les autres niveaux taxonomiques. En choisissant un seuil différent de calprotectine fécale, à $250 \mu\text{g/g}$, proposé dans le suivi de la maladie de Crohn pour différencier une maladie en poussée d'une maladie en rémission⁶², on obtenait un résultat significatif pour le genre *Streptococcus* (p-valeur corrigée = 0,04205), qui se répercutait sur les rangs taxonomiques supérieurs (Tableau 3). Si on comparait la répartition de *Streptococcus* entre les deux groupes (calprotectine ≥ 250 versus $< 250 \mu\text{g/g}$), on observait bien une nette différence avec une surreprésentation (ratio = 2,5 ; p-valeur corrigée = 0,04205) de *Streptococcus* dans le groupe avec une calprotectine $\geq 250 \mu\text{g/g}$ (Figure 22).

Taxon	Wilcoxon p-value	Wilcoxon FDR par niveau
Bacilli (Classe)	0.0006616422	0.009262991
Lactobacillales (Ordre)	0.0005710085	0.011420169
Streptococcaceae (Famille)	0.0015231758	0.048741625
Streptococcus (Genre)	0.0007647086	0.042058975

Tableau 3 : Comparaison du microbiote intestinal en fonction de la valeur de la calprotectine fécale, avec un seuil de calprotectine à $250 \mu\text{g/g}$.

Comparaison statistique avec le test de Wilcoxon, à tous les niveaux taxonomiques.

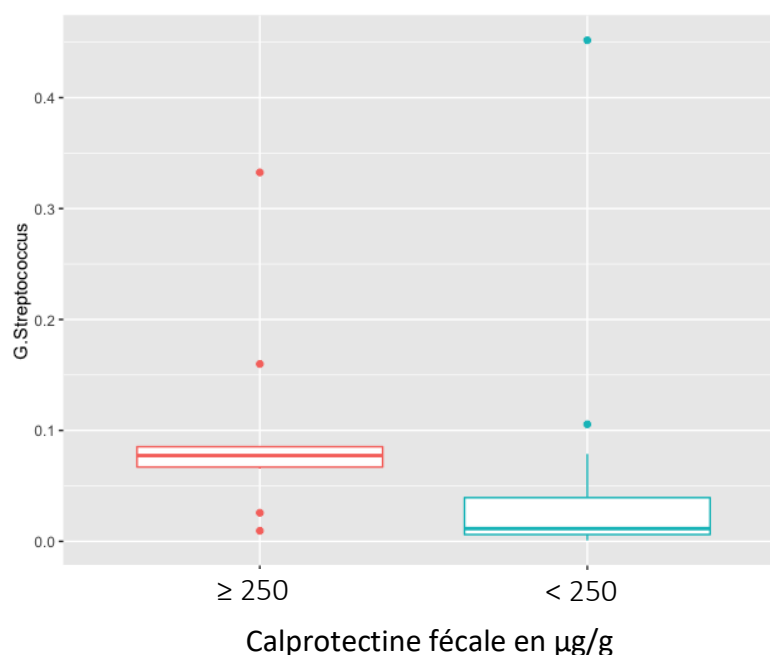


Figure 22 : Répartition des *Streptococcus* en fonction de la valeur de la calprotectine fécale (comptage normalisé), avec un seuil de calprotectine à $250 \mu\text{g/g}$.

5.7. Etude de la corrélation entre l'inflammation intestinale et les symptômes digestifs ou la qualité de vie

Les échantillons étaient pris indépendamment du temps (J0/J45/J90). Il n'y avait pas de corrélation entre les résultats des questionnaires sur la qualité de vie ou sur les symptômes digestifs et l'inflammation intestinale, avec un seuil de calprotectine fécale fixé à 100 ou à 250 $\mu\text{g/g}$ (Tableau 4 et 5).

L'analyse des sous-groupes des questionnaires (symptôme par symptôme) a retrouvé, par contre, une corrélation entre l'autoévaluation de la diarrhée par les enfants et l'inflammation digestive (en prenant un seuil de calprotectine à 100 $\mu\text{g/g}$). Contre toute attente, le groupe avec une inflammation digestive avait un meilleur score de diarrhée (moyenne = 88, écart type = 14) que le groupe sans inflammation digestive (moyenne = 74, écart type = 21) avec une valeur de p significative ($p = 0,026$ d'après le test de Student avec $\alpha = 0,05$). Autrement dit, les enfants sans inflammation digestive se plaignaient davantage de diarrhée.

5.8. Etude de la corrélation entre le microbiote intestinal et les symptômes digestifs ou la qualité de vie

Il n'y avait pas de corrélation significative entre le score total des questionnaires sur la qualité de vie ou sur les symptômes digestifs et les résultats du séquençage. Aucune bactérie ne différenciait les enfants les plus gênés des moins gênés, peu importe le niveau taxonomique de l'analyse. L'analyse des sous-groupes des questionnaires, notamment de l'item « diarrhée », ne retrouvait pas de nœud taxonomique statistiquement différent en termes de quantité, entre les patients symptomatiques et asymptomatiques (Annexe 13)

5.9. Inflammation digestive et résultats de la coproculture

Il n'y avait pas de corrélation significative entre l'inflammation intestinale et le taux d'*Escherichia Coli* donné par coproculture quantitative, que l'on prenne un seuil de calprotectine fécale à 100 $\mu\text{g/g}$ ($p = 0,217$ d'après le test de Student avec $\alpha = 0,05$) ou un seuil à 250 $\mu\text{g/g}$ ($p = 0,330$ d'après le test de Student avec $\alpha = 0,05$).

Inflammation digestive	Qualité de vie (Réponses des enfants)		Symptômes digestifs (Réponses des enfants)		Qualité de vie (Réponses des parents)		Symptômes digestifs (Réponses des parents)	
	Moyenne (ET)	p*	Moyenne (ET)	p*	Moyenne (ET)	p*	Moyenne (ET)	p*
Oui (n=25)	81,9 (9,2)	0,516	89,3 (9,1)	0,503	79,5 (12,7)	0,623	87,6 (9,4)	0,334
Non (n=18)	83,7 (8,5)		87,5 (8,2)		77,6 (11,6)		90,1 (7,4)	

Tableau 4 : Etude de la corrélation entre la qualité de vie ou les symptômes digestifs et l'inflammation digestive avec un seuil de calprotectine à 100 µg/g.

Moyenne de 0 à 100 : 0 = toujours gêné, 100 = jamais gêné

Inflammation digestive : Oui : calprotectine ≥ 250 µg/g ; Non : calprotectine < 250 µg/g

n : nombre de patients ; ET : écart type ; *p-valeur : test de Student ($\alpha=0.05$)

Inflammation digestive	Qualité de vie (Réponses des enfants)		Symptômes digestifs (Réponses des enfants)		Qualité de vie (Réponses des parents)		Symptômes digestifs (Réponses des parents)	
	Moyenne (ET)	p*	Moyenne (ET)	p*	Moyenne (ET)	p*	Moyenne (ET)	p*
Oui (n=11)	84,1 (7,8)	0,587	89,3 (11,3)	0,793	81,4 (7,1)	0,299	87,8 (8,0)	0,669
Non (n=32)	82,4 (9,2)		88,2 (8,0)		77,9 (13,1)		89,1 (8,7)	

Tableau 5 : Etude de la corrélation entre la qualité de vie ou les symptômes digestifs et l'inflammation digestive avec un seuil de calprotectine à 250 µg/g.

Moyenne de 0 à 100 : 0 = toujours gêné, 100 = jamais gêné

Inflammation digestive : Oui : calprotectine ≥ 250 µg/g ; Non : calprotectine < 250 µg/g

n : nombre de patients ; ET : écart type ; *p-valeur : test de Student ($\alpha=0.05$)

6. Discussion

L'objectif principal de notre étude était d'étudier l'impact de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal chez les enfants atteints de mucoviscidose. Les conséquences sur la flore intestinale des cures d'antibiotiques intraveineuses semblent être limitées. Aucun nœud taxonomique (tous niveaux confondus) ne paraissait différent — en termes de quantité — entre J0, J45 et J90 dans le groupe « ATB IV ». Pour autant, le microbiote intestinal n'était pas parfaitement stable chez ces patients, comme l'indique le score de Sorenson. Il y avait une fluctuation chez un même patient entre J0 et J90, dans le groupe « ATB IV » comme dans le groupe « sans ATB IV ».

Cette conclusion pouvait être prévisible dans la mesure où la voie intraveineuse n'a pas la meilleure disponibilité intra luminale. Une étude chez la souris conforte cette hypothèse en montrant que la voie *per os* a davantage de conséquences que la voie IV sur le microbiote intestinal, pour un antibiotique et une posologie donnés⁶³. Les infections digestives, comme les colites pseudomembraneuses à *Clostridium difficile*, se traitent d'ailleurs préférentiellement avec des antibiotiques *per os*. De plus, le mucus intestinal est plus épais chez les patients atteints de mucoviscidose, impactant très probablement la diffusion des antibiotiques intraveineux dans la lumière digestive.

Cependant certaines limites de notre étude pondèrent ces conclusions. Le nombre de patients était insuffisant pour faire des analyses « pairées », où le patient est son propre témoin, ce qui aurait été préférable, car plus représentatif de la réalité. De plus, les patients recevaient différentes classes d'antibiotiques. Un nombre plus important de patients aurait pu nous permettre de faire des sous-groupes en fonction des antibiotiques reçus, et de pouvoir étudier spécifiquement l'impact d'une classe donnée sur le microbiote intestinal.

Les calculs de diversité (indice de Shannon et score de Sorenson) sont à interpréter avec précaution dans notre étude. En effet, lors du séquençage, nous n'avons pas pu atteindre la courbe de raréfaction. En d'autres termes, nous avons séquencé la plus grande partie des bactéries présentes, mais certaines souches minoritaires ont pu être manquées. Nous ne pouvons donc pas dire si la variation de la diversité de nos échantillons est vraiment réelle, ou si elle est due à la fluctuation du séquençage aléatoire des bactéries minoritaires. Ce rendement aurait pu être optimisé en mettant un plus petit nombre d'échantillons par run.

Enfin, nous avons vu en introduction que la dysbiose est multifactorielle dans le cadre de la mucoviscidose, résultante de la maldigestion des nutriments (due à une insuffisance pancréatique jamais totalement corrigée par l'enzymothérapie), des modifications

physicochimiques du mucus (pH, viscosité) ou encore de l'inflammation digestive. L'impact de l'antibiothérapie a peut être été atténué par ces autres facteurs.

Parmi nos échantillons, quatre n'ont pas pu être séquencés. Trois d'entre eux n'ont jamais été amplifiés par PCR malgré plusieurs tentatives, probablement en raison de la libération d'inhibiteurs de PCR (lipides et hème) lors de l'extraction. Le dernier échantillon a été amplifié, mais a dû être perdu lors du démultiplexage (le séquenceur n'a pas réussi à l'assigner à un patient et l'a mis dans les séquences « Undetermined »).

Le taux d'assignation est comparable à celui d'autres travaux effectués au sein de la Plateforme et à celui retrouvé dans la plupart des études. Il nous conforte donc dans l'idée que la région hypervariable choisie (région V4) était assez discriminante pour l'identification des bactéries présentes dans le microenvironnement intestinal. En multipliant les paires d'amorces et donc les régions hypervariables séquencées, nous aurions pu augmenter le taux d'assignation au niveau de l'espèce, au prix d'un coût plus important et d'une préparation de banques d'ADN plus longue et fastidieuse, et sans bénéfice évident sur les conclusions à en tirer.

Quinze patients (71%), parmi les 21 de notre cohorte, avaient une calprotectine supérieure à 100 µg/g au moins une fois durant le suivi, ce qui conforte l'existence d'une inflammation intestinale de bas grade dans la mucoviscidose²⁷. Nous avons retrouvé une tendance à l'augmentation de la calprotectine fécale après les cures d'antibiothérapie (5 patients sur les 7 du groupe). Ce résultat est plutôt surprenant puisque dans un des modèles murins, l'inflammation digestive était diminuée après la prise d'antibiotique³⁴, cependant la voie d'administration était orale. Enfin, ces résultats sont néanmoins à prendre avec précautions du fait du nombre de patients et d'une tendance similaire entre J0 et J90 chez les patients n'ayant pas reçu d'antibiotique (6 patients parmi les 11 du groupe).

Aucune étude chez l'Homme n'a encore établi un profil particulier de dysbiose corrélé à l'inflammation digestive, et le lien de causalité repose plutôt, à l'heure actuelle, sur des preuves indirectes comme la diminution significative de l'inflammation intestinale chez les souris mutées traitées par antibiotiques *per os*³⁶. Avec un seuil de calprotectine à 100 µg/g, nous n'avons pas trouvé de dysbiose particulière discriminant les patients avec une inflammation intestinale de ceux n'en ayant pas. En prenant un seuil de calprotectine fécale à 250 µg/g, les *Streptococcus* — dont certaines espèces ont un pouvoir pathogène — étaient significativement surreprésentés dans le groupe de patients avec une calprotectine supérieure à 250 µg/g (ratio = 2,5 ; p-valeur corrigée = 0,04205). Il serait intéressant de confirmer ce constat par une autre étude, en complétant le séquençage haut débit par des

PCR quantitatives ciblant spécifiquement les *Streptococcus*. Si ces résultats se confirment, une cure courte d'antibiotique par voie orale (ciblant les *Streptococcus*) pourrait être envisagée pour diminuer cette inflammation intestinale. L'autre question est de savoir s'il est pertinent de prendre en charge cette inflammation alors qu'elle est asymptomatique. Les éléments en faveur d'un traitement seraient d'améliorer le pronostic nutritionnel, diminuer le risque de cirrhose hépatique qui semble être corrélé à l'inflammation intestinale⁵³ et, enfin, de diminuer le risque de survenue de cancer colorectal dont la prévalence est plus importante chez les patients atteints de mucoviscidose⁶⁴.

Hoffman *et al*³⁵ ont trouvé une corrélation entre l'abondance en *E. coli* et la calprotectine fécale, ce que nous n'avons pas pu mettre en évidence dans notre étude, ni par séquençage haut débit, ni par coproculture quantitative. Une quantification plus précise par PCR quantitative aurait pu mieux répondre à cette question.

Une autre approche pour étudier la corrélation entre la dysbiose et l'inflammation intestinale est d'étudier les métabolites bactériens. Il semblerait que les patients atteints de mucoviscidose aient une production plus faible d'acide gras à courte chaîne, un métabolite ayant des propriétés énergétiques et anti-inflammatoires sur les colonocytes. Cette baisse semble être corrélée à l'intensité de l'inflammation intestinale⁶⁵, constituant une piste thérapeutique potentielle.

Enfin, rappelons que l'analyse du microbiote fécal n'est qu'une analyse partielle du microbiote intestinal. Il se distingue des analyses du microbiote muqueux⁶⁶, ce qui est d'autant plus vrai dans le cadre de la mucoviscidose où le mucus est anormalement visqueux. Les bactéries sont alors moins solubles et adhèrent plus à la paroi³⁶. De plus, chez la souris, la dysbiose est en partie caractérisée par une augmentation de l'abondance bactérienne³⁶⁻³⁸, notamment au niveau de l'intestin. Avec l'analyse du microbiote fécal, nous ne pouvons pas appréhender cet aspect, qui pourrait tout à fait jouer un rôle dans la physiopathologie de l'inflammation intestinale de la mucoviscidose. Pour mieux caractériser la dysbiose dans la mucoviscidose, il conviendrait de faire des biopsies intestinales, dans différentes régions (duodénum *versus* iléon) avec des prélèvements superficiels (luminaux) et profonds (muqueux). Cette approche est néanmoins plus invasive et pose des questions sur le plan éthique.

Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre l'inflammation intestinale et le score global de la qualité de vie ou des symptômes digestifs. Ces résultats ne sont pas surprenants car, dans la maladie de Crohn, il existe une mauvaise corrélation entre les symptômes

digestifs (évalué par le Crohn Disease Index Activity) et l'inflammation digestive (mesurée par le score endoscopique CDEIS)⁶⁷. Néanmoins, le groupe avec une inflammation digestive avait un meilleur score de diarrhée que le groupe sans inflammation digestive (88 *versus* 74 respectivement, $p = 0,026$). Autrement dit, les enfants sans inflammation digestive se plaignaient davantage de diarrhée. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'inflammation digestive dans la mucoviscidose est peut-être liée à un transit ralenti, favorisant la pullulation bactérienne. Les patients ayant la diarrhée réguleraient alors mieux leur microbiote, diminuant ainsi le risque de pullulation et donc d'inflammation digestive.

De manière plus générale, la difficulté à différencier le microbiote de deux groupes pouvait être aussi liée au fait que nous avons exclu les patients suffisants pancréatiques, et donc gardé les patients les plus sévères. Or, l'intensité de la dysbiose est corrélée à la sévérité de la maladie³³. Nous avons donc peut-être une dysbiose déjà installée au sein de notre cohorte et pas assez de patients pour mettre en évidence de faibles variations. L'analyse complète de cette cohorte doit comporter un nombre plus important d'échantillons séquencés, comprenant les prélèvements de 37 patients inclus au total (dont 13 avec une cure d'ATB IV).

7. Conclusion

La dysbiose dans la mucoviscidose n'est plus à démontrer, mais sa physiopathologie reste encore mal comprise et complexe, car multifactorielle. Nous n'avons pas retrouvé un impact majeur des cures d'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal. Sa composition semble varier après une cure d'ATB IV, sans pour autant que l'on puisse mettre en évidence un nœud taxonomique qui est sous ou surreprésenté en post antibiothérapie. Une inflammation intestinale était présente chez 71% des patients et semblait être corrélée à une surreprésentation de *Streptococcus* chez les patients ayant une calprotectine fécale supérieure à 250 µg/g. Ces résultats peuvent encourager la mise en place d'une étude interventionnelle évaluant l'efficacité de cures courtes d'antibiothérapie orale pour traiter l'inflammation intestinale. Enfin, la présence de diarrhée semblait être inversement corrélée à la présence d'inflammation intestinale, suggérant que ce symptôme puisse être un mécanisme régulant la pullulation bactérienne, afin de prévenir l'inflammation intestinale.

Cette étude préliminaire retrouve un impact limité de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal mais semble conforter le lien entre la dysbiose et l'inflammation intestinale.

8. Bibliographie

1. Landman, C. & Quévrain, E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *Rev. Médecine Interne* **37**, 418–423 (2016).
2. Jandhyala, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21**, 8787–8803 (2015).
3. Bienenstock, J., Kunze, W. & Forsythe, P. Microbiota and the gut-brain axis. *Nutr. Rev.* **73 Suppl 1**, 28–31 (2015).
4. van Best, N., Hornef, M. W., Savelkoul, P. H. M. & Penders, J. On the origin of species: Factors shaping the establishment of infant's gut microbiota. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **105**, 240–251 (2015).
5. Yatsunenکو, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**, 222–227 (2012).
6. Gerber, G. K. The dynamic microbiome. *FEBS Lett.* **588**, 4131–4139 (2014).
7. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. *Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body.* (2016).
8. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**, 59–65 (2010).
9. Claesson, M. J. *et al.* Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl 1**, 4586–4591 (2011).
10. Petersen, C. & Round, J. L. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell. Microbiol.* **16**, 1024–1033 (2014).
11. Laubereau, B. *et al.* Caesarean section and gastrointestinal symptoms, atopic dermatitis, and sensitisation during the first year of life. *Arch. Dis. Child.* **89**, 993–997 (2004).
12. Agosti, M., Vegni, C., Gangi, S., Benedetti, V. & Marini, A. Allergic manifestations in very low-birthweight infants: a 6-year follow-up. *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl.* **91**, 44–47 (2003).
13. Huh, S. Y. *et al.* Delivery by caesarean section and risk of obesity in preschool age children: a prospective cohort study. *Arch. Dis. Child.* **97**, 610–616 (2012).
14. Schippa, S. *et al.* Dominant genotypes in mucosa-associated *Escherichia coli* strains from pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 661–672 (2009).
15. Cardwell, C. R. *et al.* Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* **51**, 726–735 (2008).
16. Costello, M.-E., Robinson, P. C., Benham, H. & Brown, M. A. The intestinal microbiome in human disease and how it relates to arthritis and spondyloarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **29**, 202–212 (2015).
17. Buie, T. Potential Etiologic Factors of Microbiome Disruption in Autism. *Clin. Ther.* **37**, 976–983 (2015).
18. De Angelis, M., Francavilla, R., Piccolo, M., De Giacomo, A. & Gobbetti, M. Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes* **6**, 207–213 (2015).
19. Yarza, P. *et al.* Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 635–645 (2014).

20. Vaincre la mucoviscidose. Registre français de la mucoviscidose. (2014).
21. Corvol, H. *et al.* Les enjeux de la médecine personnalisée appliquée à la mucoviscidose. *Arch. Pédiatrie* **22**, 778–786 (2015).
22. Gelfond, D., Ma, C., Semler, J. & Borowitz, D. Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. *Dig. Dis. Sci.* **58**, 2275–2281 (2013).
23. Garcia, M. A. S., Yang, N. & Quinton, P. M. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J. Clin. Invest.* **119**, 2613–2622 (2009).
24. Munck, A. Cystic fibrosis: evidence for gut inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **52**, 180–183 (2014).
25. Raia, V. *et al.* Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Res.* **47**, 344–350 (2000).
26. Weiss, B. *et al.* Probiotic supplementation affects pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *Pediatr. Pulmonol.* **45**, 536–540 (2010).
27. Bruzzese, E. *et al.* Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20**, 813–819 (2004).
28. Werlin, S. L. *et al.* Evidence of Intestinal Inflammation in Patients With Cystic Fibrosis: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1** (2010). doi:10.1097/MPG.0b013e3181d1b013
29. Duytschaever, G. *et al.* Cross-sectional and longitudinal comparisons of the predominant fecal microbiota compositions of a group of pediatric patients with cystic fibrosis and their healthy siblings. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8015–8024 (2011).
30. Duytschaever, G. *et al.* Dysbiosis of bifidobacteria and Clostridium cluster XIVa in the cystic fibrosis fecal microbiota. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **12**, 206–215 (2013).
31. Bruzzese, E. *et al.* Disrupted intestinal microbiota and intestinal inflammation in children with cystic fibrosis and its restoration with Lactobacillus GG: a randomised clinical trial. *PLoS One* **9**, e87796 (2014).
32. Nielsen, S. *et al.* Disrupted progression of the intestinal microbiota with age in children with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* **6**, 24857 (2016).
33. Schippa, S. *et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) allelic variants relate to shifts in faecal microbiota of cystic fibrosis patients. *PLoS One* **8**, e61176 (2013).
34. Scanlan, P. D. *et al.* Gut dysbiosis in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **11**, 454–455 (2012).
35. Hoffman, L. R. *et al.* Escherichia coli dysbiosis correlates with gastrointestinal dysfunction in children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **58**, 396–399 (2014).
36. Norkina, O., Burnett, T. G. & De Lisle, R. C. Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine. *Infect. Immun.* **72**, 6040–6049 (2004).
37. De Lisle, R. C. Altered transit and bacterial overgrowth in the cystic fibrosis mouse small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G104–111 (2007).
38. Lynch, S. V. *et al.* Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice exhibit aberrant gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* **4**, 41–47 (2013).

39. Madan, J. C. *et al.* Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *mBio* **3**, (2012).
40. Hoen, A. G. *et al.* Associations between Gut Microbial Colonization in Early Life and Respiratory Outcomes in Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* **167**, 138–147.e3 (2015).
41. Stoltz, D. A. *et al.* Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci. Transl. Med.* **2**, 29ra31 (2010).
42. Ooi, C. Y. *et al.* Fecal Human β -Defensin 2 in Children with Cystic Fibrosis: Is There a Diminished Intestinal Innate Immune Response? *Dig. Dis. Sci.* **60**, 2946–2952 (2015).
43. Van Biervliet, S., Eggermont, E., Mariën, P., Hoffman, I. & Veereman, G. Combined impact of mucosal damage and of cystic fibrosis on the small intestinal brush border enzyme activities. *Acta Clin. Belg.* **58**, 220–224 (2003).
44. Clarke, L. L. *et al.* Abnormal Paneth cell granule dissolution and compromised resistance to bacterial colonization in the intestine of CF mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **286**, G1050-1058 (2004).
45. Döring, G., Bareth, H., Gairing, A., Wolz, C. & Botzenhart, K. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* sputum and stool isolates from cystic fibrosis patients: evidence for intestinal colonization and spreading into toilets. *Epidemiol. Infect.* **103**, 555–564 (1989).
46. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 859–904 (2010).
47. De La Cochetière, M. F. *et al.* Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5588–5592 (2005).
48. Dodge, J. A. & Turck, D. Cystic fibrosis: nutritional consequences and management. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **20**, 531–546 (2006).
49. Hofmann, A. F. & Mysels, K. J. Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *J. Lipid Res.* **33**, 617–626 (1992).
50. Riordan, S. M. *et al.* Luminal bacteria and small-intestinal permeability. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**, 556–563 (1997).
51. Lindblad, A., Glaumann, H. & Strandvik, B. Natural history of liver disease in cystic fibrosis. *Hepatology. Baltim. Md* **30**, 1151–1158 (1999).
52. Debray, D., Kelly, D., Houwen, R., Strandvik, B. & Colombo, C. Best practice guidance for the diagnosis and management of cystic fibrosis-associated liver disease. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **10 Suppl 2**, S29-36 (2011).
53. Flass, T. *et al.* Intestinal lesions are associated with altered intestinal microbiome and are more frequent in children and young adults with cystic fibrosis and cirrhosis. *PloS One* **10**, e0116967 (2015).
54. Singh, V. V. & Toskes, P. P. Small Bowel Bacterial Overgrowth: Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* **7**, 19–28 (2004).
55. del Campo, R. *et al.* Improvement of digestive health and reduction in proteobacterial populations in the gut microbiota of cystic fibrosis patients using a *Lactobacillus reuteri* probiotic preparation: a double blind prospective study. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **13**, 716–722 (2014).
56. Jafari, S.-A. *et al.* Effects of probiotics on quality of life in children with cystic fibrosis; a randomized controlled trial. *Iran. J. Pediatr.* **23**, 669–674 (2013).

57. Conférence de consensus. Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. Recommandations. *Arch. Pédiatrie* **10**, 280–294 (2003).
58. Berni Canani, R. *et al.* Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig. Liver Dis.* **36**, 467–470 (2004).
59. Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D. & Dangl, J. L. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nat. Methods* **10**, 999–1002 (2013).
60. Liu, Z., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L. & Knight, R. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.* **36**, e120 (2008).
61. Claesson, M. J. *et al.* Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* **38**, e200 (2010).
62. D’Haens, G., Ferrante, M. & Vermeire, S. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Nfl Amm Bowel Dis* (2012).
63. Zhang, L., Huang, Y., Zhou, Y., Buckley, T. & Wang, H. H. Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3659–3666 (2013).
64. Niccum, D. E., Billings, J. L., Dunitz, J. M. & Khoruts, A. Colonoscopic screening shows increased early incidence and progression of adenomas in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **15**, 548–553 (2016).
65. Manor, O. *et al.* Metagenomic evidence for taxonomic dysbiosis and functional imbalance in the gastrointestinal tracts of children with cystic fibrosis. *Sci. Rep.* **6**, 22493 (2016).
66. Hong, P.-Y., Croix, J. A., Greenberg, E., Gaskins, H. R. & Mackie, R. I. Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and micro-heterogeneity. *PLoS One* **6**, e25042 (2011).
67. Mary, J. Y. & Modigliani, R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn’s disease: a prospective multicentre study. Groupe d’Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut* **30**, 983–989 (1989).

9. Annexes

Annexe 1 : Consignes de recueil de selles

- Le prélèvement de selles doit être réalisé dans des pots classiques de coproculture stérile (sans liquide).
- Le pot vous sera remis en consultation ou durant l'hospitalisation.
- Le prélèvement est à faire dans les 24h qui précèdent la consultation ou l'hospitalisation.
- Eviter le plus possible de toucher avec vos doigts l'intérieur du pot.
- Ne pas utiliser de papier toilette pour le prélèvement.
- Ne pas utiliser les prélèvements réalisés après l'administration d'un laxatif, d'un suppositoire de glycérine ou d'un lavement (ou lavement baryté).
- Lors du prélèvement, les selles ne doivent pas rentrer en contact avec l'urine
- Lors du prélèvement, les selles ne doivent pas rentrer en contact avec l'eau de la cuvette des toilettes.
- Une fois le prélèvement fait, vous pouvez le conserver en air ambiant.
- Le pot avec les selles est à ramener le jour de la consultation ou de l'hospitalisation. Il n'y a pas de condition de conservation particulière durant le transport, elles peuvent être acheminées en air ambiant.

Annexe 2 : Caractéristiques des différents milieux de cultures utilisés pour la coproculture quantitative

Milieux de culture	Dilution(s) à ensemercer	Conditions d'incubation
Sélénite	10 ⁻¹	37°C en aérobiose
BCP	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷	37°C en aérobiose
GS ANC	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷	37°C en aérobiose enrichie en CO ₂
CIN	10 ⁻¹	30°C en aérobiose
Hektoën	10 ⁻¹	37°C en aérobiose
Karmali	10 ⁻¹	37°C, microaérophilie
BLSE	10 ⁻¹	37°C en aérobiose

Tableau 5 : Protocole de mise en culture

Abréviations : BCP : Gélose au Bromocrésol Pourpre, GS ANC : Gélose Sang Acide Nalidixique Colistine, CIN : Milieu Cefsulodine – Irgasan – Novobiocine, BLSE : Béta-Lactamases à Spectre Etendu.

Le bouillon sélénite : utilisé pour l'enrichissement sélectif des salmonelles. La teneur en sélénite inhibe la croissance des micro-organismes autres que les salmonelles. A savoir que les *Pseudomonas* et les *Proteus* ne sont pas totalement inhibés. Une goutte du bouillon sélénite était ensemencée sur milieu Hektoën à H₂₄.

La gélose au Bromocrésol Pourpre (BCP) : peu sélectif, elle permet la croissance de bactéries peu exigeantes. Ce milieu permet d'évaluer la capacité des souches à fermenter le lactose contenu dans le milieu, grâce à un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol. Les bactéries capables de fermenter le lactose, dites « lactose + », vont acidifier le milieu qui va alors virer au jaune. Les bactéries dépourvues de cette fonction ne vont pas modifier la couleur du milieu.

La Gélose Sang Acide Nalidixique Colistine (GS ANC) : est un milieu riche, sélectionnant les bactéries à Gram positif. L'acide nalidixique et la colistine, présents dans le milieu, sont des antibiotiques inhibant les bactéries à Gram négatif. La lecture de l'hémolyse est un critère d'orientation, notamment pour les streptocoques. La présence d'un

halo d'éclaircissement complet, à bords nets, autour de la colonie témoigne d'une lyse des hématies contenues dans la gélose et de leur digestion totale de l'hémoglobine alors libérées. On parle d'hémolyse β . Un halo verdâtre indique une lyse des hématies mais une digestion partielle de l'hémoglobine avec formation de méthémoglobine. On parle d'hémolyse α . L'absence d'halo autour de la colonie correspond à l'absence d'hémolyse.

La gélose Cefsulodine – Irgasan – Novobiocine (CIN) : milieu sélectif pour l'isolement des *Yersinia*. La présence de sels biliaries, de cristal violet, d'irgasan et d'antibiotiques (cefsulodine et novobiocine) inhibe le développement des bactéries à Gram positif et de la plupart des bactéries à Gram négatif en sélectionnant les entérobactéries de l'espèce *Yersinia enterocolitica*. Ces dernières vont fermenter le mannitol et former de petites colonies à centre rouge entouré d'une zone translucide.

La gélose Hektoën : Est un milieu sélectif pour l'isolement des salmonelles et des shigelles. Les sels biliaries, agent sélectif, inhibent la culture des bactéries à Gram positif et limitent le développement des coliformes. L'orientation de l'identification est basée sur l'utilisation de 3 glucides contenus dans le milieu: (le lactose, le saccharose et la salicine) repérable grâce à un indicateur de pH (le bleu de bromothymol) combiné à un colorant (fuchsine). L'utilisation d'un ou plusieurs glucides par la souche bactérienne va entraîner une acidification du milieu et un changement de la coloration du milieu en « saumon ». La présence de thiosulfate et de citrate de fer permet la mise en évidence de la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) qui va se traduire macroscopiquement par des colonies à centre noir. La combinaison de ses critères phénotypiques va pouvoir permettre d'orienter l'identification :

Colonies saumon : Escherichia, Levinea, Citrobacter diversus, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Yersinia, Vibrio Cholera.

Colonies saumon à centre noir : Citrobacter freundii, Proteus vulgaris,

Colonies bleu-vert à centre noir : Suspicion de *Salmonella* H₂S+, à différencier de *Proteus mirabilis*.

Colonies bleu-vert : Suspicion de Shigella ou de *Salmonella* H₂S-, Pseudomonas, Hafnia, Providencia, Morganella.

La gélose Karmali : est un milieu sélectif pour l'isolement de *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*, composé entre autre d'une gélose au sang et d'antibiotiques

(céfopérazone, vancomycine et cycloheximide). Les colonies suspectes seront grises ou blanches, plates, à oxydase positive.

La gélose Béta-Lactamases à Spectre Etendu (BLSE) : est un milieu riche et sélectif (inhibition de la croissance des bactéries à Gram positif et des levures). Elle permet d'identifier les principales entérobactéries productrices de BLSE grâce à la présence de cefpodoxime et de substrats chromogéniques dans le milieu. Les bactéries productrices de β -glucuronidase (*Escherichia coli*) forment des colonies roses, celles productrices de β -glucosidase (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) forment des colonies vertes/bleues et celles exprimant une désaminase (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*) forment des colonies noires.

Un dernier outil peut aider à orienter l'identification d'une souche Gram négative, en recherchant une **activité oxydase**. Le test consiste à déposer une colonie sur un réactif, afin de mettre en évidence sa capacité à oxyder ce réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé, qui témoigne alors d'une activité oxydase.

Annexe 3 : Protocole d'extraction

- Dissolution d'une pointe de selles dans 200µL d'eau stérile
- 20µL de selles dissoutes, 180 µL de tampon ATL, 20 µL de protéinase K et 1µL de lysostaphine
- Incubation 2h à 56°C avec agitations répétées
- Rajout de 200 µL de tampon AL.
- Incubation 10 min à 56°C avec agitation toutes les 2 minutes au vortex.
- Rajout de 200 µL d'éthanol, afin de précipiter l'ADN
- Mélange manuel délicat pour ne pas briser les longs fragments d'ADN
- Transfert de la préparation sur une colonne de silice, chargée positivement grâce aux différents tampons utilisés jusque-là, permettant de capter l'ADN (chargé négativement) sur la colonne.
- Centrifugation à 6 000G pendant 1 minute
- Elimination de l'éluat et 1^{er} lavage de la colonne avec 500 µL du buffer AW1
- Centrifugation à 6 000G pendant 1 minute
- Elimination de l'éluat et 2^{ème} lavage de la colonne avec 500 µL buffer AW2
- Centrifugation à 20 000G pendant 3 minutes
- Elimination de l'éluat et élution de la colonne de silice avec 40 µL de tampon AE (qui change les charges positives de la colonne en charges négatives, afin de libérer l'ADN de la colonne)
- Centrifugation à 6 000 G pendant 1 minute.
- Récupération de l'éluat et mesure de la concentration d'acides nucléiques par spectrophotométrie (NanoDrop™)

Annexe 4 : Protocole de la PCR de la région hypervariable V4 du gène de l'ARNr 16S (figure 19)

- Mettre 30ng d'ADN dans un microtube à PCR et rajouter de l'eau stérile pour arriver à un volume final de 20 µL (mettre 1µL pour les échantillons correspondants aux blancs de l'étape précédente)
- Diluer les amorces au 1/10^{ème} (non conservable à cette dilution)
- Faire un mix, avec les amorces 515f (10 µM soit 2,5 µL/microtubes) et 806r (10µM soit 2,5 µL/microtubes) et le Master Mix Phusion GC buffer (25 µL/microtubes soit 1X). Majorer le volume final de 10% pour prendre en compte les volumes morts.
- Mélanger à la pipette puis centrifuger doucement
- Mettre dans le thermocycler (Veriti 96 well thermal cycle de Applied Biosystems®) : Programme « PCR méta 25 na 60c », comprenant :
 - 1 cycle à 98°C pendant 30s (pour l'activation enzymatique)
 - 25 cycles de 10s à 98°C (pour la dénaturation), puis de 30s à 60°C (pour l'hybridation des amorces) et puis de 45s à 72°C (pour élancement)
 - Un dernier cycle à 72°C pendant 7 minutes pour l'élancement finale

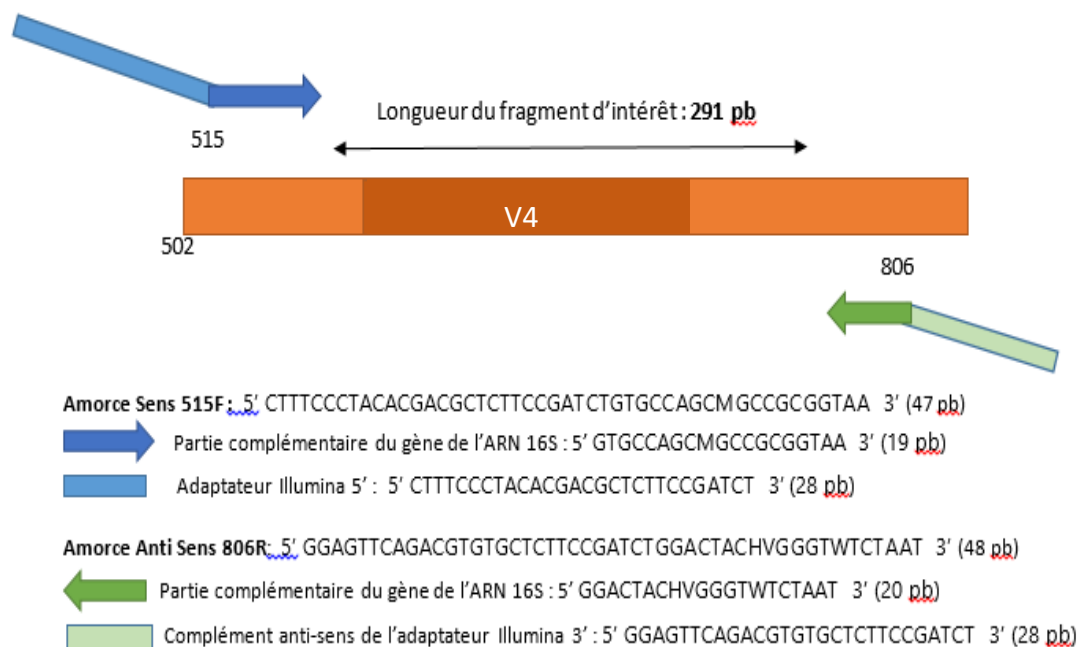
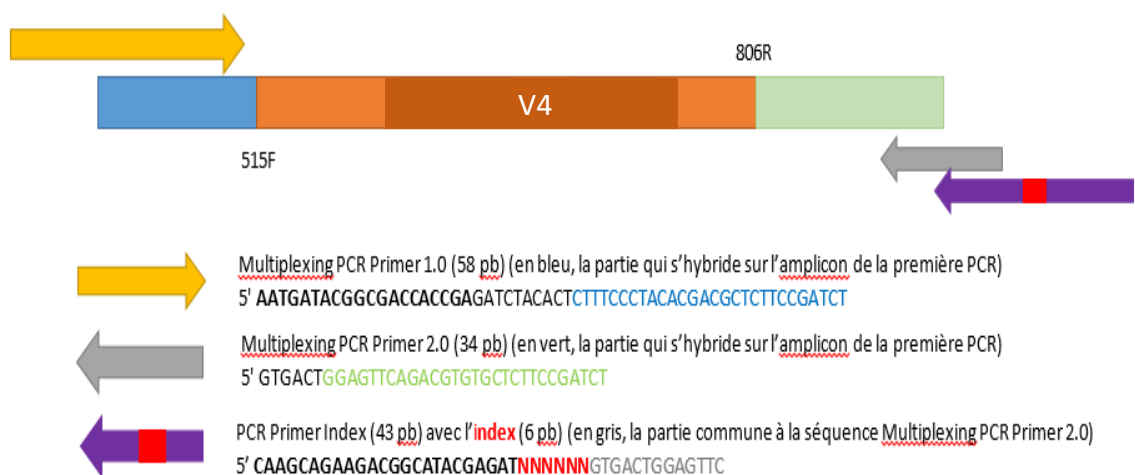


Figure 19. Région hypervariable V4 de l'ARNr 16S et amorces 515F et 806R

Annexe 5 : Protocole de la PCR de multiplexage (figure 20)

- Mettre 10 ng d'ADN dans un microtube à PCR et rajouter de l'eau stérile pour arriver à un volume final de 20 µL (mettre 1µL des « blancs »). La concentration finale était donc de 0,5 ng/µL, correspondant à la concentration optimale (ni trop faible, ni trop saturante) pour la réaction de PCR
- Préparer le nombre d'amorces d'indexage voulu (un index différent de 6 nucléotides par échantillon) et les diluer au ¼ (25µM)
- Préparer les amorces de PCR 1, diluées au ¼ (25µM)
- Préparer les amorces de PCR 2, diluées à 0,5 µM (en condition limitante)
- Faire un mix, avec les amorces de PCR 1 et 2 (10 µM soit 2,5 µL/microtubes) et le Master Mix Phusion GC buffer à 1X final (25 µL/microtubes). Majorer le volume final de 10% pour prendre en compte les espaces morts.
- Mettre dans des nouveaux microtubes : 21 µL d'eau stérile, 27 µL du mix, 1µL de l'échantillon et 1µL de l'amorce d'indexage correspondant à l'échantillon.
- Mélanger à la pipette puis centrifuger doucement
- Mettre dans le thermocycler (Veriti 96 well thermal cycle d'Applied Biosystems®) : Programme «PCR SNG 18 WoLB», comprenant :
 - 1 cycle à 98°C pendant 30s (pour l'activation enzymatique)
 - 18 cycles de 10s à 98°C (pour la dénaturation), puis de 30s à 60°C (pour l'hybridation des amorces) et puis de 45s à 72°C (pour élongation)
 - Un dernier cycle à 72°C pendant 7 minutes pour l'élongation finale



En gras, les séquences complémentaires des fixateurs de la Flow Cell Illumina

Figure 20. Amorces de la PCR de multiplexage

Annexe 6 : Technique de séquençage par terminateurs réversibles utilisée par Illumina® (figure 21)

Les séquenceurs de la marque Illumina® utilise la technique de séquençage par terminateurs réversibles (sequencing by synthesis en anglais). Le séquençage se fait par cycle. Chaque cycle correspond à l'incorporation d'un nucléotide marqué en 3'OH par un fluorophore (d'une couleur spécifique à chacune des 4 bases). Ce fluorophore permet d'identifier la base incorporée et d'empêcher la suite de l'élongation. Une fois le cycle fini et le fluorophore lu, le terminateur est enlevé par ultraviolet violet, libérant ainsi le groupement 3'OH et permettant l'incorporation du nucléotide suivant.

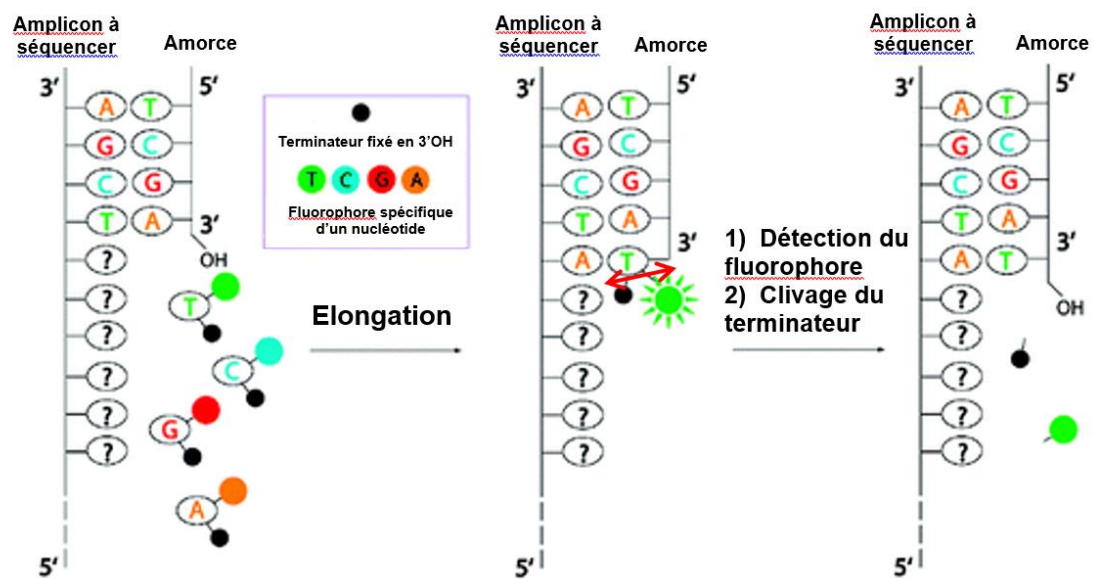


Figure 20. Principe du séquençage par terminateurs réversibles

Source: Jia Guo *et al*, An Integrated System for DNA Sequencing by Synthesis Using Novel Nucleotide Analogue, *Acc. Chem. Res.*, 43, 551-563 (2010)

Annexe 7 : Echantillons séquencés avec succès pour chaque patient

Echantillon	J0	J45	J90
AMLA	X		X
BOMA	X	X	ND
BRAL	X	X	X
CHLA	X		X
DEMA	X		X
DUGA	X		X
GATE	X		X
HIET	X	X	X
KANA	ND		X
MADA	X		X
MALI	X		ND
MEAL	X	X	ND
OPNA	X		X
OZGU	X		X
POLE	X		X
ROLE	X	X	X
SALO	X		X
SUJA	X	X	X
URKE	X		X
VEPA	X	X	X
WIPA	X		X

ND : non disponible, X : Run 1, X : Run 2, X : Run 3

Annexe 8 : Comparaison de la composition du microbiote intestinal entre J0 et J45 dans le groupe « ATB IV »

Taxon	Student p-value	Student FDR	Wilcoxon p-value	Wilcoxon FDR
Chromatiales (Ordre)			0.03072123	0.8252788
Leuconostoc (Genre)			0.01107226	0.9405023

Annexe 9 : Comparaison de la composition du microbiote intestinal entre J45 et J90 dans le groupe « ATB IV »

Taxon	Student p-value	Student FDR	Wilcoxon p-value	Wilcoxon FDR
Staphylococcus (Genre)			0.04797980	0.9820536
Pseudobutyrvibrio (Genre)			0.03303644	0.9820536
Finegoldia (Genre)			0.02977070	0.9820536
Coprobacillus (Genre)			0.04969643	0.9820536

Annexe 10 : Comparaison de la composition du microbiote intestinal entre J0 et J90 dans le groupe « ATB IV »

Taxon	Student p-value	Student FDR	Wilcoxon p-value	Wilcoxon FDR
Pseudomonadales (Ordre)			0.0479798	0.9355543

Annexe 11 : Comparaison de la composition du microbiote intestinal entre J0 et J90 dans le groupe « sans ATB IV »

Taxon	Student p-value	Student FDR	Wilcoxon p-value	Wilcoxon FDR
Bacillales (Ordre)			0.02323064	0.7860963
Spartobacterales (Ordre)			0.03498310	0.7860963
MC18 (Genre)			0.03498310	0.8778252
Porphyromonas (Genre)			0.01000336	0.8778252
Brevibacterium (Genre)			0.03498310	0.8778252
Anaerovorax (Genre)			0.04495810	0.8778252
Leptotrichia (Genre)			0.03498310	0.8778252
Finegoldia (Genre)			0.04495810	0.8778252

Annexe 12 : Comparaison de la composition du microbiote intestinal entre les patients avec une inflammation intestinale (calprotectine $\geq 100 \mu\text{g/g}$) et ceux sans inflammation intestinale (calprotectine $< 100 \mu\text{g/g}$)

Les échantillons étaient pris indépendamment du temps (J0/J45/J90).

En se plaçant aux niveaux taxonomiques “Ordre” et “Genre”, aucun nœud ne présente une p-valeur significative après correction. Les résultats sont les suivants :

Taxon	Student p-value	Student FDR	Wilcoxon p-value	Wilcoxon FDR
Lactobacillales (Ordre)	0.01912865	0.5830477	0.01867651	0.5830477
Xanthomonadales (Ordre)			0.04463553	0.5830477
Gemmatales (Ordre)			0.03567205	0.5830477
CW040 (Ordre)			0.03950984	0.5830477
Streptococcus (Genre)	0.04105916	0.6963291	0.04018611	0.6963291
Holdemania (Genre)	0.01962105	0.6963291	0.02423417	0.6963291
Peptoniphilus (Genre)	0.03499978	0.6963291		
Collinsella (Genre)	0.04519863	0.6963291		
Micrococcus (Genre)	0.02953628	0.6963291		
Jeotgalicoccus (Genre)	0.01331786	0.6963291		
Limnohabitans (Genre)	0.03567205	0.6963291		
Akkermansia (Genre)			0.02216916	0.6963291
Brachybacterium (Genre)			0.04102653	0.6963291

Annexe 13 : Comparaison de la composition du microbiote intestinal entre les prélèvements associés à une diarrhée (nombre= 8) et non associés à une diarrhée (nombre = 34).

Trois patients n’avaient pas rempli de questionnaire

Les échantillons étaient pris indépendamment du temps (J0/J45/J90).

En se plaçant aux niveaux taxonomiques “Ordre” et “Genre”, aucun noeud ne présente une p-valeur significative après correction. Les résultats sont les suivants :

Taxon	Student p-value	Student FDR	Wilcoxon p-value	Wilcoxon FDR
Gemellales (Ordre)	0.046562440	0.4190620		
Pasteurellales (Ordre)	0.023653957	0.4190620		
Rhodobacterales (Ordre)	0.038266804	0.4190620		
Lactobacillales (Ordre)	0.040807067	0.4190620		
CW040 (Ordre)	0.021507990	0.4190620		
Burkholderiales (Ordre)	0.019428380	0.4190620		
Turicibacterales (Ordre)	0.046149521	0.4190620		
Aeromonadales (Ordre)			0.045401130	0.8983124
Rhodophyta (Ordre)			0.045401130	0.8983124
Gemella (Genre)	0.046562440	0.5508031		
Haemophilus (Genre)	0.027657608	0.5508031		
Cronobacter (Genre)	0.010059773	0.5508031		
Propionibacterium (Genre)	0.032617701	0.5508031		
Turicibacter (Genre)	0.046097225	0.5508031		
Scardovia (Genre)	0.013242188	0.5508031		
Epulopiscium (Genre)	0.005543808	0.5508031		
Psychrobacter (Genre)	0.038846543	0.5508031		
Delftia (Genre)	0.018343913	0.5508031		
Adlercreutzia (Genre)	0.021661598	0.5508031		
Curvibacter (Genre)	0.019622565	0.5508031		
Lysinibacillus (Genre)	0.019206128	0.5508031		
Peptococcus (Genre)	0.026310230	0.5508031		

Pedobacter (Genre)			0.045401130	0.5422913
Janibacter (Genre)			0.045401130	0.5422913
Actinobaculum (Genre)			0.045401130	0.5422913
Renibacterium (Genre)			0.045401130	0.5422913
Kocuria (Genre)			0.045401130	0.5422913
Aeromicrobium (Genre)			0.045401130	0.5422913
Arthrobacter (Genre)			0.045401130	0.5422913
Aeromonas (Genre)			0.045401130	0.5422913
Pseudoclavibacter (Genre)			0.034345775	0.5422913
Janthinobacterium (Genre)			0.045401130	0.5422913
Ewingella (Genre)			0.045401130	0.5422913
Sutterella (Genre)			0.022794445	0.5422913
Gardnerella (Genre)			0.045401130	0.5422913
Yersinia (Genre)			0.003644212	0.3917528
Rahnella (Genre)			0.045401130	0.5422913
Arcanobacterium (Genre)			0.045401130	0.5422913
Megasphaera (Genre)			0.001734634	0.3729463
Peptostreptococcus (Genre)			0.024319008	0.5422913

Annexe 14 : Questionnaire donné aux patients



ETUDE A.M.M.I : ANTIBIOTHERAPIE, MUSCOVICIDOSE ET MICROBIOTE INTESTINAL

ENFANTS, ADOLESCENTS & JEUNES ADULTES (8 à 25 ans)

A remplir par le médecin.

- ✓ Date de la consultation/hospitalisation :
- ✓ Deux premières lettres du nom :
- ✓ Deux premières lettres du prénom :
- ✓ Date de naissance :
- ✓ J0 / J45 / J90 (*entourer la réponse*)
- ✓ Cure d'antibiotique intraveineuse durant l'étude :
 - Oui
 - Non

Merci de répondre aux questionnaires suivants :

- La première partie est à remplir **par l'enfant**
- La deuxième partie est à remplir **par les parents**

A remplir par le patient :

✓ Antibiotiques pris dans les 3 mois précédent, en dehors de ceux prescrits par le CRCM ?

Oui

Si oui, lesquels ?

De quand à quand ?

Non

✓ Autres médicaments pris dans les 3 mois précédent, en dehors de ceux prescrits par le CRCM ?

Oui

Si oui, lesquels ?

De quand à quand ?

Non

✓ Nombre de Créon :

– Matin :

– Midi :

– Gouter :

– Soir :

– Nombre d'oublis dans le dernier mois :

PedsQL™

Questionnaire sur la qualité de vie et les symptômes digestifs

PARTIE A REMPLIR PAR LES ENFANTS

pour les **ENFANTS, ADOLESCENTS & JEUNES ADULTES (8 à 25 ans)**

INSTRUCTIONS

Sur la page suivante figure une liste de choses qui peuvent vous poser problème.
Dites-moi pour chacune de ces choses si cela **a été un problème** pour vous
au cours du **MOIS DERNIER** en entourant :

- 0** si ce n'est **jamais** un problème
- 1** si ce n'est **presque jamais** un problème
- 2** si c'est **parfois** un problème
- 3** si c'est **souvent** un problème
- 4** si c'est **presque toujours** un problème

Il n'y a pas de réponses justes ou fausses.
Si vous ne comprenez pas une question, n'hésitez pas à demander de l'aide.

Au cours du **MOIS DERNIER**, les choses suivantes ont-elles été un **problème** pour vous ?

MA SANTÉ ET MES ACTIVITÉS (problèmes avec...)	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. J'ai des difficultés à marcher plus loin que le coin de la rue	0	1	2	3	4
2. J'ai des difficultés à courir	0	1	2	3	4
3. J'ai des difficultés à faire du sport ou de l'exercice	0	1	2	3	4
4. J'ai des difficultés à soulever un objet lourd	0	1	2	3	4
5. J'ai des difficultés à prendre un bain ou une douche tout(e) seul(e)	0	1	2	3	4
6. J'ai des difficultés à faire le ménage	0	1	2	3	4
7. Je ressens des douleurs	0	1	2	3	4
8. Je manque d'énergie	0	1	2	3	4

MES EMOTIONS (problèmes avec...)	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. J'ai peur	0	1	2	3	4
2. Je me sens triste ou déprimé(e)	0	1	2	3	4
3. Je suis en colère ou énervé(e)	0	1	2	3	4
4. J'ai du mal à dormir	0	1	2	3	4
5. Je m'inquiète de ce qui va m'arriver	0	1	2	3	4

MES RELATIONS AVEC LES AUTRES (problèmes avec...)	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. J'ai du mal à m'entendre avec les autres	0	1	2	3	4
2. Les autres ne veulent pas être amis avec moi	0	1	2	3	4
3. Les autres se moquent de moi	0	1	2	3	4
4. Je ne peux pas faire certaines choses que les autres jeunes de mon âge peuvent faire	0	1	2	3	4
5. J'ai du mal à suivre les autres / J'ai du mal à suivre les autres enfants quand je joue avec eux	0	1	2	3	4

LE TRAVAIL/LES ÉTUDES (problèmes avec...)	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. J'ai du mal à être attentif(-ive) au travail ou en cours	0	1	2	3	4
2. J'oublie des choses	0	1	2	3	4
3. J'ai du mal à faire tout mon travail ou à suivre tous les cours	0	1	2	3	4
4. Je manque le travail ou les cours parce que je ne me sens pas bien	0	1	2	3	4
5. Je manque le travail ou les cours pour aller chez le docteur ou à l'hôpital	0	1	2	3	4

PedsQL 4.0 - (18-25) Ne pas reproduire sans permission

Copyright © 1998 JW Varni, Ph.D. Tous droits réservés

PedsQL™ 4.0 Generic Core Scale - Young Adult (18-25) - France/French - Version of 11 Dec 08 - Mapi Research Institute.
ID4875 / PedsQL-4.0-Core-Yad_AU4.0_fr-FR.doc

Au cours du **MOIS DERNIER**, les choses suivantes ont-elles représenté un **problème** pour vous ?

PedsQL 2

Douleurs au ventre	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Je ressens des douleurs au ventre	0	1	2	3	4
2. J'ai des crises de douleurs au ventre	0	1	2	3	4
3. Mon ventre me fait mal	0	1	2	3	4
4. Je me réveille la nuit avec des douleurs au ventre	0	1	2	3	4
5. J'ai tellement mal au ventre que j'en suis malade	0	1	2	3	4
6. J'ai des inconforts digestifs	0	1	2	3	4

Inconfort de l'estomac en mangeant	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Quand je mange j'en suis malade	0	1	2	3	4
2. Quand je mange je ne me sens pas bien	0	1	2	3	4
3. Mon ventre est douloureux quand je mange	0	1	2	3	4
4. Je sens mon estomac lourd quand je mange	0	1	2	3	4
5. Je sens mon estomac plein dès que je commence à manger	0	1	2	3	4

Aliments et boissons	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Je ne peux pas manger	0	1	2	3	4
2. Je ne peux pas boire	0	1	2	3	4
3. Je n'arrive pas à manger ce que je veux	0	1	2	3	4
4. Je n'arrive pas à boire ce que je veux	0	1	2	3	4
5. Je ne peux pas manger certains aliments car ils me rendent malade	0	1	2	3	4
6. Je ne peux pas manger ce que mangent mes amis	0	1	2	3	4

Difficultés à avaler	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. C'est dur pour moi d'avaler des aliments	0	1	2	3	4
2. J'ai mal quand j'avale	0	1	2	3	4
3. La nourriture se coince quand j'avale	0	1	2	3	4

Au cours du **MOIS DERNIER**, les choses suivantes ont-elles représenté un **problème** pour vous ?

PedsQL 3

Brulures d'estomac et reflux	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. J'ai des sensations de brulures dans la gorge	0	1	2	3	4
2. J'ai des douleurs ou des brulures dans la poitrine	0	1	2	3	4
3. J'ai beaucoup de renvois	0	1	2	3	4
4. La nourriture remonte dans ma bouche après le repas	0	1	2	3	4

Nausées et vomissements	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Je suis nauséux	0	1	2	3	4
2. Je suis nauséux quand je mange	0	1	2	3	4
3. Je suis nauséux après avoir mangé	0	1	2	3	4
4. Je vomis	0	1	2	3	4

Gaz et ballonnements	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Mon ventre semble plein de gaz	0	1	2	3	4
2. Mon ventre semble plein	0	1	2	3	4
3. Mon ventre semble gros et dur	0	1	2	3	4
4. J'ai beaucoup de gaz	0	1	2	3	4
5. J'évacue beaucoup de gaz	0	1	2	3	4
6. Mon ventre est ballonné	0	1	2	3	4
7. Mon ventre fait du bruit	0	1	2	3	4

Au cours du **MOIS DERNIER**, les choses suivantes ont-elles représenté un **problème** pour vous ?

PedsQL 4

Constipation	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Je me sens toujours plein après être allé à la selle	0	1	2	3	4
2. Je ne me sens pas vide après être aller à la selle	0	1	2	3	4
3. Je sens que je n'arrive pas à aller à la selle	0	1	2	3	4
4. J'ai mal quand je vais à la selle	0	1	2	3	4
5. Mes selles sont dures	0	1	2	3	4
6. Mes selles sont grumeleuses	0	1	2	3	4
7. Je dois pousser fort pour aller à la selle	0	1	2	3	4
8. Mes selles se coincent quand je vais à la selle	0	1	2	3	4
9. Mon anus me fait mal après être allé à la selle	0	1	2	3	4
10. Mes selles mettent du temps à être évacuées	0	1	2	3	4
11. Je dois faire des efforts pour évacuer mes selles	0	1	2	3	4
12. Je ne veux pas aller à la selle car ça me fait mal	0	1	2	3	4
13. J'ai besoin de beaucoup de temps pour aller à la selle	0	1	2	3	4
14. J'ai mal au ventre quand je vais à la selle	0	1	2	3	4

Sang dans les selles	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Il y a du sang sur le papier après être allé à la selle	0	1	2	3	4
2. Il y a du sang dans mes selles	0	1	2	3	4

Diarrhée	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. J'ai besoin d'être prêt des toilettes	0	1	2	3	4
2. Je dois courir aux toilettes pour aller à la selle	0	1	2	3	4
3. J'ai l'impression d'être toujours aux toilettes pour aller à la selle	0	1	2	3	4
4. Je me lève la nuit pour aller à la selle	0	1	2	3	4
5. Mes selles sont liquides	0	1	2	3	4
6. J'ai des traces de selles dans mes sous vêtements	0	1	2	3	4
7. Je vais souvent à la selle	0	1	2	3	4

PedsQL™

Questionnaire sur la qualité de vie et les symptômes digestifs

PARTIE A REMPLIR PAR LES PARENTS

pour les **ENFANTS, ADOLESCENTS & JEUNES ADULTES (8 à 25 ans)**

INSTRUCTIONS

Sur la page suivante figure une liste de choses qui peuvent vous poser problème. Dites-moi pour chacune de ces choses si cela **a été un problème pour votre enfant** au cours du **MOIS DERNIER** en entourant :

- 0** si ce n'est **jamais** un problème
- 1** si ce n'est **presque jamais** un problème
- 2** si c'est **parfois** un problème
- 3** si c'est **souvent** un problème
- 4** si c'est **presque toujours** un problème

Il n'y a pas de réponses justes ou fausses.
Si vous ne comprenez pas une question, n'hésitez pas à demander de l'aide.

Au cours du **MOIS DERNIER**, les choses suivantes ont-elles représenté un **problème** pour votre enfant (adolescent) ?

LA CAPACITE PHYSIQUE (problèmes avec...)	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Marcher plus loin qu'un pâté de maisons (100 m)	0	1	2	3	4
2. Courir	0	1	2	3	4
3. Faire du sport ou de l'exercice	0	1	2	3	4
4. Soulever un objet lourd	0	1	2	3	4
5. Prendre un bain ou une douche tout(e) seul(e)	0	1	2	3	4
6. Aider dans la maison	0	1	2	3	4
7. Ressentir des douleurs	0	1	2	3	4
8. Manquer d'énergie	0	1	2	3	4

L'ÉTAT ÉMOTIONNEL (problèmes avec...)	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Avoir peur	0	1	2	3	4
2. Se sentir triste ou déprimé(e)	0	1	2	3	4
3. Être en colère ou énervé(e)	0	1	2	3	4
4. Avoir du mal à dormir	0	1	2	3	4
5. S'inquiéter de ce qui va lui arriver	0	1	2	3	4

LES RELATIONS AVEC LES AUTRES (problèmes avec...)	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. S'entendre avec les autres adolescent(e)s	0	1	2	3	4
2. Les autres adolescent(e)s ne veulent pas être son ami	0	1	2	3	4
3. Les autres adolescent(e)s se moquent de lui/d'elle	0	1	2	3	4
4. N'est pas capable de faire des choses que d'autres adolescent(e)s peuvent faire	0	1	2	3	4
5. Suivre le rythme des autres adolescent(e)s	0	1	2	3	4

LES ÉTUDES (problèmes avec...)	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Être attentif(-ive) en cours	0	1	2	3	4
2. Oublier des choses	0	1	2	3	4
3. Réussir à faire tout son travail en classe	0	1	2	3	4
4. Manquer les cours parce qu'il/elle ne se sent pas bien	0	1	2	3	4
5. Manquer les cours parce qu'il/elle va chez le médecin ou à l'hôpital	0	1	2	3	4

Au cours du **MOIS DERNIER**, les choses suivantes ont-elles représenté un **problème** pour votre enfant ?

PedsQL 2

Douleurs au ventre	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Mon enfant a des douleurs au ventre	0	1	2	3	4
2. Mon enfant a crises de douleurs au ventre	0	1	2	3	4
3. Mon enfant se plaint du ventre	0	1	2	3	4
4. Mon enfant se réveille la nuit avec des douleurs au ventre	0	1	2	3	4
5. Mon enfant a tellement mal au ventre qu'il en est malade	0	1	2	3	4
6. Mon enfant a des inconforts digestifs	0	1	2	3	4

Inconfort digestif en mangeant	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Quand il mange, il en est malade	0	1	2	3	4
2. Quand il mange, il ne se sens pas bien	0	1	2	3	4
3. Son ventre est douloureux quand il mange	0	1	2	3	4
4. Il sent son estomac lourd quand il mange	0	1	2	3	4
5. Il sent son estomac plein dès qu'il commence à manger	0	1	2	3	4

Aliments et boissons	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Il ne peut pas manger	0	1	2	3	4
2. Il ne peut pas boire	0	1	2	3	4
3. Il n'arrive pas à manger ce qu'il veut	0	1	2	3	4
4. Il n'arrive pas à boire ce qu'il veut	0	1	2	3	4
5. Il ne peut pas manger certains aliments car ils le rendent malade	0	1	2	3	4
6. Il ne peut pas manger ce que mangent ses amis	0	1	2	3	4

Difficultés à avaler	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. C'est dur pour lui d'avaler des aliments	0	1	2	3	4
2. Il a mal quand il avale	0	1	2	3	4
3. La nourriture se coince quand il avale	0	1	2	3	4

Au cours du **MOIS DERNIER**, les choses suivantes ont-elles représenté un **problème** pour votre enfant ?

PedsQL 3

Brulures d'estomac et reflux	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Il a des sensations de brulures dans la gorge	0	1	2	3	4
2. Il a des douleurs ou des brulures dans la poitrine	0	1	2	3	4
3. Il a beaucoup de renvois	0	1	2	3	4
4. La nourriture remonte dans sa bouche après le repas	0	1	2	3	4

Nausées et vomissements	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Il est nauséux	0	1	2	3	4
2. Il est nauséux quand il mange	0	1	2	3	4
3. Il est nauséux après avoir mangé	0	1	2	3	4
4. Il vomit	0	1	2	3	4

Gaz et ballonnements	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Son ventre semble plein de gaz	0	1	2	3	4
2. Son ventre semble plein	0	1	2	3	4
3. Son ventre semble gros et dur	0	1	2	3	4
4. Il a beaucoup de gaz	0	1	2	3	4
5. Il évacue beaucoup de gaz	0	1	2	3	4
6. Son ventre est ballonné	0	1	2	3	4
7. Son ventre fait du bruit	0	1	2	3	4

Au cours du **MOIS DERNIER**, les choses suivantes ont-elles représenté un **problème** pour votre enfant ?

PedsQL 4

Constipation	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Il se sens toujours plein après être allé à la selle	0	1	2	3	4
2. Il ne se sens pas vide après être aller à la selle	0	1	2	3	4
3. Il n'arrive pas à aller à la selle	0	1	2	3	4
4. Il a mal quand il va à la selle	0	1	2	3	4
5. Ses selles sont dures	0	1	2	3	4
6. Ses selles sont grumeleuses	0	1	2	3	4
7. Il doit pousser fort pour aller à la selle	0	1	2	3	4
8. Ses selles se coincent quand il va à la selle	0	1	2	3	4
9. Son anus lui fait mal après être allé à la selle	0	1	2	3	4
10. Ses selles mettent du temps à être évacuées	0	1	2	3	4
11. Il doit faire des efforts pour évacuer ses selles	0	1	2	3	4
12. Il ne veut pas aller à la selle car ça lui fait mal	0	1	2	3	4
13. Il a besoin de beaucoup de temps pour aller à la selle	0	1	2	3	4
14. Il a mal au ventre quand il va à la selle	0	1	2	3	4

Sang dans les selles	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Il y a du sang sur le papier après être allé à la selle	0	1	2	3	4
2. Il y a du sang dans ses selles	0	1	2	3	4

Diarrhée	Jamais	Presque jamais	Parfois	Souvent	Presque toujours
1. Il a besoin d'être prêt des toilettes	0	1	2	3	4
2. Il doit courir aux toilettes pour aller à la selle	0	1	2	3	4
3. Il a l'impression d'être toujours aux toilettes pour aller à la selle	0	1	2	3	4
4. Il se lève la nuit pour aller à la selle	0	1	2	3	4
5. Ses selles sont liquides	0	1	2	3	4
6. Il a des traces de selles dans ses sous vêtements	0	1	2	3	4
7. Il va souvent à la selle	0	1	2	3	4

10. Le Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

RESUME

Le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière. Une perturbation de son équilibre – appelée dysbiose – est impliquée dans la physiopathologie de certaines maladies, et notamment dans l'évolution de la mucoviscidose, première maladie génétique pédiatrique. Parmi les organes atteints dans cette maladie, l'intestin est le siège d'une inflammation intestinale chronique de bas grade et de perturbations du microbiote. L'étude de la flore intestinale dans la mucoviscidose met en évidence une dysbiose caractérisée notamment par une diminution de la diversité et une augmentation de l'abondance bactérienne. Il a été montré que les anomalies du microbiote intestinal apparaissent progressivement au cours des premiers mois de vie chez l'enfant atteint de mucoviscidose. Ces perturbations pourraient être influencées par différents facteurs environnementaux, notamment le recours à des antibiothérapies répétées, prescrites pour exacerbations pulmonaires.

L'objectif principal de ce travail était d'étudier l'évolution du microbiote intestinal après une cure d'antibiothérapie intraveineuse chez l'enfant atteint de mucoviscidose.

Vingt et un patients, atteints de mucoviscidose et suivis au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) de l'Hôpital des Enfants de Bordeaux, ont été inclus et suivis pendant 3 mois. Sept d'entre eux ont reçu une cure ATB IV pendant 15 jours et 14 patients étaient dans le groupe contrôle. Une étude du microbiote intestinal par séquençage haut débit et de l'inflammation digestive par le dosage de la calprotectine fécale a été effectuée et répétée durant le suivi des participants.

L'impact des cures d'ATB IV sur le microbiote intestinal semblait être modéré. Sa composition variait après une cure d'ATB IV, puisque 60,7 % des bactéries présentes initialement étaient retrouvées 3 mois après la cure chez un même patient. Pour autant nous n'avons pas pu mettre en évidence de nœud taxonomique sous ou surreprésenté en post antibiothérapie. Une inflammation intestinale était présente chez 71% des patients et semblait être corrélée à une surreprésentation de *Streptococcus* (ratio = 2,50, p-value = 0,042) chez les patients ayant une calprotectine fécale supérieure à 250 µg/g. Ces résultats peuvent encourager la mise en place d'une étude interventionnelle évaluant l'efficacité de cures courtes d'antibiothérapie orale pour traiter l'inflammation intestinale. Enfin, la présence de diarrhée semblait être inversement corrélée à la présence d'inflammation intestinale, suggérant que ce symptôme puisse être un mécanisme régulant la pullulation bactérienne, afin de prévenir l'inflammation intestinale.

Cette étude préliminaire retrouve un impact limité de l'antibiothérapie intraveineuse sur le microbiote intestinal mais semble conforter le lien entre la dysbiose et l'inflammation intestinale.

Titre en anglais : Impact of intravenous antibiotics on the gut microbiota in children with cystic fibrosis.

Discipline : Pédiatrie.

Mots-clés : Microbiote intestinal, Dysbiose, Mucoviscidose, Antibiothérapie intraveineuse, Calprotectine fécale, Inflammation digestive, *Streptococcus*.

Université de Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux.