

RESUME DU PROJET :

ETUDE NEUROPHYSIOLOGIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DE LA SENSIBILISATION PELVIENNE

I- OBJECTIFS POURSUIVIS (10 lignes)

Ce projet vise à appréhender globalement la sensibilisation pelvienne dans une population de patientes douloureuses chroniques.

Le **premier objectif** est de valider la présence d'une sensibilisation pelvienne par des mesures neurophysiologiques de seuils douloureux. (Cette partie ne sera pas abordée dans cette demande de bourse car des demandes de financements annexes ont été effectuées).

Le **second objectif** de ce projet est d'étudier le microbiote urinaire, gynécologique et digestif afin de :

- Mettre en évidence une dysbiose au niveau digestif, urinaire et/ou vaginal.
- Identifier des biomarqueurs spécifiques de la sensibilisation pelvienne.
- Identifier le microbiote comme acteur potentiel de la sensibilisation pelvienne.

II- ETAT ACTUEL DU SUJET (2 pages)

Les douleurs pelvi-périnéales chroniques sont caractérisées par leur durée d'évolution et l'absence de pathologie lésionnelle susceptible de les justifier. Chez les patients présentant des douleurs pelvi-périnéales chroniques, **une sous-population est dite sensibilisée**. Ces patients sensibilisés présentent des douleurs majorées ou provoquées par des stimulations d'intensité normalement non nociceptive (ex : intolérance au remplissage de la vessie). La douleur persiste dans le temps malgré l'arrêt de la stimulation (ex : douleurs post-mictionnelles). Une diffusion de la douleur au-delà de la zone stimulée est également retrouvée. Ces caractéristiques **d'abaissement de seuil douloureux, de diffusion spatiale et temporelle** sont propres aux mécanismes de la **sensibilisation centrale** (1). Ce concept est émergent et nécessite une approche globale et transdisciplinaire.

La mise en évidence des facteurs de sensibilisation est rendue difficile par une riche plainte fonctionnelle et entraîne une incertitude diagnostique. La connaissance d'une sensibilisation pelvienne **modifie pourtant notre attitude thérapeutique** et préventive vis-à-vis de tout geste invasif, notamment chirurgical. Il a ainsi été défini en 2016, par les experts du Centre Fédératif de Douleur Pelvi-Périnéale de Nantes en **consensus avec des experts internationaux** (méthode DELPHI, publication en cours), une liste de **10 critères cliniques** (critères de Convergences PP, cf. Matériel et Méthode). Ils permettent simplement, par l'interrogatoire et l'examen clinique d'évoquer ou non une sensibilisation pelvienne. Ces critères sont en cours de validation psychométrique pour la réalisation d'un **score de sensibilisation** qui sera largement diffusé aux différents praticiens. Dans ce contexte, **notre premier objectif** sera de valider ces critères cliniques par des mesures neurophysiologiques de seuils douloureux.

D'autre part, une meilleure compréhension de la physiopathologie sous-jacente permettrait d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la sensibilisation pelvienne et de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est pourquoi **notre second objectif** sera d'appréhender, via l'étude du microbiote, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux douleurs pelviennes. En effet, ces dernières années, le concept de troisième cerveau hébergé par l'intestin, a émergé. En effet, l'avènement d'outils issus de la biologie moléculaire a permis la mise en évidence de cet écosystème digestif, responsable de fonctions physiologiques majeures, faisant de ce microbiote intestinal un véritable néo-organe.

A la différence des sujets sains, une **dysbiose intestinale** (déséquilibre du microbiote) a été retrouvée chez les sujets souffrant du syndrome de l'intestin irritable (2). Une perturbation du microbiote intestinal chez les patients souffrant de douleurs pelviennes chroniques a également été objectivée (3). La flore intestinale de ces patients douloureux chroniques est caractérisée par une faible diversité du microbiote et un taux très bas de Prevotella. La présence de germes dans les urines a été prouvée grâce à des techniques de séquençage haute résolution (4). Ces bactéries sont différentes de celles responsables des infections urinaires et représentent un véritable microbiote. Une **dysbiose urinaire** a été identifiée dans le syndrome douloureux de vessie (cystite interstitielle) (5). Enfin, un lien entre **dysbiose vaginale** et vestibulodynies est suspecté (6). **Toutefois, l'implication du microbiote dans la sensibilisation pelvienne reste**

à étudier, et l'analyse simultanée des différents microbiotes d'organes des patients sensibilisés n'a jamais été décrite.

En outre, des études récentes ont montré la capacité du microbiote intestinal à reproduire dans un système sain les lésions observées chez des patients. En particulier, dans le syndrome de l'intestin irritable, le surnageant fécal induit des modifications de la barrière épithéliale intestinale et une hypersensibilité viscérale chez l'animal sain (7). **À ce jour, le lien entre une symptomatologie douloureuse (patients sensibilisés ou non) et des dysfonctions digestives induites par le surnageant fécal reste à identifier.**

Références :

1. Ploteau S, Labat JJ, Riant T, Levesque A, Robert R, Nizard J. New concepts on functional chronic pelvic and perineal pain: pathophysiology and multidisciplinary management. *Discov Med*. 2015 Mar;19(104):185–92.
2. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut*. 2013 Jan;62(1):159–76.
3. Shoskes DA, Wang H, Polackwich AS, Tucky B, Altemus J, Eng C. Analysis of Gut Microbiome Reveals Significant Differences between Men with Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome and Controls. *The Journal of Urology*. 2016 Aug;196(2):435–41.
4. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, FitzGerald M, et al. Evidence of Uncultivated Bacteria in the Adult Female Bladder. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012 Apr 1;50(4):1376–83.
5. Siddiqui H, Lagesen K, Nederbragt AJ, Jeansson SL, Jakobsen KS. Alterations of microbiota in urine from women with interstitial cystitis. *BMC Microbiology*. 2012;12(1):205.
6. Jayaram A, Witkin SS, Zhou X, Brown CJ, Rey GE, Linhares IM, et al. The bacterial microbiome in paired vaginal and vestibular samples from women with vulvar vestibulitis syndrome. *Pathogens and Disease*. 2014 Jul;n/a-n/a.
7. Annaházi A, Ferrier L, Bézirard V, Lévêque M, Eutamène H, Ait-Belgnaoui A, et al. Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS. *Am J Gastroenterol*. 2013 Aug;108(8):1322–31.
8. Le Berre-Scoul C, Chevalier J, Oleynikova E, Cossais F, Talon S, Neunlist M, et al. A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol (Lond)*. 2017 Jan 15;595(2):583–98.

9. Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, et al. Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. J Physiol (Lond). 2008 Apr 1;586(7):1963–75.

III- PROTOCOLE ET PROGRAMME ACTUEL (2 à 3 pages)

Réalisation d'une étude clinique pilote de recherche biomédicale interventionnelle hors médicament (Physiologie) sur un nombre limité de patientes (N = 30).

1) Objectifs :

- Caractérisation du microbiote : comparaison du microbiote urinaire, digestif et vaginal entre les patientes sensibilisées selon les critères de Convergences PP (> 5/10) et non sensibilisées (< 5/10).
- Effets sur le système nerveux entérique (SNE) : comparaison de l'excitabilité neuronale et de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires entre les deux populations.

2) Population d'étude :

Notre étude portera sur un nombre limité (N = 30) de **patientes majeures douloureuses chroniques**. Il sera recruté 15 patientes douloureuses chroniques sensibilisées (score Convergences PP > 5) et 15 patientes douloureuses chroniques non sensibilisées (score Convergences PP < 5). Le nombre nécessaire de patientes a été déterminé à l'aide d'une revue de littérature.

Nous disposons dans des études antérieures des caractéristiques des microbiotes urinaires, vaginaux et digestifs des patients sains. Il a donc été décidé en accord avec notre méthodologiste de n'inclure que des patientes douloureuses chroniques, sensibilisées ou non.

Critères d'inclusion :

- Femmes,
- Age 18 ans à 65 ans,
- Algie pelvi-périnéale depuis plus de 3 mois,
- Absence de lésion objectivée à l'imagerie expliquant les douleurs,
- Patiente en capacité de comprendre le protocole.

Critères d'exclusion :

- Mauvaise compréhension de la langue française,
- Toxicomanie,
- Dépression sévère,
- Douleur initiale estimée à 10/10 sur l'EVA,
- Infection génitale ou urinaire en cours,
- Antécédent de cancer de la sphère uro-génital,
- Sujet estimé insuffisamment coopérant,
- Prise d'antibiotiques dans les moins de 15 jours,
- Femmes enceintes.

3) Prélèvement :

La recherche des microbiotes d'organes sera réalisée par analyse d'un échantillon d'urine (prélevé stérilement dans la vessie en début d'examen urodynamique), de selle (pot stérile remis à la patiente à la première consultation) et du microbiote vaginal (prélèvement sur coton-tige vaginal) avant de débiter les mesures neurophysiologiques. Les prélèvements seront ensuite conservés à -20° et envoyés à l'entreprise BIOFORTIS en moins d'un mois (durée de stabilité des échantillons).

4) Analyse :

L'extraction d'ADN fécaux et le métagénomique taxonomique 16 S seront analysés par l'entreprise BIOFORTIS. Cette technique permet de séquencer l'ensemble des gènes codant pour l'ARNr 16S. Ensuite une analyse des profils taxonomiques (au niveau du phylum, de la famille et du genre) et un calcul des indices de richesse (indice Chao) et de diversité (Shannon) seront réalisés. Une comparaison de ces différentes données entre les 2 groupes sera réalisée.

Du surnageant fécal sera produit puis incubé soit avec des cultures primaires de système nerveux entérique (SNE) ou avec des monocouches de cellules épithéliales intestinales (Caco-2) en suivant le protocole de Annahazi et al (7). D'une part, la capacité du surnageant de fèces à modifier les propriétés électrophysiologiques et phénotypiques du SNE sera réalisée. Les effets de cette incubation sur l'excitabilité du SNE et l'expression de médiateurs pro-inflammatoires-nociceptifs (SP, TRPV1, CGRP) seront analysés par des approches d'imageries, transcriptomiques et protéomiques développées au laboratoire U1235 (8,9).

D'autre part, les effets du surnageant sur la perméabilité (paracellulaire et transcellulaire) de monocouches de Caco-2 et les modifications des principaux acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de la perméabilité seront étudiés par approches transcriptomique biochimiques. Ces modifications seront corrélées avec les symptômes et les caractéristiques du microbiote des patients afin de renforcer un rôle causal éventuel du microbiote comme acteur de dysfonctions neurodigestives.

5) Déroulement du projet dans le temps et ses différentes étapes

- **Janvier à juin 2018** : recrutement des 30 patientes lors des consultations pluridisciplinaires d'algie pelvi-périnéales. Réalisation des tests neurophysiologiques et mise en place de la biocollection de microbiote.
- **Juin à septembre 2018** : Etude et analyse des effets du surnageant fécal.
- **Septembre à janvier 2018** : analyse statistique des données cliniques et rédaction des articles scientifiques.

6) Faisabilité de l'étude

Les patients douloureux chroniques consultant au CHU de Nantes sont très fréquemment en échec thérapeutique et présentent un **taux d'adhésion fort** aux protocoles expérimentaux malgré les contraintes des études (par exemple études MYOTOX, STIMCONE).

Par ailleurs, l'expertise du centre fédératif de douleur pelvi-périnéale permettra un recrutement des patientes et celle de l'UMR 1235 permettra la réalisation du surnageant fécal et l'étude de ses propriétés.

7) Retombées attendues

Sur le plan clinique, cette étude permettra de valider objectivement les différents critères cliniques utilisés actuellement comme représentatifs d'une sensibilisation pelvienne. Cette étape étant essentielle pour permettre la validation du score clinique de sensibilisation pelvienne basé sur les critères de Convergences PP. Une fois validé, ce score sera un outil diagnostique pour une population large de praticiens, ce qui favorisera le diagnostic de sensibilisation pelvienne et permettra d'adapter la prise en charge des patients douloureux chroniques.

Sur le plan physiopathologique, si des dysbioses sont identifiées chez les patientes sensibilisées, cela soulignera le rôle vecteur du microbiote. Cette étude ouvrira la voie à une moindre errance diagnostique et thérapeutique des patients sensibilisés, une optimisation de leur prise en charge par des approches transdisciplinaires, mais également la perspective de champs de recherche inexplorés.

Sur le plan bibliométrique, cette étude de niveau de preuve II (étude comparative non randomisée bien menée) sera la seule à associer les symptômes cliniques de sensibilisation aux microbiotes des différentes sphères d'organes. Cela prédit une publication dans une revue internationale à fort *impact factor* et un taux important de citation. De plus, les résultats de cette étude seront diffusés aux différents praticiens prenant en charge les patients douloureux chroniques (urologues, chirurgiens digestifs, gynécologues, algologues, MPR), ce qui permettra une bonne visibilité de l'étude.

Enfin, ce projet collaboratif et transversal s'inscrira dans une dynamique régionale actuelle visant à caractériser les dysfonctions des barrières et du rôle du microbiote dans les pathologies chroniques (projet inter-régional MIBIOGATE 2017-2021).

8) Références :

7. Annaházi A, Ferrier L, Bézirard V, Lévêque M, Eutamène H, Ait-Belgnaoui A, et al. Luminal cysteine-proteases degrade colonic tight junction structure and are responsible for abdominal pain in constipation-predominant IBS. *Am J Gastroenterol*. 2013 Aug;108(8):1322–31.
8. Le Berre-Scoul C, Chevalier J, Oleynikova E, Cossais F, Talon S, Neunlist M, et al. A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol (Lond)*. 2017 Jan 15;595(2):583–98.
9. Chevalier J, Derkinderen P, Gomes P, Thinard R, Naveilhan P, Vanden Berghe P, et al. Activity-dependent regulation of tyrosine hydroxylase expression in the enteric nervous system. *J Physiol (Lond)*. 2008 Apr 1;586(7):1963–75.

IV- ESTIMATION DU COUT FINANCIER et CO-FINANCEMENT

- Production de surnageants de feces / filtration et stockage : 225 €
- Mesure perméabilité intestinale in vitro : 1 635 €
- Cultures primaires SNE (animaux...) : 1 125 €
- Étude transcriptomique marqueurs SNE et barrière intestinale (15 gènes) : 1 500 €
- Étude immunohistochimique marqueurs SNE et barrière intestinale (10 marqueurs) : 5 250 €
- Étude western blot marqueurs SNE et barrière intestinale (10 marqueurs) : 6 750 €

- Ingénieur d'études : 6 mois ETP 1 : 21 000 €

- Analyse du microbiote : 222 € / échantillon soit 19 980 € (3 échantillons x 30 patientes)

SOIT TOTAL = 57 465 euros

Co-financements :

- Ingénieur d'étude financé par le laboratoire INSERM 1235 (21 000 €)
- Analyse du microbiote financé dans le cadre du projet MIBIOGATE (19 980 €)

Soit TOTAL restant : 16 485 €