

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

										0	1
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

Modifications iatrogènes du microbiote intestinal : impact de la chimiothérapie

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Thérapeutique

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Emmanuel MONTASSIER

Le 8 juillet 2014, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs

Monsieur Harry Sokol, MCU-PH, Université de Paris
Monsieur Bruno Fantin, PU-PH, Université de Paris

Examineurs

Monsieur Stanislas Bruley des Varannes, PU-PH, Université de Nantes
Monsieur Gilles Potel, PU-PH, Université de Nantes

Directeurs de thèse

Monsieur Eric Batard, PU-PH, Université de Nantes
Madame Marie France de La Cochetière, INSERM, Université de Nantes

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury, monsieur Harry Sokol, monsieur Bruno Fantin, monsieur Gilles Potel et monsieur Stanislas Bruley des Varannes qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je remercie Eric Batard, mon directeur de thèse. Merci donc, Eric, d'avoir dirigé cette thèse et d'avoir permis cette expérience scientifique. Merci de m'avoir accompagné tout au long de cette thèse. Merci pour tout ce que tu m'as apporté sur le plan scientifique, pédagogique et personnel. J'ai beaucoup appris de tes qualités scientifiques mais aussi humaines.

Je remercie Marie France de La Cochetière, co-directrice de cette thèse. Merci à toi, Marie France, qui m'a introduit dans le monde du microbiote. Merci de m'avoir soutenu dans la réalisation des travaux de recherche entrepris.

Je remercie tous ceux qui ont accompagné mon travail scientifique et tout particulièrement les membres de l'EA3826. Un remerciement appuyé à Anne Françoise MIEGEVIELLE pour le travail à la paillasser.

J'exprime aussi ma reconnaissance aux membres de mes comités de thèse qui m'ont apporté de précieux conseils et permis le bon déroulement de cette thèse : monsieur Stanislas Bruley

des Varannes et monsieur Frédéric Altare. Je tiens à remercier tout particulièrement monsieur Bruley des Varannes pour le temps qu'il m'a consacré et l'aide qu'il m'a apportée.

Je tiens aussi à remercier monsieur Gilles Potel. Je vous remercie pour toute la confiance que vous m'avez accordée et votre soutien. J'espère m'en montrer digne.

Cette expérience a aussi été familiale. Merci Cecilia! Rien n'aurait été possible, n'est possible et ne sera possible sans toi ! Merci Sasha, Matei et Irena pour la joie et le bonheur que vous m'apportez !

Et merci à toute ma famille, mes parents, mes frères Cédric et Gaël, pour votre soutien et tellement plus encore...

Table des matières

RESUME.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCTION.....	9
1. Le microbiote intestinal.....	9
1.1. Préalable	9
1.2. Les techniques d'étude du microbiote.....	10
1.3. La composition du microbiote intestinal	21
1.4. Etablissement et évolution du microbiote intestinal au cours du temps.....	24
1.5. Le rôle du microbiote intestinal.....	25
2. Microbiote intestinal et mucite post-chimiothérapie.....	27
2.1. Introduction	27
2.2. Physiopathologie de la mucite post-chimiothérapie : rôle du microbiote intestinal.....	28
2.3. Modifications du microbiote intestinal au cours de la chimiothérapie.....	31
2.4. Une complication fréquente faisant suite à la chimiothérapie : la diarrhée.....	38
OBJECTIFS DU TRAVAIL	42
MATERIELS ET METHODES	43
1. La population de l'étude.....	43
1.1. Critères d'inclusion et de non-inclusion.....	43
1.2. Le protocole de chimiothérapie	44
1.3. L'antibioprophylaxie	44
2. Le protocole de l'étude.....	45
2.1. Le dessin expérimental de l'étude.....	45
2.2. Les échantillons de selles	46
2.3. La diarrhée post-chimiothérapie sévère.....	46
3. Extraction de l'ADN bactérien.....	47
3.1. Utilisation du kit Qiagen et lyse mécanique par Minibeadbeater-16	47
3.2. Contrôle de l'ADN par dosage spectrophotométrique	48
4. La dHPLC.....	48
4.1. Présentation générale de la technique.....	48
4.2. La PCR primaire.....	49
4.3. PCR de reconditionnement.....	50
4.4. Purification des produits de PCR	50
4.5. Analyse par dHPLC.....	50
4.6. Le séquençage des pics obtenus	53
5. Le pyroséquençage	54
5.1. Présentation générale de la technique.....	54

5.2. PCR primaire.....	56
5.3. Quantification des amplicons, assemblage et pyroséquençage	57
6. Analyses statistiques.....	58
6.1. Tests statistiques usuels.....	58
6.2. Analyses des données de la dHPLC	59
6.3. Analyse des séquences obtenues par pyroséquençage	60
RESULTATS	61
1. Caractéristiques cliniques des patients	61
2. Collection des échantillons de selles	62
3. Modifications du microbiote intestinal suite à la chimiothérapie : analyse par la dHPLC.	62
3.1. Généralités.....	62
3.2. Analyse en composantes principales	63
3.3. Classification hiérarchique ascendante.....	67
3.4. Conclusions de l'analyse par dHPLC.....	68
4. Modifications du microbiote intestinal suite à la chimiothérapie : analyse par pyrosequencing	68
4.1. Détail des séquences obtenues.....	68
4.2. Comparaison de la diversité avant et après chimiothérapie.....	71
4.3. Différences taxonomiques entre les échantillons collectés avant et après la chimiothérapie.	74
4.4. Prédiction de la métagénomique fonctionnelle	77
5. Modifications du microbiote intestinal prédictives de la survenue d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère.....	82
5.1. Diversité réduite dans l'échantillon post-chimiothérapie chez les patients développant une diarrhée post-chimiothérapie sévère.....	82
5.2. Taxa différenciant les patients développant une diarrhée post-chimiothérapie sévère	87
6. Evaluation de nos échantillons de selles par rapport à différentes études déjà publiées	89
DISCUSSION	91
1. Modifications du microbiote fécal au cours de la chimiothérapie.....	91
1.1. Déplétion du phylum Firmicutes au cours de la chimiothérapie : Facteur de risque de diarrhée post-chimiothérapie sévère.....	91
1.2. Augmentation du phylum Bacteroidetes au cours de la chimiothérapie : Facteur de risque de diarrhée post-chimiothérapie sévère.....	93
1.3. Augmentation du phyla Proteobacteria au cours de la chimiothérapie	95
1.4. Diminution des Bifidobacteria	99
2. Limites de l'étude.....	100
3. Perspectives	101
3.1. Médecine prédictive	101
3.2. Probiotiques et prébiotiques	101
3.3. Transplantation fécale	104

CONCLUSION	108
REFERENCES.....	109
ANNEXES	Erreur ! Signet non défini.

RESUME

La diarrhée post-chimiothérapie est un effet secondaire fréquent en cancérologie. Elle peut mettre en jeu le pronostic vital. Cependant, la physiopathologie de la diarrhée post-chimiothérapie est à ce jour mal connue et l'impact du microbiote intestinal dans la survenue de la diarrhée n'est pas rapporté à ce jour. L'objectif de notre travail était de décrire les modifications du microbiote fécal survenant au cours de la chimiothérapie et de rechercher des caractéristiques du microbiote fécal prédisposant à la survenue d'une diarrhée. Nous avons inclus 36 patients ayant un lymphome non-hodgkinien et recevant une même chimiothérapie de conditionnement. La flore fécale a été analysée par pyroséquençage. Les séquences ont été analysées avec QIIME. Douze (33%) patients ont développé une diarrhée sévère, dans un délai médian de 13 jours. Nos résultats montrent qu'il y a une diminution de l'alpha-diversité au cours de la chimiothérapie, et que cette diminution est encore plus marquée chez les patients ayant une diarrhée sévère. L'analyse de la bêta-diversité sépare en 3 groupes distincts les échantillons collectés avant la chimiothérapie, les échantillons collectés après la chimiothérapie des patients n'ayant pas de diarrhée sévère et les échantillons collectés après la chimiothérapie des patients ayant une diarrhée sévère ($p < 0,001$). L'analyse discriminante linéaire rapporte que le genre *Bacteroides* est significativement associé à la survenue d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère alors que les genres *Escherichia*, *Atobopium*, *Oribacterium*, *Anaerococcus*, *Blautia*, *Mogibacterium*, *Bifidobacterium* sont significativement associés à l'absence de survenue d'une diarrhée. Notre étude a permis de faire un inventaire complet des modifications du microbiote fécal survenant au cours de la chimiothérapie et a montré qu'il est possible de prédire la survenue d'une diarrhée sévère par l'analyse d'un prélèvement de selles collecté en médiane 6 jours plus tôt.

ABSTRACT

Chemotherapy-induced diarrhea (CID) is one of the main side effects suffered from cancer patients. Clinically, CID contributes to significant fluids and electrolytes depletion leading to hemodynamic collapse and death. However, the pathobiology and the intestinal microbiota alterations associated with this outcome remains incompletely understood. The objective of our study was to determine if specific alterations of the fecal microbiota are associated with subsequent severe CID. We included 36 adult patients with non-Hodgkin's lymphoma undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. All the patients received the same chemotherapy myeloablative conditioning regimen. We collected prechemotherapy and postchemotherapy fecal samples. Bacterial communities were profiled using 454 pyrosequencing of the V5 and V6 hypervariable 16S rRNA gene regions and sequence data were analysed using the QIIME pipeline. We found that fecal microbiota of patients that develop subsequent severe CID exhibit a specific alteration in alpha and beta diversity in postchemotherapy samples. Furthermore, the distribution of bacterial species within the fecal microbiota of the patients that develop severe CID was purposely altered. Following chemotherapy, fecal microbiota turned toward two distinct phylogenetic signatures. Linear discriminant analysis showed that *Bacteroides* was significantly associated with the development of subsequent severe CID whereas *Escherichia*, *Atobopium*, *Oribacterium*, *Anaerococcus*, *Blautia*, *Mogibacterium*, *Bifidobacterium* were significantly associated with the absence of subsequent severe CID. In this study, we showed that a specific fecal microbiota alteration predict patients that will develop severe CID by a median of 6 days. Assessment of fecal microbiota may identify patients at risk for severe CID during intensive chemotherapy and preventive manipulations of the intestinal microbiota should be tested to prevent this serious side effect.

INTRODUCTION

1. Le microbiote intestinal

1.1. Préalable

Le microbiote intestinal, antérieurement appelé microflore intestinale, correspond à l'ensemble des micro-organismes qui colonisent le tube digestif. Il est majoritairement composé de bactéries. Il contient aussi, en nombre plus faible, des archées, des champignons, des eucaryotes inférieurs et des virus ¹. Tout au long du tractus digestif, un être humain héberge environ 10^{14} bactéries, soit environ dix fois plus que les cellules de l'organisme ¹. La grande majorité se localise au niveau du colon distal, où l'on dénombre 10^{11} bactéries par gramme de contenu ^{2,3}.

Les études moléculaires ont conduit à la description d'une diversité d'espèces permettant d'estimer que plusieurs centaines d'espèces bactériennes composent le microbiote intestinal d'un sujet adulte ⁴. La majorité des espèces bactériennes sont spécifiques de l'hôte, avec une grande variabilité dans la distribution des communautés bactériennes entre individus⁴. Le nombre de gènes du microbiote intestinal, appelé métagénome intestinal, est au moins cent fois plus important que le génome humain, soit plus de neuf milliards de gènes ⁵. A l'inverse de la diversité d'espèces décrite au sein du microbiote intestinal, les fonctions des gènes apparaissent conservées entre les différents individus ^{4,6}. Ainsi, à l'échelon du gène, il a été décrit l'existence d'un noyau du microbiome humain, retrouvé chez la majorité des individus, assurant les fonctions essentielles à l'hôte ⁷.

La progression dans la connaissance du microbiote intestinal a été exponentielle au cours des dernières années, du fait des avancées technologiques considérables, aussi bien en ce qui concerne les techniques de séquençage que les méthodes d'analyse bio-informatique. L'importance de la diversité du microbiote intestinal humain, mais aussi l'impact de ses fonctions sur la santé humaine ont pu être totalement réévalués ⁸.

1.2. Les techniques d'étude du microbiote

1.2.1. La culture *in vitro*

Initialement, ce sont les techniques de culture *in vitro* qui ont été appliquées à l'étude du microbiote intestinal. Cette méthode a permis d'isoler et de répertorier les espèces dominantes du microbiote fécal selon les règles de la taxonomie classique ⁹. Cependant, elle s'est trouvée limitée par le fait que la majorité des bactéries du microbiote intestinal appartiennent à des espèces anaérobies strictes et par la sélectivité des milieux de culture utilisés ¹⁰. Ainsi, plus de 80% des bactéries qui composent le microbiote intestinal ne sont pas cultivables en laboratoire par les méthodes classiques de microbiologie ¹¹.

1.2.2. Les techniques de biologie moléculaire

1.2.2.1. Généralités : des techniques basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S

Durant les dernières décennies, des outils indépendants de la culture se sont développés afin de s'affranchir des contraintes liées à la culture. Cela a permis une réévaluation complète du microbiote intestinal ¹¹⁻¹³.

Ces techniques, basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) permettent de classifier les micro-organismes en différents niveaux taxonomiques. L'ARNr 16S est une molécule ubiquitaire, constituée de régions conservées permettant l'identification du domaine, de régions variables permettant l'identification du groupe et de régions hypervariables permettant l'identification de l'espèce (**Figure1**). Ainsi, cette molécule présente un double intérêt : la séquence du gène qui la code est à la fois suffisamment différente d'une espèce à une autre pour qu'on puisse distinguer ces dernières, et suffisamment proche pour qu'on puisse établir leur degré de parenté (**Figure 2**).

Les études appliquant les méthodes basées sur le séquençage de l'ARNr 16S sont, à ce jour, la norme pour décrire la diversité bactérienne et l'identification taxonomique des bactéries constituant le microbiote intestinal ^{13,14}. Parmi les méthodes, on recense les techniques d'empreintes, la PCR quantitative, l'hybridation in-situ couplée à la cytométrie en flux et les techniques de séquençage ¹³.

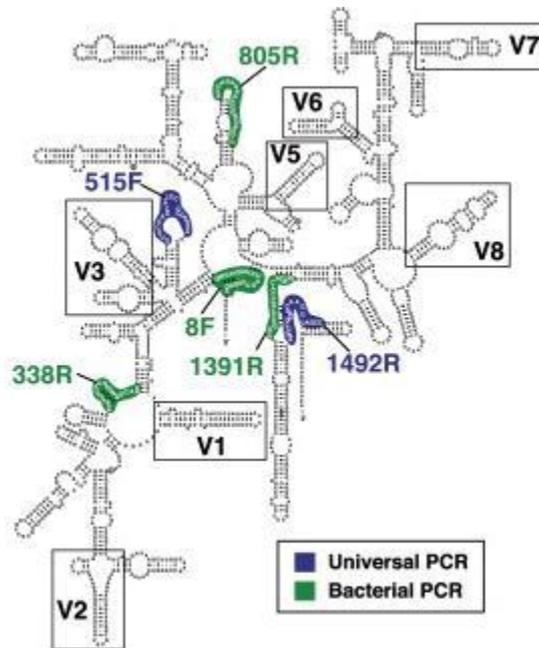


Figure 1. Représentation du gène codant l'ARN ribosomal 16S bactérien et ces différentes régions ¹⁵

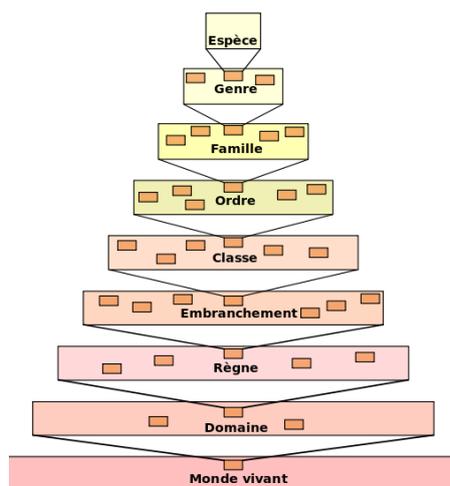


Figure 2. Identification phylogénétique d'une bactérie à partir du séquençage de l'ARNr 16S, du domaine jusqu'à l'espèce ¹⁶

1.2.2.2. Les techniques d'empreinte

Les techniques d'empreintes, dites aussi de « fingerprinting », permettent de visualiser la diversité des groupes bactériens ou des espèces bactériennes constituant le microbiote ¹⁷⁻²⁴.

Elles nécessitent au préalable une étape d'amplification par PCR. Le principe est ensuite celui d'une électrophorèse en milieu dénaturant, c'est-à-dire que les amplicons sont séparés en conditions dénaturantes. On observe alors des bandes ou des pics distincts, correspondant théoriquement à une séquence spécifique. La dénaturation peut être effectuée par un gradient chimique (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE), un gradient thermique (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis : TTGE) ou par chromatographie (denaturing High Performance Liquid Chromatography : dHPLC) (**Figure 3**). Ensuite, il est possible d'exciser et de séquencer une bande ou un pic jugé d'intérêt pour effectuer l'identification par séquençage de l'espèce correspondante.

Ces méthodes sont rapides et relativement peu coûteuses. Cependant, elles sont limitées dans l'apport d'informations phylogénétiques, n'autorisant l'observation que des espèces dominantes, c'est-à-dire dont la proportion d'ADN extrait est supérieure à 1% de l'ADN de la population totale ^{24,25}. Une autre limite est la co-migration, c'est-à-dire que des fragments d'ADN de séquences différentes occupent parfois la même position sur le gel, empêchant ainsi de différencier certaines espèces ²⁴.

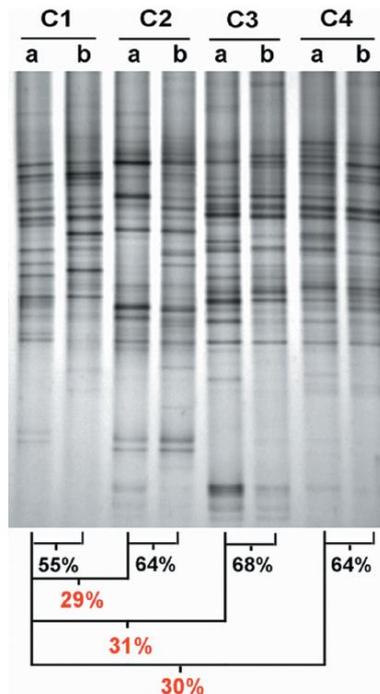


Figure 3. Exemple d'analyse DGGE avec obtention de profils en différents bandes comparant des prélèvements fécaux de sujets sains et de patients. L'analyse statistique s'effectue avec le calcul d'index de similarité, reposant sur l'analyse du nombre, de la position, et de l'intensité de la bande de gris ²⁶.

1.2.2.3. L'hybridation in situ couplée à la cytométrie en flux (FISH)

La technique FISH est basée sur l'utilisation des sondes oligonucléotidiques fluorescentes spécifiques, ciblant des séquences d'ARNr 16S d'un groupe bactérien ou d'une espèce bactérienne ²⁷. Un ensemble de 15 sondes permettrait de caractériser 90% des bactéries constituant le microbiote intestinal ²⁸.

Cette technique permet l'identification de bactéries préalablement définies par l'expérimentateur et elle est très sensible et très spécifique d'une population donnée. Elle est de ce fait limitée pour identifier de nouvelles espèces bactériennes ou réaliser un inventaire exhaustif de la composition phylogénétique du microbiote intestinal.

1.2.2.4. La PCR quantitative (qPCR)

Cette technique de PCR quantitative est basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques d'un groupe bactérien ou d'une espèce bactérienne ²⁹. Elle nécessite au préalable une amplification par PCR. La quantification repose sur le suivi, à chaque cycle, de la réaction d'amplification à l'aide d'une molécule fluorescente émettant un rayonnement proportionnel à la quantité d'ADN produite ³⁰. Deux techniques existent : SYBR GREEN et TaqMan ^{31,32}.

La PCR quantitative présente l'avantage d'être très sensible et très spécifique pour quantifier une population donnée mais est limitée par l'aspect laborieux de sa mise au point. En effet, la mise au point des amorces peut se révéler complexe et longue. En outre, la qPCR a les mêmes limites que la technique FISH, elle ne permet que l'identification de groupes ou d'espèces préalablement définis.

1.2.2.5. Les techniques de séquençage haut-débit

1.2.2.5.a. Le séquençage Sanger

La méthode de séquençage Sanger a permis d'effectuer les premiers inventaires basés sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S ³³. Cependant, cette méthode est relativement fastidieuse et son coût élevé.

Ainsi, la technique de séquençage de Sanger a été définitivement dépassée par les techniques de séquençage à haut-débit, comme le pyroséquençage.

1.2.2.5.b. Le séquençage haut-débit : pyroséquençage 454

Le pyroséquençage a permis une accélération dans l'étude des communautés microbiennes complexes ^{7,9,34-37}. En quelques heures, il est possible de séquencer 25 millions de bases avec 99% d'exactitude. De plus, l'autre intérêt de cette technique réside dans l'utilisation de codes-barres, constitués de nucléotides prédéterminés, permettant de suivre chaque échantillon et donc d'en analyser plusieurs en même temps.

Le pyroséquençage a plusieurs limites. Tout d'abord son coût est élevé. De plus, cette technique automatisée génère environ 16% de séquences chimères³⁷. Cependant, ces séquences chimériques sont maintenant aisément exclues au cours de l'analyse bio-informatique. Enfin, parce qu'il est basé sur séquençage du gène codant l'ARNr 16S, les fonctions des micro-organismes constituant le microbiote intestinal échappent à son investigation.

1.2.2.5.c. L'analyse bio-informatique

Dans le même temps, les outils bio-informatiques se sont considérablement développés pour pouvoir analyser le volume gigantesque de données obtenues par le séquençage haut-débit³⁸.

D'abord, les séquences sont classées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) selon le pourcentage de similarité des séquences entre elles. Les OTUs indiquent les différents niveaux de résolution taxonomique : à 99% on désigne une souche, à 97% une espèce, à 95% un genre et à 90% une famille. Il est alors possible de définir le pourcentage de chaque séquence en termes d'OTUs par rapport à l'ensemble des séquences³⁸.

Ensuite, les analyses de la diversité des communautés microbiennes reposent sur des mesures écologiques descriptives, classiquement l'alpha-diversité et la bêta-diversité^{38,39}. L'alpha-diversité, ou richesse d'un échantillon, est quantifiée directement, par le nombre de taxa (c'est à dire le nombre d'espèces), ou indirectement par des index comme le Chao1 ou l'index de Shannon^{40, 41}. L'alpha-diversité est utilisée pour quantifier la perte de diversité, par exemple après une antibiothérapie ou en association avec une pathologie donnée (**Figure 4**). Cependant, l'alpha-diversité est limitée par le fait qu'elle ne permet pas d'identifier les taxa impliqués dans un gain ou une perte de biodiversité. La bêta-diversité permet, elle, de comparer des régions entre elles, elles-mêmes composées des plusieurs échantillons qui caractérisent chaque région (**Figure 5**). Elle définit le degré dans lequel les taxa sont communs aux échantillons. Ainsi, la mesure de la bêta-diversité permet de répondre à la question suivante: « Quel est le degré de similarité entre le microbiote fécal du patient A et le microbiote fécal du patient B? ». Les analyses de bêta-diversité sont faites en générant une matrice de distances métriques par la méthode UniFrac (Unweighted et Weighted) ou Bray Curtis et sont visualisées avec

une analyse en coordonnées principales^{38,42,43}. Ce type de visualisation, aussi appelée ordination, donne une vision qualitative des facteurs les plus extrêmes associées à la variance des données. Elle ne reflète donc que les caractéristiques les plus extrêmes de variations. Ainsi des associations entre les profils taxonomiques peuvent exister et seront pas visibles dans une ordination. De plus, l'ordination ne donne pas d'informations concernant la significativité statistique d'une éventuelle association ou si des facteurs exogènes, tels que les antibiotiques ou les artéfacts techniques, peuvent aussi intervenir dans une association détectée par l'analyse en coordonnées principales³⁸.

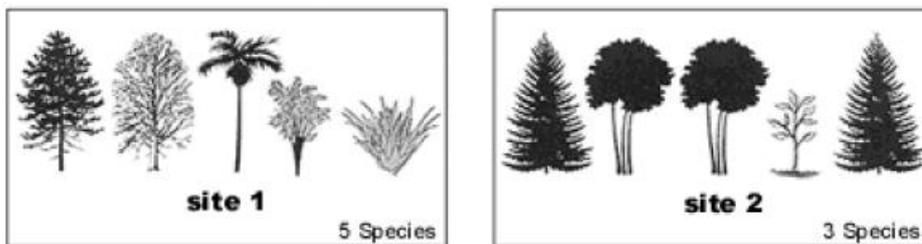


Figure 4. L'alpha-diversité compare la diversité entre 2 sites (par exemple site 1 et site 2). Ici, on peut dire que l'alpha-diversité est plus importante dans le site 1 (qui contient 5 espèces différentes) que le site 2 (qui ne contient que 3 espèces différentes).

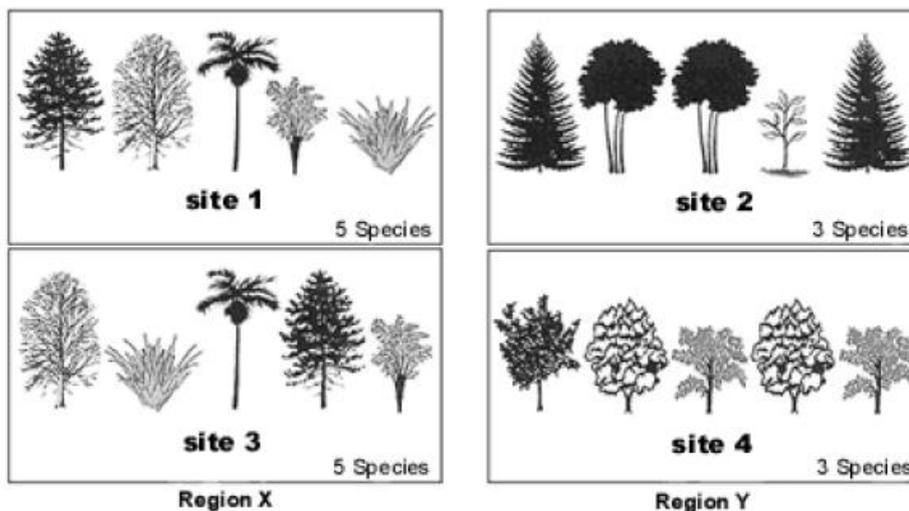


Figure 5. La bêta-diversité compare la diversité à l'échelle de plusieurs régions (par exemple région X et Y), composées de plusieurs sites (site 1 et 3 pour la région X, site 2 et 4 pour la région Y). Ici, on peut dire que la bêta-diversité est plus importante dans la région Y, qui contient

globalement 6 espèces différentes dans les différents sites, alors que la région X contient 5 espèces différentes mais qui sont toutes retrouvées dans les 2 sites.

Il est donc important de tester si les métadonnées (par exemple les données cliniques des patients inclus dans l'étude : âge, sexe, prise antérieure d'une antibiothérapie, stade de gravité de la maladie...) sont associées significativement avec des augmentations ou des diminutions de taxa ou de fonctions. Des outils biostatistiques tels que LEfSe (LDA Effect Size) (**Figure 6**) ou MaAsLin (Multivariate Analysis by Linear Models) (**Figure 7**) ont été développés pour pouvoir répondre à ces questions^{44,45}. Ces outils incluent des tables d'abondance, regroupant les différents taxa ou fonctions retrouvés dans les échantillons collectés, et des métadonnées. Elles permettent de mieux évaluer les associations retrouvées entre les différentes conditions testées.

LEfSE est un algorithme permettant la recherche de biomarqueurs pour identifier des caractéristiques génomiques (taxon, voie métabolique, gène) qui caractérisent des différences entre au moins deux conditions différentes. Il identifie d'abord les caractéristiques qui sont statistiquement différentes entre les conditions testées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Ensuite le module applique une analyse discriminante linéaire pour estimer l'importance de l'effet de chaque caractéristique. Ainsi, cette méthode permet de prédire avec robustesse l'appartenance d'une caractéristique génomique à une condition prédéfinie. L'intérêt majeur de LEfSE est la visualisation claire des marqueurs découverts sous la forme d'un arbre taxonomique ou phylogénétique. Un seuil de score à 2,5 a été fixé pour retenir l'intérêt d'une caractéristique comme biomarqueur d'une condition prédéfinie. Cependant, la limite de ce module est qu'il ne tient pas compte des différentes métadonnées des patients.

MaAsLin est un module qui recherche des associations entre les données cliniques des patients et l'abondance de communautés bactériennes ou de fonctions. Les données cliniques peuvent être de tout type : continue (âge, poids), booléenne (sexe) ou discrète (phénotype). L'intérêt de l'application de MaAsLin est de pouvoir associer de multiples métadonnées avec les données du microbiote. En

effet, les résultats fournis par MaAsLin sont l'association d'une communauté du microbiote spécifique à une métadonnée sélectionnée. Cette association est indépendante de l'influence des autres métadonnées étudiées. Cela permet donc de prendre en compte différents facteurs connus pour influencer le microbiote (régime alimentaire, âge, échantillon fécal ou biopsie...). MaAsLin réalise des modèles linéaires avec une méthode de boosting entre un groupe recensant les métadonnées (les prédicteurs) et un groupe recensant l'abondance des communautés microbiennes (les réponses). Cette méthode permet de créer un modèle d'ensemble, qui génère une séquence de modèles afin d'obtenir des prédictions précises. Le boosting des métadonnées et la sélection du modèle se fait à l'échelle de l'OTU. Pour ces données qui sont exprimées en proportions et qui sont platykurtiques, on a recours à la transformation arc-sinus de la racine carrée, les données brutes étant exprimées en valeurs de 0 à 1, afin de les normaliser. La procédure est répliquée pour chaque combinaison possible d'OTU et de métadonnée. Les métadonnées sélectionnées sont alors utilisées dans un modèle linéaire multivarié utilisant les métadonnées comme prédicteurs et l'abondance des OTUs comme réponse.

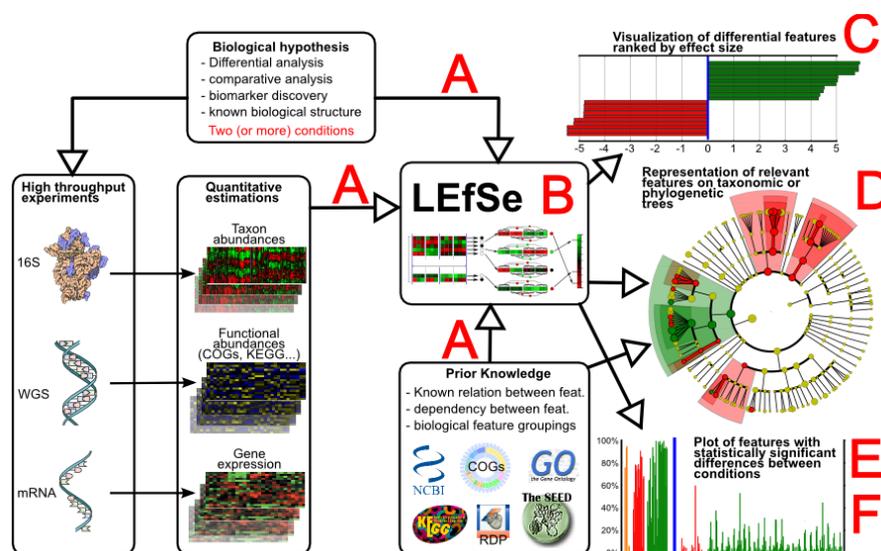


Figure 6. Le module LEfSe repose sur une analyse discriminante linéaire qui permet d'identifier quels sont les taxa ou les fonctions qui sont significativement associées aux conditions testées ⁴⁴

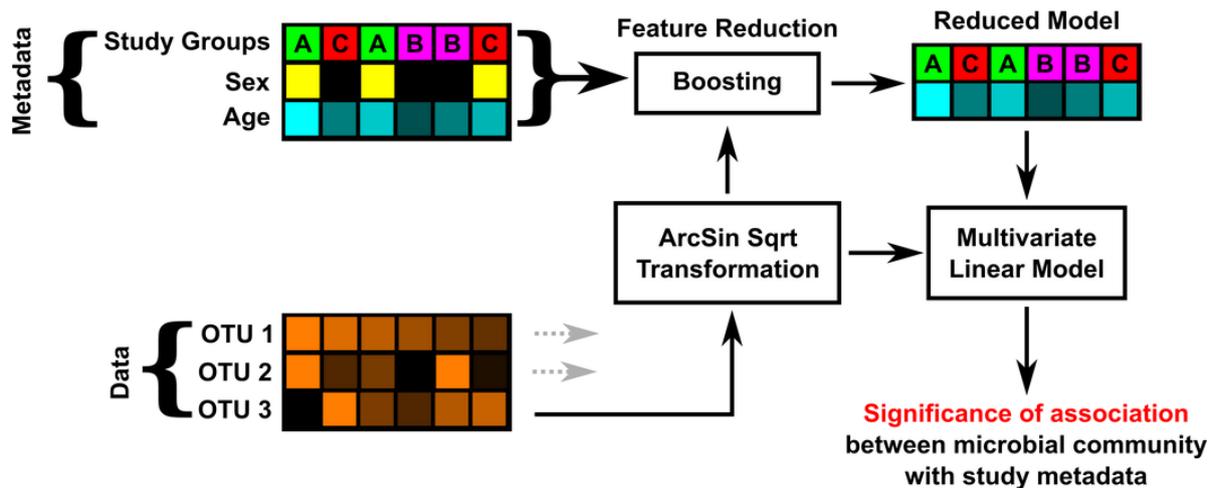


Figure 7. Le module MaAsLin permet de définir quelles sont les métadonnées (par exemple caractéristiques cliniques des patients inclus : âge, sexe, prise antérieure d'une antibiothérapie...) qui sont significativement associées avec les taxa, sur la base d'un modèle linéaire⁴⁵

1.2.2.6. La métagénomique

La métagénomique permet de faire un inventaire complet d'un échantillon collecté car elle ne se limite pas à l'étude du gène codant l'ARNr 16S. Cette approche métagénomique permet, non seulement de fournir une caractérisation phylogénétique de la communauté microbienne présente (analyse des séquences pour l'étude de la biodiversité ou la reconstruction de génomes), mais elle peut aussi informer sur les fonctions présentes portées par la communauté microbienne. Elle permet donc, par une approche de métagénomique fonctionnelle, de découvrir les fonctions présentes dans un environnement. Ainsi, la métagénomique est utilisée pour détailler les caractéristiques fonctionnelles du microbiote intestinal dans différentes conditions, physiologiques ou pathologiques⁷.

A cette approche métagénomique, d'autres approches, regroupées sous le terme « omique », se sont développées pour l'étude des métabolites (métabolomique), des protéines (métaprotéomique) et de l'ARN (métatranscriptomique) (**Figure 8**). Ces techniques permettent de connaître les fonctions actives du microbiote intestinal⁴⁶. Une autre technique, appelée culturomique, consiste à multiplier les conditions de culture (jusqu'à 200 pour un même échantillon) puis à tester toutes les colonies par une

technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF, qui couple une source d'ionisation laser assistée par une matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (Time-Of-Flight). Elle permet d'identifier quasiment autant d'espèces que par la métagénomique et il a été démontré qu'avec 70 conditions de culture différentes, on peut obtenir 100% des bactéries cultivables

47.

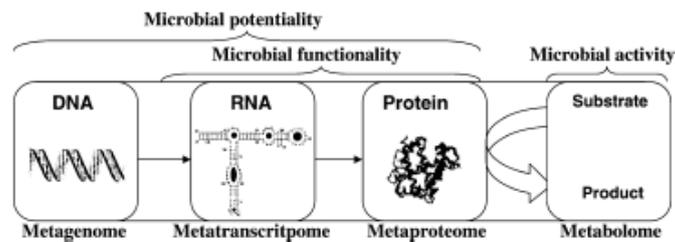


Figure 8. Les différentes approches « omiques » développées à ce jour pour l'étude des communautés microbiennes ⁴⁶

1.2.2.7. Techniques d'analyse du microbiote intestinal : synthèse

Nous avons rapporté une synthèse des différentes techniques utilisées pour l'analyse du microbiote intestinal dans le tableau I, à partir d'un travail réalisé par Sekirov et al. ¹³. Il y est fait état des avantages et des limites de chaque technique d'analyse du microbiote.

Techniques	Objectif	Avantages	Limites
Culture in vitro	- Dénombrement de micro-organismes	- Peu coûteux	- Micro-organismes pas tous cultivables - Milieux sélectifs
Techniques d'empreinte	- Identification taxonomique	- Rapide - Peu coûteux	- Phénomènes de co-migration
Hybridation in situ couplée à la cytométrie en flux (FISH)	- Identification taxonomique	- Utilisation in situ	- Design des sondes - Sélectivité
PCR quantitative	- Identification taxonomique	- Sensible et spécifique - Rapide - Peu coûteux	- Design des amorces et des sondes - Sélectivité
Séquençage haut-débit	- Identification taxonomique - Analyse de la diversité	- Sensible et spécifique - Analyse de plusieurs échantillons en même temps	- Coûteux
Métagénomique	- Identification taxonomique - Fonctions des gènes	- Sensible et spécifique	- Prix - Volume des données à analyser

Tableau I : Présentation des avantages et des limites des techniques d'étude du microbiote intestinal ¹³

1.3. La composition du microbiote intestinal

1.3.1. Généralités

Les travaux basés le séquençage du gène codant l'ARNr 16S gène ont rapporté que plus de 95% des séquences sont assignées à 4 groupes phylogénétiques (ou phyla) : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria sur les 55 existants ^{11,33} (**Figure 9**). Globalement, au sein de ces phyla, 6 genres bactériens prédominent : *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* ¹¹.

Cependant, si l'on reconnaît des caractéristiques très conservées à l'échelon du phylum, à l'échelon des espèces, la caractéristique principale du microbiote intestinal semble être la présence de nombreuses espèces spécifiques de l'individu ¹¹. L'estimation du nombre d'espèces bactériennes contenues dans le microbiote intestinal est comprise entre 500 et 1000 selon les études, et jusqu'à 3500 espèces bactériennes dans l'étude la plus récente ^{1,48,49}.

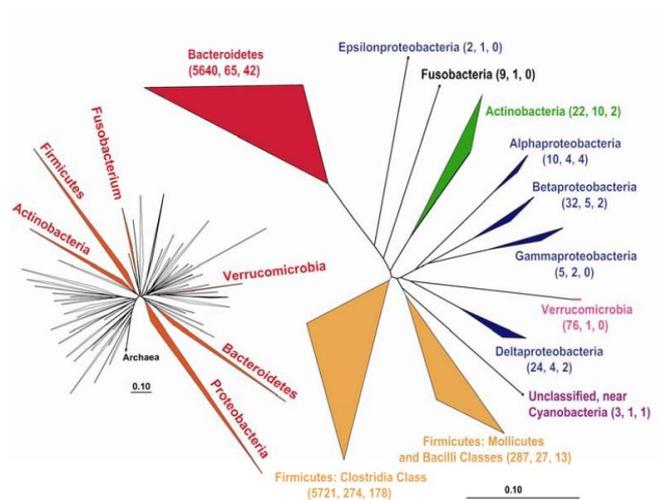


Figure 9. Arbre phylogénétique microbiote intestinal humain ¹¹

Le phylum Firmicutes, le plus souvent retrouvé en dominance chez l'homme, correspond aux espèces anaérobies à Gram-positif, dont la grande majorité appartient à la classe Clostridii ¹¹. A l'échelon de la famille, *Lachnospiraceae*, *Clostridiaceae* et *Ruminococaceae* sont les plus fréquemment

représentées ⁴⁹. A l'échelon du genre, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Coprococcus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, et *Dorea* sont majoritaires ^{11,50}.

Les Bacteroidetes regroupent les bactéries anaérobies à Gram-négatif appartenant principalement aux genres *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* et *Prevotella* ^{11,50}.

Le phylum Actinobacteria est retrouvé en faible quantité dans le microbiote intestinal d'individus adultes sains. Il représente moins de 1% des bactéries totales. On y recense principalement le genre *Bifidobacterium* ^{11,50}.

Enfin, le phylum Proteobacteria, retrouvé en très faible quantité dans le microbiote intestinal d'individus adultes sains, est représenté principalement par le genre *Escherichia* ^{11,50} (**Figure 10**).

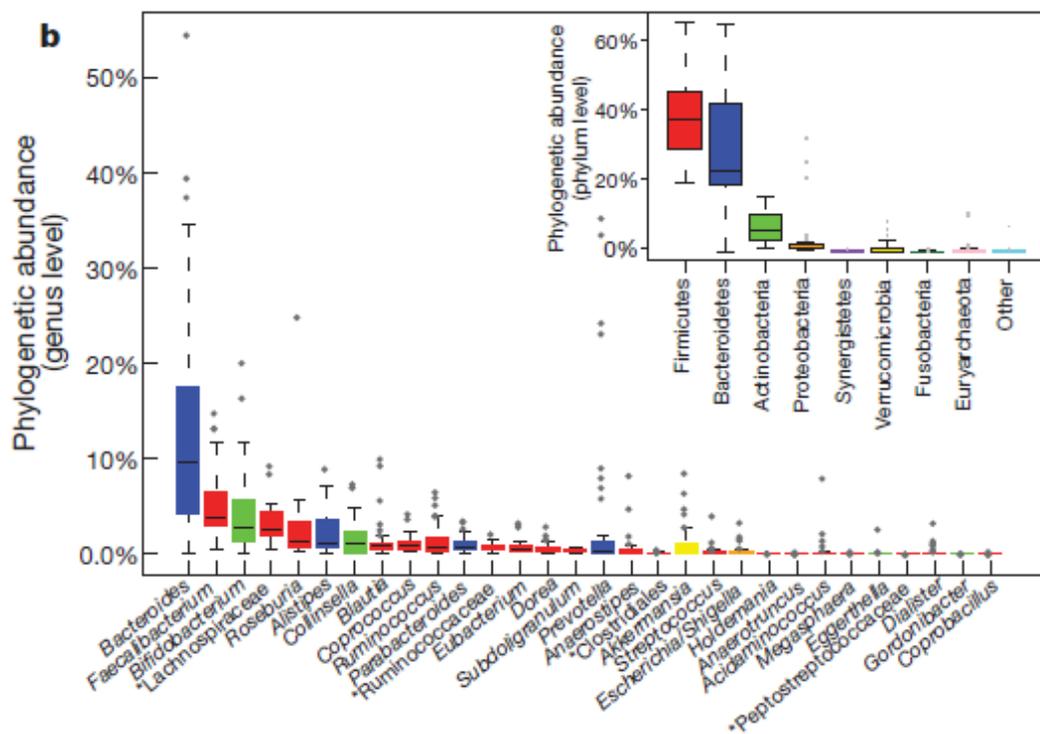


Figure 10. Représentation des différents phyla et genres retrouvés au niveau du microbiote fécal dans une large étude chez des individus adultes ⁵⁰

1.3.2. Distribution des bactéries dans le tractus gastro-intestinal humain

La répartition du microbiote intestinal n'est pas homogène tout au long du tractus gastro-intestinal. Typiquement, il se répartit en trois grandes régions qui offrent des conditions physico-chimiques différentes aux communautés bactériennes qui y sont hébergées.

1.3.2.1. La flore gastrique

Du fait de l'acidité gastrique et de la présence d'oxygène, l'estomac héberge peu de bactéries. La charge microbienne dans l'estomac a été estimée à 10^4 unité formant colonies (UFC) par gramme de contenu³. Le genre *Helicobacter Pylori* y est dominant mais d'autres genres, comme *Streptococcus* et *Lactobacillus*, sont également présents en plus faible quantité⁵¹.

1.3.2.2. La flore de l'intestin grêle

L'intestin grêle est marqué par un appauvrissement en oxygène jusqu'à sa disparition dans l'iléon. Cette situation permet à la flore bactérienne de devenir progressivement plus abondante. On retrouve 10^3 - 10^4 CFU par gramme de contenu dans le duodénum, 10^5 - 10^7 CFU par gramme de contenu dans le jéjunum et 10^7 - 10^8 CFU par gramme de contenu dans l'iléon³.

Au niveau du duodénum et du jéjunum, le microbiote est composé de bactéries anaérobies facultatives tels que les lactobacilles, les streptocoques et les entérobactéries, mais aussi de bactéries anaérobies strictes notamment les bifidobactéries, les genres *Bacteroides* et *Clostridium*⁵².

Au niveau de l'iléon, le microbiote est beaucoup plus diversifié et proche de celui du colon. Il est composé en majorité de bactéries anaérobies strictes appartenant aux genres *Bacteroides* et *Clostridium*. On retrouve aussi des bifidobactéries, lactobacilles, entérobactéries et entérocoques^{4,52}.

1.3.2.3. La flore colique et fécale

La population bactérienne la plus dense est retrouvée au niveau du colon, représentant environ 50% du volume du contenu du colon et contenant environ 70% des micro-organismes du corps humain^{3,53,54}. Le phylum Firmicutes domine le microbiote colique, rassemblant les genres *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium* et *Ruminococcus*. Ensuite, on retrouve le phylum Bacteroidetes, représenté principalement par le genre *Bacteroides*. On retrouve également, en plus faible proportion, le phylum Actinobacteria avec les genres *Bifidobacterium* et *Atopobium* et le phylum Proteobacteria avec le genre *Escherichia*⁵²⁻⁵⁴.

En ce qui concerne la flore fécale, qui est la plus fréquemment étudiée en raison de la facilité de prélèvement, la quantité de bactéries est similaire à celle retrouvée au niveau de la muqueuse colique. Les genres les plus représentés sont *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Alistipes* (**Figure 8**)⁵⁰.

Cependant, plusieurs études ont montré qu'il existait des différences entre la composition de la flore fécale et celle du microbiote associée à la muqueuse colique^{55,56}. Cette différence est principalement liée à la proportion des bactéries aérobies-anaérobies facultatives, qui sont quasiment absentes des fèces.

1.4. Etablissement et évolution du microbiote intestinal au cours du temps

A la naissance, le nouveau-né, confiné dans un environnement stérile, est exposé aux bactéries de la mère et de l'environnement. Le nouveau-né est d'abord colonisé par des entérobactéries, staphylocoques, entérocoques, streptocoques puis par les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*⁵⁷.

La composition du microbiote se diversifie ensuite sous l'influence de multiples facteurs exogènes, dont l'allaitement et le régime alimentaire, et se stabilise en moyenne à l'âge de deux ans, devenant proche de celui de l'adulte⁵⁸⁻⁶⁰.

A l'autre extrémité de la vie, le vieillissement va entraîner un déclin des bifidobactéries et des Bacteroidetes en faveur des entérobactéries et des entérocoques⁶¹⁻⁶² (**Figure11**).

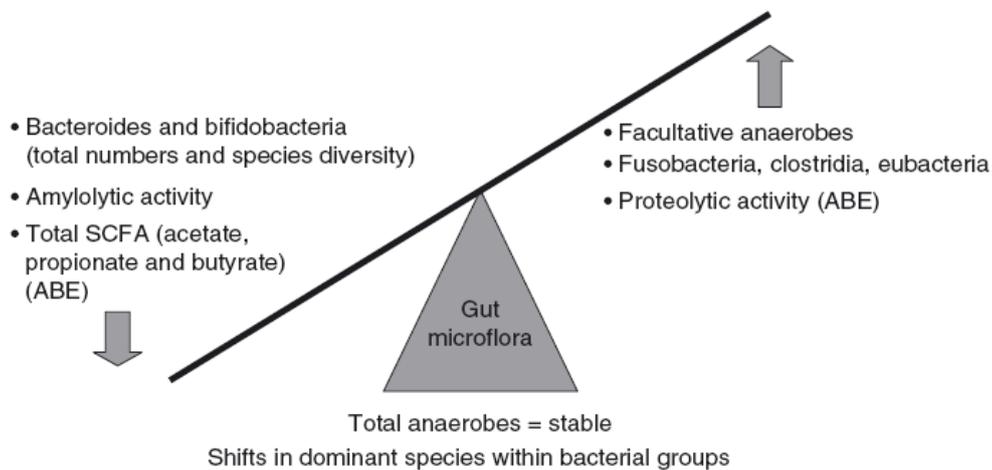


Figure 11. Modifications du microbiote fécal chez la personne âgée⁶¹

1.5. Le rôle du microbiote intestinal

L'écosystème intestinal est le résultat d'une interaction entre l'hôte et le microbiote intestinal tendant vers un équilibre, appelé eubiose^{4,63}. Ainsi, le microbiote intestinal exerce de nombreuses fonctions bénéfiques pour l'hôte qui l'héberge et participe au maintien de l'homéostasie⁶⁴.

1.5.1. Fonction métabolique

Le microbiote intestinal joue un rôle nutritionnel par la fermentation de nombreux substrats pour produire de l'énergie. De plus, les métabolites absorbés peuvent avoir des effets sur la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales⁶⁴. Le microbiote intestinal apporte aussi des acides aminés et des vitamines (vitamine K, vitamines B) et intervient dans le métabolisme, entre autre, des sels biliaires et du cholestérol⁶⁶.

1.5.2. Fonction barrière

Le microbiote intestinal s'oppose à la colonisation du tractus gastro-intestinal par des bactéries potentiellement pathogènes de l'environnement externe. Il exerce un antagonisme puissant vis-à-vis des bactéries en transit avec le bol alimentaire. Il contrôle aussi le développement excessif de bactéries pathogènes faiblement représentées au sein du microbiote intestinal. Afin d'assurer cette résistance à la colonisation, le microbiote intestinal bloque l'accès aux sites d'adhérence de l'épithélium intestinal, bloque la pénétration d'antigènes, consomme les nutriments disponibles et sécrète des molécules antimicrobiennes et des agents antibactériens ⁶⁵.

De plus, le microbiote intestinal régule la composition du mucus qui recouvre et protège la muqueuse intestinale ⁶⁷.

1.5.3. Fonction immunologique

Dès la naissance, l'immunité est stimulée par la colonisation du tractus gastro-intestinal. Ainsi, des études ont montré que l'absence de microbiote intestinal diminue le nombre de cellules du système immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale ^{68,69}. Cette relation entre le microbiote intestinal et le système immunitaire est spécifique de l'hôte de l'espèce. Ainsi, des souris axéniques colonisées par un microbiote humain avaient un système immunitaire peu développé comparativement aux souris colonisées par un microbiote de souris. De plus, les souris axéniques colonisées par un microbiote de souris étaient protégées contre les infections comparativement aux souris colonisées par un microbiote humain ⁷⁰.

2. Microbiote intestinal et mucite post-chimiothérapie

2.1. Introduction

2.1.1. Définition

La mucite gastro-intestinale correspond à des lésions inflammatoires et/ou ulcéraives du tractus gastro-intestinal ⁷¹. Il s'agit d'un effet secondaire fréquent en cancérologie, en rapport avec la toxicité de la chimiothérapie ou de la radiothérapie ⁷². Les symptômes de la mucite gastro-intestinale regroupent : douleur abdominale, hémorragie, nausées, vomissements ou diarrhée ⁷².

Cet effet secondaire peut-être responsable d'une déshydratation, de troubles ioniques, d'infections, en particulier des bactériémies, pouvant avoir des conséquences potentiellement fatales ^{72,73}. De ce fait, la mucite gastro-intestinale peut occasionner un délai dans la réalisation des différentes cures de chimiothérapie ou de radiothérapie programmées, conduisant à réduire l'intensité du cycle de chimiothérapie ou de radiothérapie. Au total, cet effet indésirable peut contribuer à un traitement non optimal du cancer ^{73,74}.

2.1.2. Incidence

L'incidence de la mucite est difficile à définir, parce que les patients n'ont pas, en routine, une imagerie ou une endoscopie afin de confirmer l'inflammation caractéristique de la muqueuse intestinale. De plus, les symptômes liés à la mucite ne sont pas spécifiques.

Cependant, dans les essais cliniques randomisés de phase III, l'incidence de la mucite est estimée à 40% chez les patients recevant une dose standard de chimiothérapie et 100% chez les patients recevant une chimiothérapie à haute-dose, comme c'est le cas, par exemple, en oncohématologie, chez les patients recevant une chimiothérapie intensive de conditionnement à une greffe de cellules souches hématopoïétiques ^{72,73}.

2.2. Physiopathologie de la mucite post-chimiothérapie : rôle du microbiote intestinal

2.2.1. L'inflammation intestinale aiguë: Modèles de colite expérimentale

L'inflammation intestinale se caractérise, macroscopiquement, par la présence d'ulcérations, de sténose ou de fistules. Le processus inflammatoire s'étend à toutes couches de la paroi intestinale, et est responsable d'un épaissement pariétal⁷⁵⁻⁷⁸.

On retrouve peu de données sur la composition du microbiote intestinal au cours de l'inflammation intestinale aiguë. Une étude par culture in vitro suggère que certains anaérobies, dont *Bacteroides* et *Clostridium*, seraient impliqués dans l'induction de l'inflammation dans un modèle de colite expérimentale induite par l'acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique (TNBS)⁷⁵.

Une étude récente, analysant le microbiote intestinal par qPCR, dans un modèle de colite expérimentale induite par le DDS (Dextran Sodium Sulfate) chez des souris, a rapporté que le microbiote intestinal était profondément modifié par rapport aux souris contrôles. Le taux d'Enterobacteriaceae, *Akkermansia* et *Desulfovibrio* était plus élevé dans le groupe DSS par rapport au groupe contrôle (p<0,001 ; p = 0,005 ; p = 0,025 ; respectivement), alors que le taux de *Lactobacillus* était abaissé (p = 0,026)⁷⁶.

Une autre étude, utilisant aussi la qPCR, a rapporté que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* était significativement diminués dans le groupe DSS par rapport aux souris contrôles⁷⁷.

Toujours avec le même modèle de colite murine induite par le DSS, une étude appliquant la technique de pyroséquençage a montré que les familles *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Deferribacteraceae* et *Verrucomicrobiaceae* étaient significativement augmentées par rapport aux contrôles⁷⁸.

Au total, ce modèle de colite expérimentale induite par le DSS montre qu'il existe des changements significatifs dans la composition du microbiote intestinal qui font suite à l'inflammation induite par le DSS. A noter que dans ces études, les symptômes cliniques étaient concomitants ou

précédaient l'analyse du microbiote intestinal, cette analyse étant faite précocement (au 3^{ème} jour du traitement par TNBS ou DDS) ou à l'euthanasie de l'animal.

Ainsi, des modifications du microbiote intestinal observées au cours de la mucite pourraient être la conséquence d'une inflammation intestinale initiale.

2.2.2. Modèle physiopathologique de la mucite

Un modèle physiopathologique a été proposé par Sonis pour décrire la physiopathologie de la mucite post-chimiothérapie ⁷⁹. Ce modèle repose sur 5 phases successives impliquées dans la genèse de la mucite :

- i) Une phase d'initiation avec la production de radicaux libres favorisant l'activation du Nuclear Factor-kB
- ii) Une phase d'induction de messagers, comme le Tumor Necrosis Factor α , induisant inflammation et apoptose
- iii) Une phase d'amplification et de signalisation aboutissant à une majoration de l'inflammation et de l'apoptose
- iv) Une phase d'ulcération conduisant à une destruction de la barrière épithéliale, favorisant la translocation bactérienne
- v) Une phase de cicatrisation spontanée, caractérisée par une prolifération cellulaire dès que la chimiothérapie est stoppée

2.2.3. Implications du microbiote intestinal dans la mucite : hypothèses

physiopathologiques

Cependant, ce modèle proposé par Sonis ne fait pas intervenir le microbiote intestinal. Pourtant, il pourrait être impliqué dans les différentes étapes de la survenue de la mucite gastro-

intestinale^{80,81}. Le microbiote intestinal joue un rôle important dans l'homéostasie intestinale et a des effets protecteurs sur l'intégrité de la muqueuse intestinale (**Figure 12**).

L'interaction du microbiote intestinal avec une population spécifique de récepteurs Toll-like contribue à l'activation du Nuclear Factor- κ B, avec pour conséquence le développement d'une inflammation de bas grade⁸². L'activation de ces voies de signal supporte la réparation de la muqueuse et la protection de l'intestin contre l'inflammation^{83,84}. Ainsi, une perturbation du microbiote intestinal pourrait jouer un rôle important dans l'établissement d'une inflammation intestinale.

La chimiothérapie peut aussi augmenter la perméabilité intestinale qui résulte pour partie d'une apoptose des cryptes intestinales et d'une atrophie vilositaire⁸⁵⁻⁸⁹. Or, le microbiote intestinal participe à la régulation de la fonction barrière de l'intestin, notamment en modulant l'expression et la distribution des protéines des jonctions serrées. Ainsi, une perturbation du microbiote intestinal pourrait jouer un rôle important dans l'altération de la perméabilité intestinale^{80,90}.

De même, le mucus colique est un élément clé contribuant à l'intégrité de l'intestin. Il a été montré qu'un probiotique, VSL3, pouvait stimuler l'expression du gène des mucines et la sécrétion des mucines⁹¹. Ainsi, une perturbation du microbiote intestinal pourrait entraîner une altération de l'expression des différentes mucines coliques.

Toutes ces données permettent d'envisager l'implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie de la mucite post-chimiothérapie⁸¹.

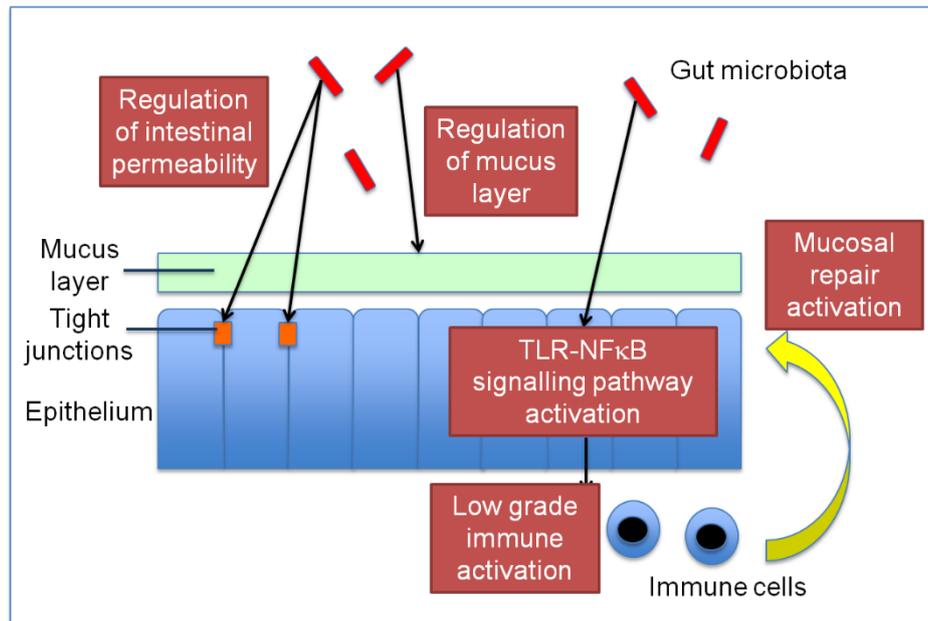


Figure 12. Actions potentielles du microbiote intestinal sur la muqueuse intestinale ⁸¹

2.3. Modifications du microbiote intestinal au cours de la chimiothérapie

2.3.1. Modifications du microbiote intestinal dans les études animales

2.3.1.1. Les études animales rapportées dans la littérature

Les études rapportant les modifications du microbiote intestinal au cours de la chimiothérapie chez l'animal sont synthétisées dans le **Tableau II**. Les chimiothérapies utilisées étaient le 5-Fluorouracil (5-FU) et l'Irinotécan, les 2 molécules anticancéreuses les plus utilisées en pratique courante. Ces études ont appliquées les techniques de culture in vitro et de qPCR.

Stringer et al. ont examiné, par qPCR, des échantillons fécaux collectés suite à l'administration intrapéritonéale d'une dose de 5-FU chez des rats. Ils ont retrouvés une tendance à l'augmentation de *Clostridium* spp., de *Staphylococcus* spp., d'*E. coli* associée à une diminution de *Bacteroides*, de *Lactobacillus*, d'*Enterococcus* dans les heures suivant le traitement ⁹².

Une autre étude, appliquant la culture in vitro, avec la même molécule sur 6 jours chez des rats, a rapporté une augmentation des Gram-négatifs et une diminution des Gram-positifs, aussi bien

dans l'intestin grêle que dans le colon, en comparant des échantillons collectés avant et après la chimiothérapie⁹³.

Stringer et al. ont aussi étudié, avec une technique de culture in vitro, les modifications de la flore colique et fécale chez des rats suite à l'administration d'une dose intrapéritonéale d'Irinotécan. Au niveau du colon, ils ont retrouvé une tendance à l'augmentation d'*Escherichia* spp., de *Clostridium* spp., d'*Enterococcus* spp., de *Serratia* spp. et de *Staphylococcus* spp. dans les heures suivant l'administration de la chimiothérapie. Au niveau du microbiote fécal, ils ont rapporté une tendance à l'augmentation de *Proteus* spp., de *Clostridium* spp., de *Peptostreptococcus* spp., associées à une diminution de *Bacillus* spp. et de *Bifidobacterium* spp. suite au traitement⁹⁴.

Dans une étude utilisant le même protocole de chimiothérapie, avec une analyse par qPCR d'échantillons fécaux, les auteurs ont retrouvé une augmentation d'*E. coli* et de *Staphylococcus* spp. associée à une diminution de *Lactobacillus* spp. après l'administration de l'Irinotécan ($p < 0,05$)⁹⁵.

Chez des rats, recevant de l'Irinotécan sur 3 jours, Lin et al. ont analysé le microbiote fécal par DGGE et qPCR. Au 3^{ème} jour, ils ont retrouvé, une diminution du nombre total de bactéries, particulièrement des *Clostridium* clusters IV and XIVa par rapport aux échantillons collectés avant traitement. Au 7^{ème} jour, le nombre total de bactéries et le genre *Bacteroides* étaient restaurés. Par contre, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* spp. restaient significativement diminués alors que le *Clostridium* cluster XI et les *Enterobacteriaceae* restaient significativement plus élevés par rapport au début du traitement⁹⁶.

Les même auteurs ont ensuite évalué les modifications du microbiote fécal suite à une association Irinotécan et 5-FU, plus proche de la pratique clinique. Ils ont alors montré que le *Clostridium* cluster XI (contenant *Clostridium difficile*), le *Clostridium* cluster XIVa et les *Enterobacteriaceae* augmentaient alors que le *Clostridium* cluster IV diminuait au cours de la chimiothérapie ($p < 0,05$)⁹⁶.

Au total, ces études animales ont montré que suite à l'administration de 5-FU ou d'Irinotécan, il existe une diminution des bactéries essentielles à l'homéostasie intestinale (par exemple

Bifidobacterium, *Lactobacillus*) et une augmentation des bactéries potentiellement pathogènes comme *Escherichia* ou *Enterococcus*. Ces micro-organismes sont d'ailleurs fréquemment isolés dans les hémocultures chez les patients cancéreux^{93,97}. Ces résultats montrent aussi que les effets sur le microbiote intestinal de la chimiothérapie semblent transitoires, avec une correction de la dysbiose, certes de façon incomplète, dans les jours suivant l'arrêt du traitement. Ces résultats indiqueraient une résilience du microbiote intestinal suite à la chimiothérapie comme cela a été démontré précédemment avec l'antibiothérapie⁹⁸.

Etude	Nombre de sujets inclus	Chimiothérapie utilisée et dosage	Technique d'analyse utilisée	Echantillons analysés	Commentaires
Stringer et al., 2009 ⁹²	- 81 rates Dark Agouti	- 1 seule dose intrapéritonéale de 5-FU (150 mg/kg)	- qPCR	- Selles	- Augmentation <i>Clostridium</i> spp. et <i>Staphylococcus</i> spp. à H24 (p<0,05), tendance à l'augmentation <i>E. coli</i> à 48h, diminution <i>Bacteroides</i> et <i>Lactobacillus</i> à H12.
Von Bültzingslöwen et al., 2003 ⁹³	- 75 rates Lewis	- Durant 6 jours 50 mg/kg/j de 5-FU	- Culture in vitro	- Intestin grêle et colon	- Intestin grêle: diminution des Gram-positifs (71 vs 10% ; p<0,01 par rapport aux non traités) et augmentation des Gram-négatifs (5 vs 70% ; p<0,01 par rapport aux non traités). - Colon: diminution des Gram-positifs (44 vs 2%, p<0,001 comparés aux non traités) et augmentation des Gram-négatifs (48 vs 98% ; p<0,05 comparés aux non traités)
Stringer et al., 2007 ⁹⁴	- 81 rates Dark Agouti	- 1 seule dose intrapéritonéale de 200 mg/kg d'Irinotecan	- Culture in vitro	- Colon et selles	- Colon : tendance à l'augmentation <i>Escherichia</i> spp. entre H6 et H24, <i>Clostridium</i> spp. à H2, <i>Enterococcus</i> spp. à H6, une <i>Serratia</i> spp. à H1, <i>Staphylococcus</i> spp. à H1. - Selles: tendance à l'augmentation <i>Proteus</i> spp. à H24, <i>Clostridium</i> spp. à H2, <i>Peptostreptococcus</i> spp. à H1 heure, diminution <i>Bacillus</i> spp. à H12 h, <i>Bifidobacterium</i> spp. à H1.

Stringer et al., 2008 ⁹⁵	- 81 rates Dark Agouti	- 1 seule dose intrapéritonéale de 200 mg/kg d'Irinotecan	- qPCR	- Selles	- Augmentation <i>E. coli</i> entre H24 et H48, <i>Staphylococcus</i> spp. entre H2 et H12, diminution <i>Lactobacillus</i> spp. entre H12 et H48 (p<0,05)
Lin et al., 2012 ⁹⁶	- 30 rats	- 125 mg/kg d'Irinotecan pendant 3 jours	- DGGE et qPCR	- Selles	- A J3: diminution du nombre total de bactéries (~1 log), particulièrement <i>Clostridium</i> clusters IV and XIVa (1-3 logs). - A J7, nombre total de bactéries et de <i>Bacteroides</i> restaurés, <i>Lactobacillus</i> et <i>Bifidobacterium</i> spp. plus faibles qu'à J0, <i>Clostridium</i> cluster XI (~0,5 log) et <i>Enterobacteriaceae</i> (~1,5 logs) plus élevés qu'à J0. - Association irinotecan 50 mg/kg et 5-FU 50 mg/kg à J1 et J8 et à J2 et J9 respectivement. Analyse à J11 : augmentation <i>Clostridium</i> cluster XI (~2 logs), <i>Clostridium</i> cluster XIVa et <i>Enterobacteriaceae</i> i (~0,5 log), diminution <i>Clostridium</i> cluster IV (~0,5 log).

Tableau II. Etudes précliniques évaluant les modifications du microbiote intestinal au cours de la chimiothérapie.

2.3.1.2. Les limites des modèles animaux dans l'étude du microbiote intestinal

Tout d'abord, si le microbiote intestinal des souris et le microbiote humain sont relativement similaires à l'échelon du phylum, avec la prépondérance des phyla Firmicutes et Bacteroidetes, la majorité du microbiote intestinal à l'échelon du genre est différent entre la souris et l'homme : au moins 85% de séquences retrouvées chez la souris ne se sont pas détectées chez l'homme⁹⁹ (**Figure 13**).

De plus, il y a des différences importantes entre les modèles animaux d'inflammation intestinale induite et la pathologie humaine, que ce soit en termes de lésions morphologiques, de colonisation microbienne et de manifestations cliniques¹⁰⁰.

Cependant, ces modèles animaux restent essentiels pour étudier la pathogenèse des processus inflammatoires de l'intestin, pour d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et pour tester l'efficacité et la toxicité de thérapeutiques immuno-modulatrices.

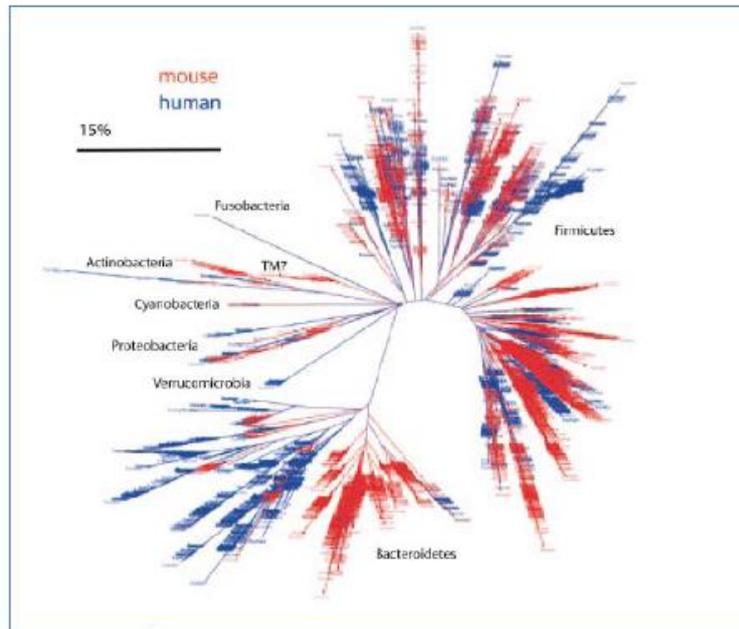


Figure 13. Arbre phylogénétique différentiel du microbiote intestinal humain (en bleu) et murin (en rouge) ⁹⁹

2.3.2. Modifications du microbiote intestinal chez l'homme

Deux études ont étudié les modifications du microbiote fécal dans les suites d'une chimiothérapie et sont rapportées dans le **Tableau III**. van Vliet et al. ont analysé le microbiote fécal de 9 enfants recevant quatre cycles de chimiothérapie par les techniques de DGGE et FISH. Ils ont montré que le nombre total de bactéries était diminué suite au traitement et qu'il y avait une diminution de *Bacteroides*, *Clostridium* cluster XIVa, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Bifidobacterium*. Cette diminution était significative par rapport aux sujets témoins ($p < 0,004$). A l'arrêt du traitement, une restauration était retrouvée pour *Clostridium* XIVa et *F. prausnitzii*, alors que *Bacteroides* et *Bifidobacterium* restaient abaissés. Ils rapportaient aussi une augmentation d'*Enterococcus* comparativement aux sujets contrôles ($p < 0,038$). Les auteurs concluaient alors que les

modifications du microbiote intestinal au cours d'un traitement par chimiothérapie augmentent le risque de bactériémie à Gram-positif ¹⁰¹.

Dans une autre étude regroupant 17 patients pris en charge en ambulatoire pour différents cancers (leucémie, lymphome, myélome, cancer colorectal, cancer urothélial, cancer mammaire, cancer ovarien) et recevant de multiples régimes de chimiothérapie, associé ou non à une antibiothérapie, Zwielehner et al. ont analysé des échantillons de selles par qPCR et DGGE. Ils ont montré que le nombre total de bactéries était diminué chez les patients cancéreux par rapport aux sujets contrôles ($p < 0,05$). Ils rapportaient ainsi une augmentation des *Bacteroides* (de 26 à 28%) et de *Clostridium* cluster IV (de 16 à 18%) associée à une diminution des bifidobacteria (de 1,4 à 0,5%) et de *Clostridium* cluster XIVa (de 22 to 19%) suite à la chimiothérapie. Ils ont aussi étudié les modifications du microbiote chez 2 patients avec la technique de pyroséquençage. Ils rapportent une augmentation de *Peptostreptococcaceae* (dont les séquences sont similaires à 98,9% à *Clostridium difficile*) et d'*Enterococcus faecium* ainsi qu'une diminution de *Faecalibacterium*, lactobacilli, *Veillonella*, bifidobacteria et *Escherichia* suite à la chimiothérapie (**Figure 14**). De plus, des séquences apparaissaient après la chimiothérapie, qui n'étaient pas détectées dans le prélèvement collecté avant la chimiothérapie. Il s'agissait des genres : *Eggerthella*, *Megasphaera*, *Parvimonas*, *Anaerostipes*, *Eubacterium*, *Anaerococcus*, *Methylobacterium*, *Holdemania*, *Turicibacter*, *Akkermansia*, *Sutterella*, *Sphingomonas*, *Anaerotruncus*, *Coprococcus*, *Streptococcus* and *Dorea* ¹⁰².

Au total, ces 2 études montrent qu'il existe bien des modifications du microbiote au cours de la chimiothérapie en pratique clinique. Cependant, même si l'une d'elles applique le pyroséquençage pour seulement 2 patients, elles ne permettent pas de faire un inventaire complet des altérations du microbiote au cours de la chimiothérapie.

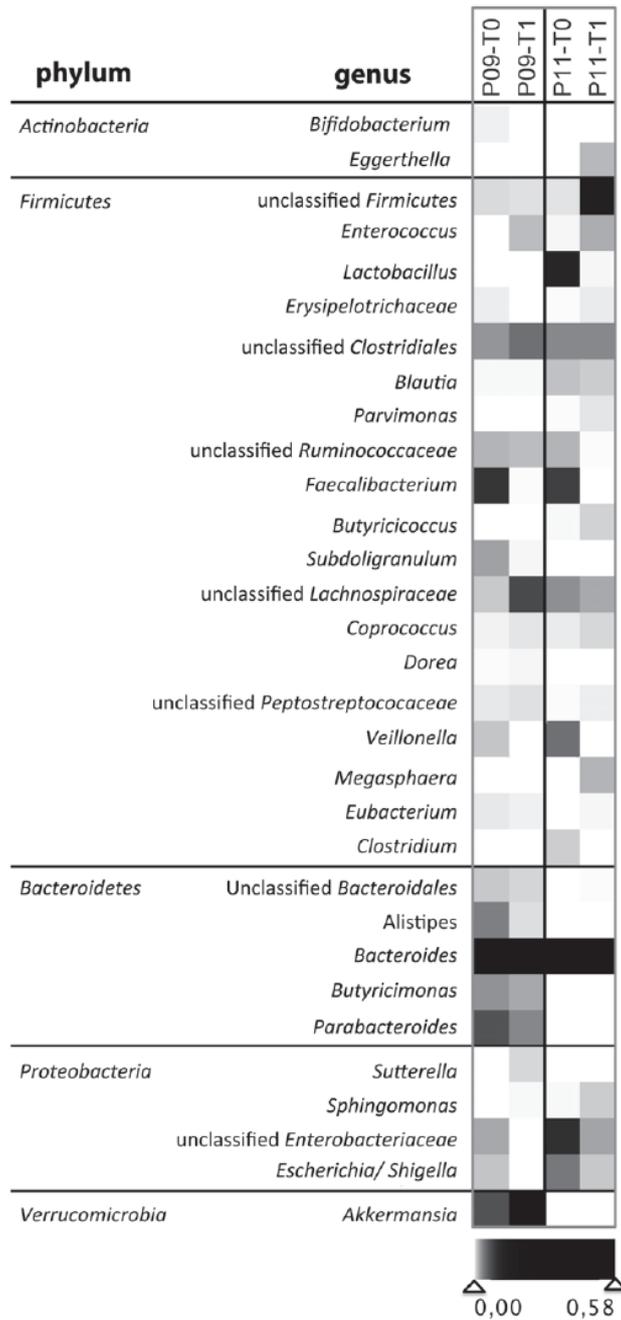


Figure 14. Heatmap représentant les modifications des genres étudiées par pyroséquençage 454 chez 2 patients avant et après la chimiothérapie (T0 : échantillon collecté avant la chimiothérapie, T1 : échantillon collecté 4 jours après la chimiothérapie¹⁰²

Etude	Nombre de sujets	Molécules utilisées	Techniques d'analyse utilisées	Echantillons	Commentaires
van Vliet et al., 2009 ¹⁰¹	- 9 enfants ayant une leucémie aiguë myéloïde	- Cytarabine, daunorubicine, etoposide, amsacrine, mitoxantrone	- DGGE, FISH	- Selles	- Diminution du nombre total de bactéries suite à la chimiothérapie (d'un facteur 100 par rapport aux sujets contrôles), <i>Clostridium</i> cluster XIVa, <i>F. prausnitzii</i> , et <i>Bifidobacterium</i> (p<0,004 par rapport aux sujets sains), diminution des streptocoques (p<0,016 par rapport aux sujets sains), augmentation des entérocoques (p<0,038 par rapport aux sujets sains) - A la fin du traitement : restauration de <i>Clostridium</i> XIVa et <i>F. prausnitzii</i> , alors que <i>Bacteroides</i> et <i>Bifidobacterium</i> toujours diminués (facteur 10–300-fold par rapport aux sujets sains).
Zwielehner et al., 2011 ¹⁰²	- 17 patients pris en charge en ambulatoire	- Nombreuses molécules de chimiothérapie utilisées	- qPCR, DGGE	- Selles	- Diminution du nombre total de bactéries par rapport aux sujets sains (p<0,05). - Augmentation de <i>Bacteroides</i> (26 à 28%) et <i>Clostridium</i> cluster IV (16 à 18%), diminution des bifidobacteria (1,4 à 0,5%) et <i>Clostridium</i> cluster XIVa (22 à 19%) suite à la chimiothérapie.

Tableau III. Modifications du microbiote intestinal au décours de la chimiothérapie en pratique clinique

2.4. Une complication fréquente faisant suite à la chimiothérapie : la diarrhée

2.4.1. Généralités

2.4.1.1. Définition

La diarrhée est une complication fréquente de la chimiothérapie. Il n'existe pas de définition consensuelle de la diarrhée post-chimiothérapie et la survenue d'une diarrhée post-chimiothérapie se

défini généralement par une augmentation du nombre de selles ainsi que par l'apparition de selles nocturnes liquides dans les suites de la chimiothérapie ¹⁰³. Le délai de survenue n'est pas mentionné. La classification du National Cancer Institute, Common Terminology Criteria for Adverse Effects (CTCAE), est la plus souvent utilisée pour évaluer la gravité de la diarrhée post-chimiothérapie ¹⁰³.

2.4.1.2. Incidence de la diarrhée post-chimiothérapie

On estime que globalement 50% des patients recevant une chimiothérapie développent une diarrhée post-chimiothérapie. Dans 20% des cas, cette diarrhée est considérée comme une diarrhée sévère (grade 3 et 4 de la classification CTC-NCI v4.0.) ^{72,104}.

Le risque de diarrhée sévère est estimé à 5% chez les patients recevant une dose standard de chimiothérapie. Cependant, ce risque est beaucoup plus élevé avec certaines chimiothérapies. Ainsi, le risque est estimé à 15% avec le Folfox (5-Fluorouracil et Oxaliplatine) ou le Folfiri (5-Fluorouracil et Irinotecan), et à 30% chez les patients recevant le Folfoxiri (5-Fluorouracil, Oxaliplatine et irinotecan) ^{105,106}.

Ainsi, l'incidence de la diarrhée post-chimiothérapie est relativement variable en fonction de la molécule de chimiothérapie utilisée ^{72,104}. Par exemple, elle est très fréquente en oncologie du fait de l'utilisation de protocoles de chimiothérapie à haute doses utilisés pour le conditionnement à l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ⁷².

2.4.1.3. Conséquences de la diarrhée post-chimiothérapie

La diarrhée post-chimiothérapie entraîne de manière non exceptionnelle une réduction de posologie ou un espacement des doses, voire une interruption définitive de la chimiothérapie, qui peut résulter en un traitement non optimal du cancer ⁷². Elle peut contribuer à altérer la qualité de vie des patients et réduire l'acceptabilité des différents cycles de traitement ⁷².

Elle est potentiellement grave et peut mettre en jeu le pronostic vital en entraînant une déshydratation pouvant aller jusqu'à l'état de choc hypovolémique. Elle peut aussi être responsable d'hospitalisation prolongée et d'une augmentation des dépenses de santé ⁷².

2.4.2. Facteurs de risque de diarrhée post-chimiothérapie

La diarrhée post-chimiothérapie est imprévisible en termes d'incidence et de sévérité, avec de larges variations chez un même patient au cours des différents cycles de chimiothérapie et entre les patients ⁷². Ainsi, il n'a pas été identifié jusqu'à présent de facteurs de risque spécifiques de cet effet indésirable potentiellement grave. Il n'est, à ce jour, pas possible de prédire si un patient va développer une diarrhée post-chimiothérapie ou si un patient a plus de risque d'avoir une diarrhée qu'un autre patient recevant le même traitement ⁷².

2.4.3. Microbiote intestinal et diarrhée post-chimiothérapie : Etudes précliniques

Une étude animale a évalué les modifications du microbiote intestinal associées à la diarrhée post-chimiothérapie. Stringer et al., dans une étude sur 81 rates Dark Agouti recevant une dose intrapéritonéale de 200 mg/kg d'Irinotecan, ont retrouvé une augmentation de l'expression de β -glucuronidase dans le colon 96 à 120 heures après le traitement. Cette augmentation était corrélée à l'incidence de la diarrhée sévère ¹⁰⁷.

2.4.4. Microbiote intestinal et diarrhée post-chimiothérapie en pratique clinique

Une étude a rapporté les modifications du microbiote intestinal associée à la diarrhée post-chimiothérapie. Cette étude, réalisée par Stringer et al., a comparé le microbiote fécal de 16 patients ayant une diarrhée post-chimiothérapie à celui de 2 sujets témoins ne recevant pas de chimiothérapie et n'ayant pas de diarrhée. Les patients inclus recevaient différentes chimiothérapies, associées ou non à

une prise d'antibiothérapie. Les échantillons fécaux étaient analysés par qPCR. Ils ont rapporté que les patients ayant une diarrhée post-chimiothérapie avaient une diminution de *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. et une augmentation d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus* spp. par rapport aux sujets contrôle (**Figure 15**)¹⁰⁸.

Cependant, cette étude ne permet pas de décrire des facteurs de risque de diarrhée post-chimiothérapie, le groupe contrôle ne recevant pas de chimiothérapie.

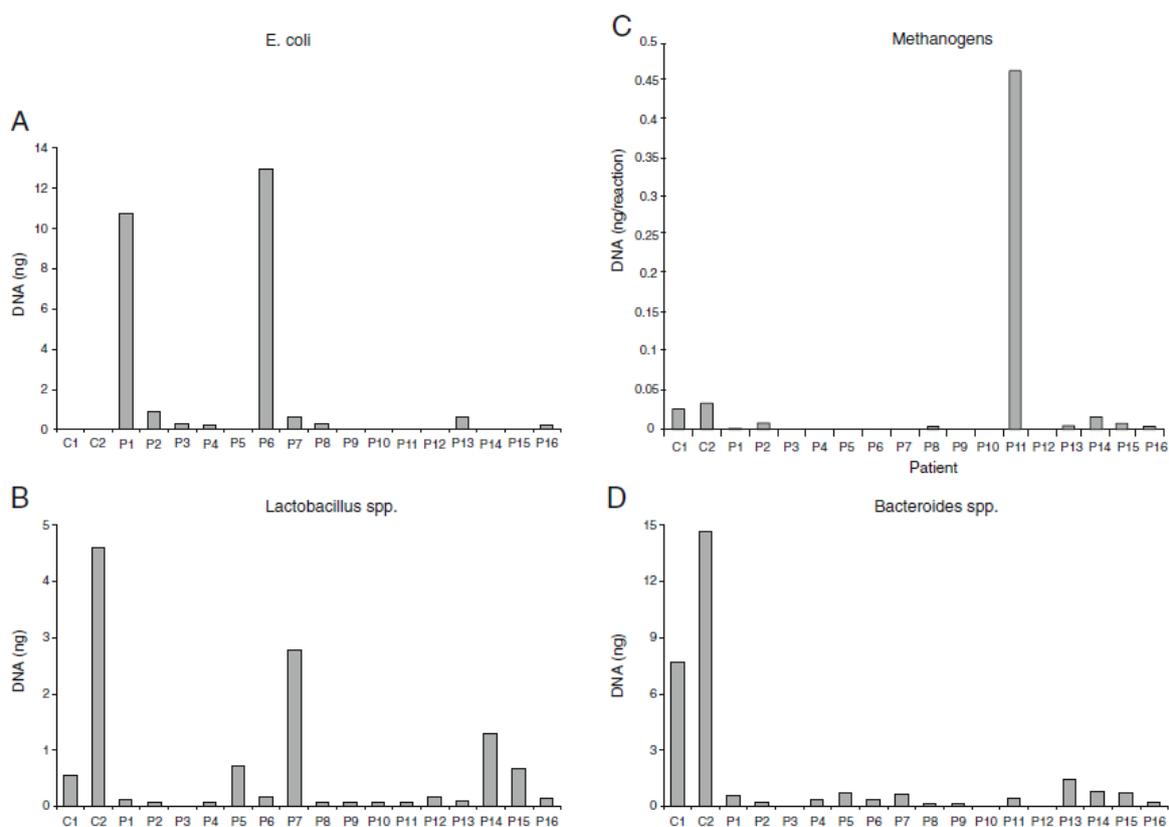


Figure 15. Composition du microbiote fécal chez 2 témoins ne recevant pas de chimiothérapie et n'ayant pas de diarrhée (C1 et C2) et chez 16 patients recevant une chimiothérapie et ayant une diarrhée post-chimiothérapie (P1 à P16). Analyse des échantillons fécaux par qPCR¹⁰⁸

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Dans le cadre de la prise en charge d'un cancer, suite à la chimiothérapie, les patients peuvent développer une complication potentiellement grave : la diarrhée post-chimiothérapie. La question à résoudre est de savoir pourquoi certains patients développent une diarrhée et d'autres pas. Les études, rapportées dans l'introduction, laissent à penser que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans la survenue de cette complication.

Nous avons donc formulé 2 hypothèses :

- 1) Il existe des modifications du microbiote fécal au cours de la chimiothérapie, modifications qui s'intègrent à la physiopathologie complexe et incomplètement élucidée de la mucite post-chimiothérapie.
- 2) Il existe des modifications spécifiques du microbiote fécal associées à la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie.

Notre projet de recherche a donc été construit pour valider ces deux hypothèses.

Le premier objectif de notre travail était de décrire les modifications du microbiote fécal survenant au cours de la chimiothérapie, par une technique de biologie moléculaire bas-débit (dHPLC) puis par une technique de séquençage haut-débit (pyroséquençage).

Le deuxième objectif était de rechercher des caractéristiques du microbiote fécal prédisposant à la survenue d'une diarrhée post-chimiothérapie.

MATERIELS ET METHODES

1. La population de l'étude

1.1. Critères d'inclusion et de non-inclusion

Les patients ont été recrutés dans le service d'hématologie clinique du CHU de Nantes du 1^{er} novembre 2010 au 1^{er} novembre 2012.

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Patient ayant un lymphome non-hodgkinien hospitalisé dans le cadre de la réalisation d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.
- ET recevant une chimiothérapie de conditionnement par BEAM : BiCNU (Carmustine), Etoposide, Cytarabine, Melphalan.

Les critères de non-inclusion étaient les suivants :

- Patient sous antibiothérapie dans le mois précédant l'inclusion, hors antibioprofylaxie prescrite dans le cadre de l'hémopathie
- Patient ayant une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI)
- Patient recevant une nutrition parentérale ou par sonde naso-gastrique
- Patient ayant consommé des probiotiques, prébiotiques dans le mois précédent l'hospitalisation
- Patient dans l'incapacité de recevoir une information éclairée ou de donner un consentement libre et éclairé.

De plus, nous avons exclus de l'analyse des données les patients qui ont développé une infection à *Clostridium difficile* au cours de l'hospitalisation.

Notre protocole de recherche a été validé par le comité d'éthique du CHU de Nantes (Groupe Nantais d'Ethique dans le Domaine de la Santé, avis du 5 octobre 2010, identification du protocole : BRD/10/04-Q).

1.2. Le protocole de chimiothérapie

Tous les patients inclus dans l'étude ont reçu un protocole de chimiothérapie regroupant 4 agents de chimiothérapie dans nous rapportons ici la pharmacodynamie ^{109,110} :

- **BiCNU (Carmustine)** : antinéoplasique cytostatique alkylant appartenant au groupe des nitrosourées. Il agit par alkylation de l'ADN et de l'ARN ainsi que par carbamylation des protéines.
- **Etoposide** : dérivé semi-synthétique de la podophyllotoxine faiblement hydrosoluble. Il inhibe l'entrée en mitose des cellules tumorales, par action sur la topo-isomérase II chargée de ressouder les brins d'ADN après leur cassure.
- **Cytarabine** : antimétabolite spécifique de la phase S du cycle cellulaire. La cytotoxicité de la cytarabine dépend de son métabolite actif, l'ARA-CTP qui, incorporé à l'ADN, en bloque la synthèse. La molécule d'ADN, comprenant de l'ARA-CTP, présente des anomalies structurales aboutissant à des perturbations du métabolisme cellulaire. La cytotoxicité passerait aussi par une inhibition de l'ADN polymérase et par une action sur le système des kinases.
- **Melphalan** : agent alkylant cytostatique bifonctionnel empêchant la séparation et la réplication de l'ADN. Par ses deux groupements alkylés, il établit des liaisons covalentes stables avec les groupements nucléophiles des deux brins d'ADN, empêchant la réplication cellulaire.

1.3. L'antibioprophylaxie

Dans le cadre de la prise en charge de leur hémopathie, les patients pouvait recevoir une antibioprophylaxie avant d'être hospitalisés, c'est-à-dire avant d'être inclus dans l'étude et avant la collection des échantillons fécaux. Celle-ci pouvait être la phénoxy méthylpénicilline (Pénicilline V), le

sulfaméthoxazole-triméthoprime (Cotrimoxazole) ou l'association des deux molécules. L'administration prophylactique de Pénicilline V prévient les infections à streptocoques et le Cotrimoxazole est l'agent de choix pour prévenir les infections à *Pneumocystis* chez les patients immunodéprimés.

Il est important de noter que chez les patients inclus dans l'étude, il n'a pas été utilisé de fluoroquinolone en antibioprofylaxie.

2. Le protocole de l'étude

2.1. Le dessin expérimental de l'étude

Il s'agissait d'une étude pilote prospective, observationnelle et monocentrique.

Le dessin expérimental de l'étude était le suivant (**Figure 16**):

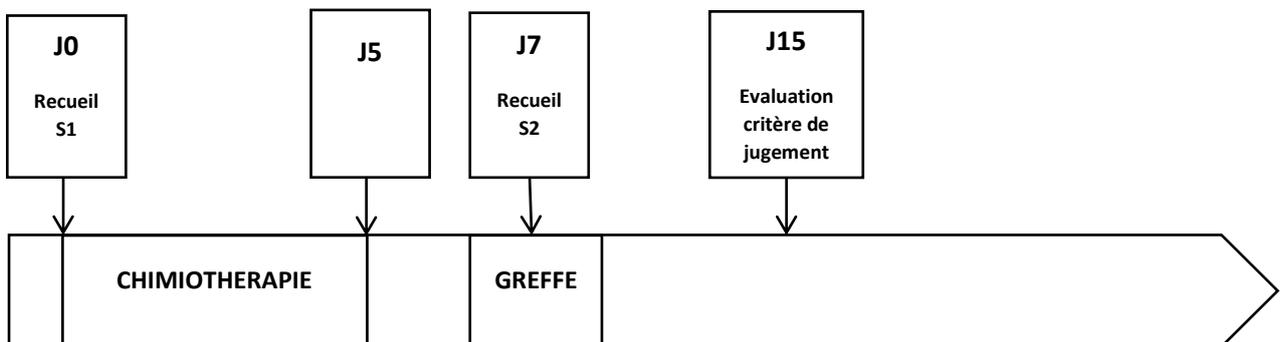


Figure 16. Dessin expérimental du protocole de recherche.

Les différentes étapes clés du protocole de l'étude étaient les suivantes :

J0 : Admission du patient à l'hôpital. Recueil du 1^{er} prélèvement de selles, appelé S1

J0-J5 : Réalisation du protocole de chimiothérapie BEAM

J7 : Réalisation de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Recueil du 2^{ème} prélèvement de selles, appelé S2

J15 : Evaluation du critère de jugement : survenue ou non d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère

2.2. Les échantillons de selles

Deux échantillons de selles étaient collectés chez chaque patient inclus dans l'étude:

- Un échantillon de selles collecté à l'admission à l'hôpital (**avant la chimiothérapie**) appelé

S1

- Un échantillon de selles collecté au 7^{ème} jour de l'hospitalisation, le jour de la greffe de cellules souche hématopoïétiques (**après la chimiothérapie**) appelé S2

Après homogénéisation avec une spatule stérile, les selles étaient pesées et 1 gramme de selles était transféré dans un tube stérile et conservé avec des billes de verre stériles. Les tubes étaient ensuite immédiatement stockés à -80°.

2.3. La diarrhée post-chimiothérapie sévère

La diarrhée post-chimiothérapie sévère, critère de jugement de notre étude, a été définie suivant les recommandations NCI-CTCAE v4.0 ¹⁰³. En effet, nous avons cherché à différencier les patients ayant une diarrhée sévère des patients n'ayant pas de diarrhée ou n'ayant pas de diarrhée sévère. La diarrhée sévère était définie de la façon suivante: patient ayant 7 ou plus de 7 selles par jour, associées ou non à des signes de gravité hémodynamiques requérant une intervention thérapeutique urgente ¹⁰³. Dans la classification NCI-CTCAE cela correspondait aux diarrhées de grade 3 et 4 ¹⁰³. Nous avons considéré que la diarrhée post-chimiothérapie devait survenir avant le 15^{ème} jour de l'hospitalisation pour ne pas être confondue avec une diarrhée post-antibiothérapie, faisant suite à la prescription d'une antibiothérapie large spectre dans le cadre de l'aplasie fébrile.

Gastrointestinal disorders				
Adverse Event	Grade			
	1	2	3	4
Diarrhea	Increase of <4 stools per day over baseline; mild increase in ostomy output compared to baseline	Increase of 4 - 6 stools per day over baseline; moderate increase in ostomy output compared to baseline	Increase of >=7 stools per day over baseline; incontinence; hospitalization indicated; severe increase in ostomy output compared to baseline; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated
				5 Death

Definition: A disorder characterized by frequent and watery bowel movements.

Figure 17. Descriptions des différences stades de gravité de la diarrhée selon le NCI-CTCAE v4.0¹⁰³

3. Extraction de l'ADN bactérien

3.1. Utilisation du kit Qiagen et lyse mécanique par Minibeadbeater-16

La procédure de l'extraction d'ADN bactérien était basée sur le QIAamp® DNA Stool Minikit (Qiagen®) associé à une lyse mécanique par Minibeadbeater-16 (Bead-beater Biospec Products®). Tout d'abord, 200 mg de contenu fécal était homogénéisé avec 180 µL du tampon lysozyme et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Une lyse mécanique était ensuite réalisée, en ajoutant 1,4 mL du tampon ASL, avec le Minibeadbeater-16. L'échantillon homogénéisé était ensuite porté à 95°C pendant 5 minutes and centrifugé pendant 1 minute à 13000 rpm. Le surnageant était ensuite transféré dans un tube de 2 mL, auquel était ajouté une tablette de matrice InhibitEX. Après dissolution, l'échantillon était incubé pendant 1 minute à température ambiante puis centrifugé pendant 6 minutes à 13000 rpm. Le surnageant était ensuite transféré dans un tube de 1,5 mL et centrifugé pendant 3 minutes à 13000 rpm. Ensuite, 200 µL de surnageant était mélangé avec 15 µL de protéinase K et 200 µL de tampon AL et incubé à 70°C pendant 10 minutes. 200 µL d'éthanol était ajouté et la solution était à nouveau centrifugée. La solution obtenue était déposée dans une colonne QIAamp et centrifugée pendant 2 minutes à 13000 rpm. Après 2 procédures de lavage, une avec 500 µL de tampon AW1 et une autre avec 500 µL de tampon AW2, l'ADN était élué en ajoutant 200 µL de tampon AE. Les produits d'extraction étaient ensuite mis en aliquots et conservés à -20°C.

3.2. Contrôle de l'ADN par dosage spectrophotométrique

Le contrôle des aliquots a été fait par dosage spectrophotométrique avec le nanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc®). Pour chaque échantillon, le ratio 260/280 nm a été vérifié. Selon le protocole du QIAamp® DNA Stool Minikit (PN 51504), ce ratio ne devait pas être inférieur à 1,7 afin de garantir la pureté de l'ADN.

4. La dHPLC

4.1. Présentation générale de la technique

La dHPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance Dénaturante) est une technique de chromatographie en conditions dénaturantes, permettant un criblage qui sépare des produits d'amplification du gène (amplicons obtenus par PCR) issus d'une ou plusieurs régions hypervariables de l'ADN ribosomal codant pour l'ARNr 16S. Les différentes étapes de la méthode sont décrites en

Figure 18.

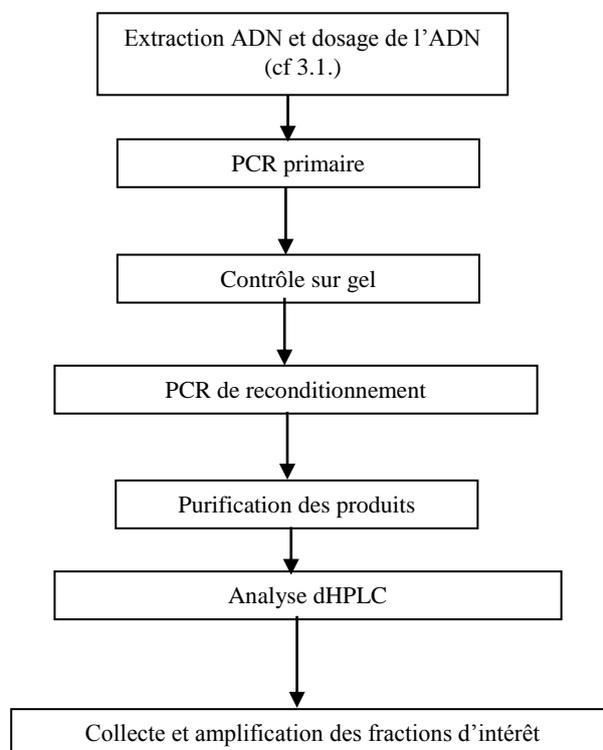


Figure 18. Les différentes étapes de la technique de dHPLC.

4.2. La PCR primaire

Son but était l'amplification des régions hypervariables V6 à V8 du gène codant pour l'ARNr 16S. Le mélange réactionnel était composé de 0,4 µM de chaque amorce (amorces dites universelles F968-30GCT et R1378) (**Tableau IV**), 1X de tampon PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCL, pH 8,3), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de désoxyribonucléotide triphosphate, 2,5 unités de HotGoldStar (Eurogentec®) pour un volume final de 25 µl.

L'amplification a été réalisée sur le thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem®) selon les paramètres suivants : 95°C pendant 10 minutes, suivie de 30 cycles. Chaque cycle a débuté par une étape de dénaturation à 93°C pendant 30 secondes, puis une étape d'hybridation à 60°C pendant 1 minute et enfin une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minute. L'amplification s'est terminée par une élongation finale à 72°C pendant 30 minutes.

L'amplification a ensuite été contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose 1,5%. 5 µL de produit PCR ont été déposés avec 1,2 µL de bleu de dépôt. La migration s'est effectuée dans un tampon TBE 1X (Tris Borate EDTA : 0,1 M de Tris, 0,9 M d'acide borique, 0,01 M d'EDTA à pH= 8,4). Après 30 minutes de migration à 100 volts, la lecture s'est faite sur table UV. Aucune inhibition n'a été mise en évidence (**Figure 19**).

Amorce	Séquence 5' 3'
F-968-30GCT	CGCCCGCCGCGCCCGCCCGCCCGTCCCGCCAACGCGAAGAACCTTAC
R-1378	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG

Tableau IV. Amorces utilisées pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S, régions hypervariables V6 à V8.

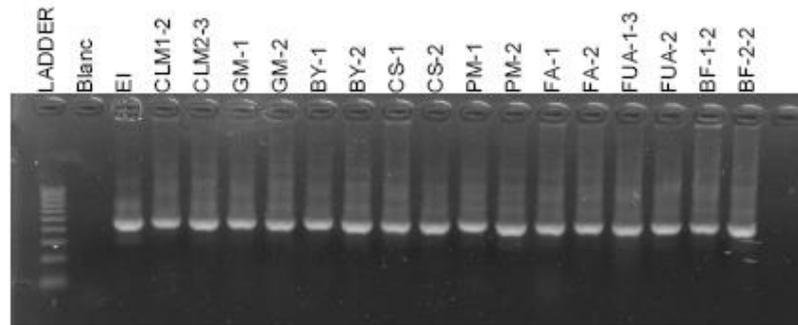


Figure 19. Gel de contrôle des produits d'amplification issus de la PCR primaire (Ladder: Echelle Superladder-Low 100 bp)

4.3. PCR de reconditionnement

Son but était d'optimiser le mélange d'amplicons pour avoir une meilleure réaction en dHPLC en augmentant les amplicons d'intérêt. Le mélange réactionnel était de même composition que celui de la PCR primaire, dans un volume final de 50 μL . 5 μL de la PCR primaire ont été ajoutés au mélange réactionnel. Les paramètres de température de la PCR ont été les même que ceux de la PCR primaire, seul le nombre de cycles a été diminué à 5.

4.4. Purification des produits de PCR

La purification des produits de PCR s'est faite via le kit QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen®).

4.5. Analyse par dHPLC

Les produits de PCR purifiés ont ensuite été analysés par dHPLC sur le Wave® Microbial Analysis System (Transgenomic®). 5 μL de produit ont été injectés dans le système. Les différents amplicons ont ensuite été séparés sur colonne DNASep® HT (Transgenomic®).

Le débit imposé à la colonne a été de 0,9 mL par minute. Deux tampons ont été utilisés pour créer un gradient de séparation : le tampon A (Wave® Optimized Buffer A ; 0,1 M de TEAA, pH 7) et le tampon B (Wave® Optimized Buffer B ; 0,1 M de TEAA- 25% acétonitrile, pH 7). Le tampon D (Wave® Optimized Buffer D; 25% d'eau, 75% d'acétonitrile) a permis de laver la colonne. Les produits PCR séparés ont ensuite été détectés au niveau du détecteur de fluorescence HSX-3500 en présence d'un agent intercalant (Wave Optimized® HS Staining Solution I).

Les résultats ont été analysés avec le logiciel Navigator® Software (Transgenomic®). Le paramétrage de la dHPLC s'est fait suivant la méthode de Goldenberg ²⁴.

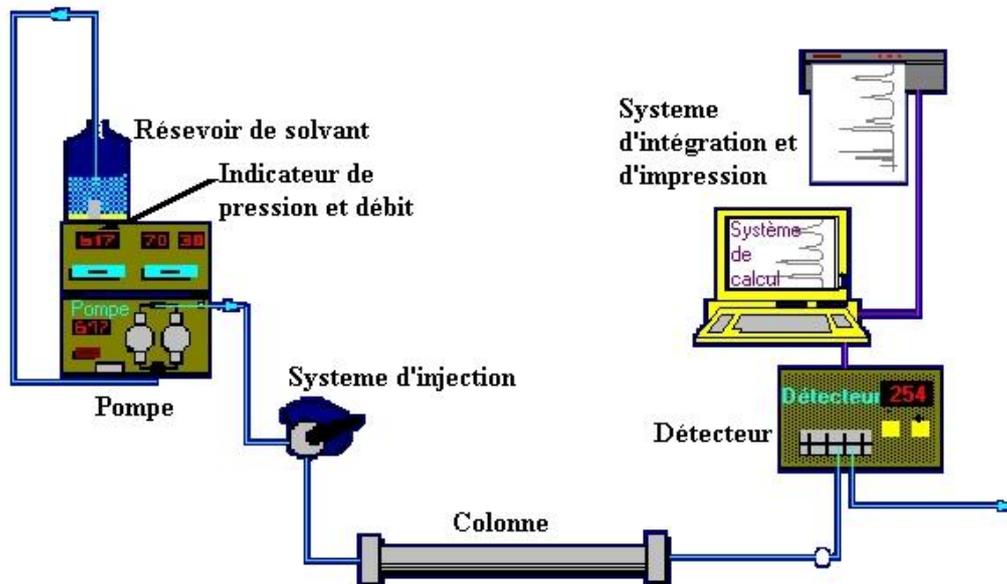


Figure 19. Représentation de la dHPLC, Wave® Microbial Analysis System (Transgenomic®)

109

La chaîne de dHPLC est constituée (**Figure 19**) ¹⁰⁹⁻¹¹¹ :

- des solvants
- d'une pompe : elle délivre un débit stable et non pulsé
- d'un injecteur : il permet d'injecter avec précision toujours le même volume de liquide dans

la chaîne de dHPLC.

- d'une colonne

- d'un détecteur de fluorescence pour détecter les amplicons

Cette technique est réalisée en colonne. Elle contient une phase mobile composée de 2 tampons (tampon A et le tampon B) ainsi qu'une phase stationnaire électriquement neutre et hydrophobe composée de particules alkylées non poreuses (styrène/divinylbenzène). La phase mobile joue le rôle de gradient de séparation. Le TEAA est amphiphile. Il s'adsorbe à la surface de la phase stationnaire, présentant une charge positive qui attire et fixe l'ADN chargé négativement: Les ions ammonium chargés positivement interagissent avec l'ADN et les chaînes alkyl de la surface hydrophobe de la phase solide (**Figure 20**)¹⁰⁹⁻¹¹².

La dénaturation provoquée à la fois par la chaleur et par le gradient permet la séparation des amplicons d'ARNr 16S. La séparation optimale des produits de PCR par DNASep® HT (Transgenomic®) est réalisée à une température de 62,2 °C et un gradient dont le débit est fixé à 0,9 mL par minute.

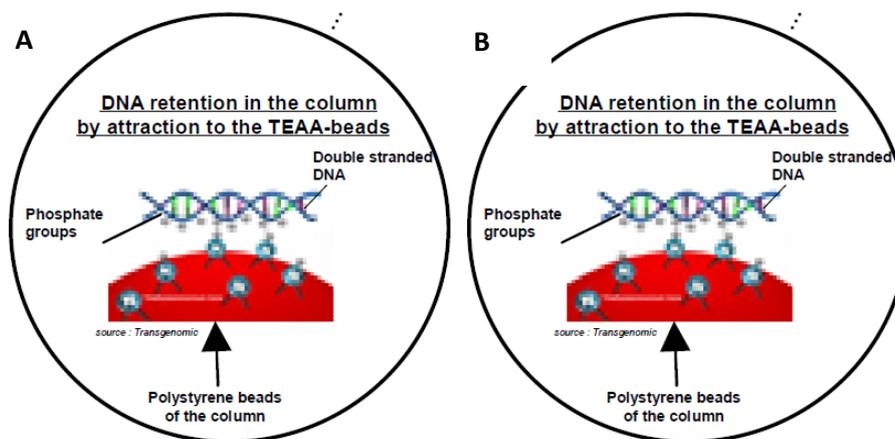


Figure 20. Schéma du principe de la dHPLC avec la phase mobile (gradient) et la phase stationnaire. A : rétention de l'ADN sur la colonne. B : élution de l'ADN par le gradient¹¹²

L'augmentation du gradient diminue l'affinité du TEEA et de l'ADN. Les produits de PCR alors séparés migrent et sont détectés par un détecteur de fluorescence (HSX-3500) (**Figure 20**).

La dHPLC produit un chromatogramme, ou profil, qui représente, sous forme de pics, les intensités de signal détectées par le détecteur de fluorescence. Chaque pic correspond à un produit de PCR séparé en fonction d'un temps d'éluion. Chaque partie amplifiée du gène est éluee à un temps donné en fonction de sa séquence (**Figure 21**).

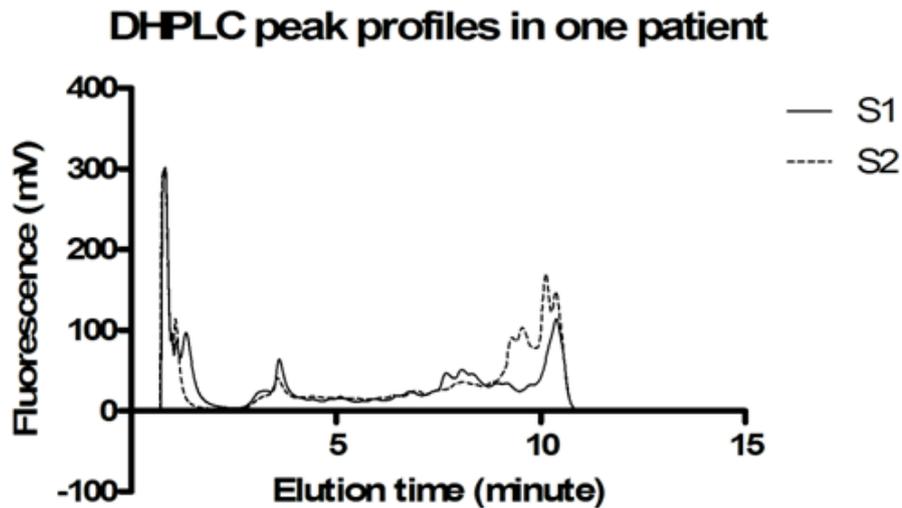


Figure 21. Présentation des résultats de la dHPLC : un chromatogramme, ou profil, qui représente, sous forme de pics, les intensités de signal détectées par le détecteur de fluorescence et correspondant aux différents produits de PCR séparés en fonction du temps d'éluion. L'intensité des pics donne une information sur l'abondance relative des parties amplifiées du gène. S1 : prélèvement collecté avant chimiothérapie. S2 : prélèvement collecté après chimiothérapie.

4.6. Le séquençage des pics obtenus

La dernière étape a été le séquençage des pics afin de connaître les séquences des produits de PCR séparés par la dHPLC. Les pics ont été collectés via le collecteur de fraction FCX200 au cours d'un passage en dHPLC. Les pics jugés d'intérêt par l'analyse statistique ont ensuite été ré-amplifiés : 5 μ L du pic collecté ont été ajoutés aux 20 μ L de mélange réactionnel. Les conditions d'amplification ont été celles décrites précédemment pour la PCR primaire. L'amplification a ensuite été contrôlée par

électrophorèse en gel d'agarose 1,5% : 5 μ L de produit PCR ont été déposés avec 1,2 μ L de bleu de dépôt. La migration s'est effectuée dans un tampon TBE 1X (Tris Borate EDTA : 0,1 M de Tris, 0,9 M d'acide borique, 0,05 M d'EDTA à pH = 8,4). Après 30 minutes de migration à 100 volts, la lecture s'est faite sur une table UV. Pour l'ensemble des pics, une amplification a été observée (**Figure 22**).

Le séquençage a été effectué à la plateforme de séquençage-génotypage de l'IFR26. Les séquences obtenues ont ensuite été introduites et analysées dans la base de données RDPII afin de les comparer aux séquences répertoriées et pouvoir les identifier^{113,114}.

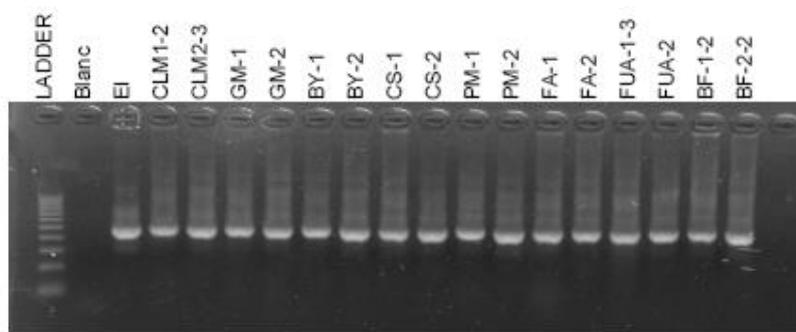


Figure 22. Gel de contrôle des produits d'amplification.

5. Le pyroséquençage

5.1. Présentation générale de la technique

Le pyroséquençage permet de caractériser, en temps réel, la synthèse d'un ADN simple brin^{36,37,115,116}. Cette technique est basée sur plusieurs étapes successives^{36,37,115,116}.

D'abord, sur les amplicons obtenus lors de l'extraction par PCR sont fixés, par ligation, des adaptateurs. Ensuite, des microbilles, présentant à leur surface des amorces complémentaires à un adaptateur, s'hybrident avec une molécule d'ADN simple brin. Elles sont alors mises en émulsion, en présence des réactifs de PCR et une amplification clonale du fragment d'ADN lié à la microbille va se réaliser. Puis les microbilles sont transférées sur une plaque contenant 1,6 millions de puits. Le diamètre de chaque puit ne permet le dépôt que d'une seule microbille par puit. La plaque est alors

placée dans une chambre créant un flux de réactifs (ADN polymérase, ATP sulfurylase, luciférase et apyrase) au-dessus des puits où la réaction de pyroséquençage a lieu (**Figure 23**)^{115,116}:

- 1) Un dNTP est ajouté dans le mélange (les dNTP sont ajoutés les uns après les autres et non pas ajoutés tous ensemble comme dans une réaction de séquençage Sanger). Si le dNTP ajouté dans le milieu réactionnel est complémentaire à la base de l'ADN, il est incorporé par l'ADN polymérase à la nouvelle séquence en cours de synthèse. Son incorporation libère un pyrophosphate inorganique (PPi).
- 2) Une ATP sulfurylase vient alors transformer le PPi en ATP. Les PPi libérés sont proportionnels au nombre de dNTP incorporés.
- 3) L'ATP couplé à une luciférine est alors utilisé par une luciférase pour produire de l'oxyluciférine. L'oxyluciférine émet un signal lumineux.
- 4) Le signal lumineux est capté par le scanner du séquenceur (caméra CDD). Chaque pic correspond à l'insertion d'un nucléotide et l'intensité du pic est proportionnelle au nombre de bases identiques incorporées.
- 5) Ces étapes se répètent jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'ADN. La séquence peut alors être déduite à partir de l'intensité de chaque pic, représentée sous la forme d'un pyrogramme. Une séquence obtenue par pyroséquençage est appelée « un read ».
- 6) Les surplus en dNTP, c'est-à-dire ceux qui n'ont pas été incorporés, sont dégradés par une apyrase.

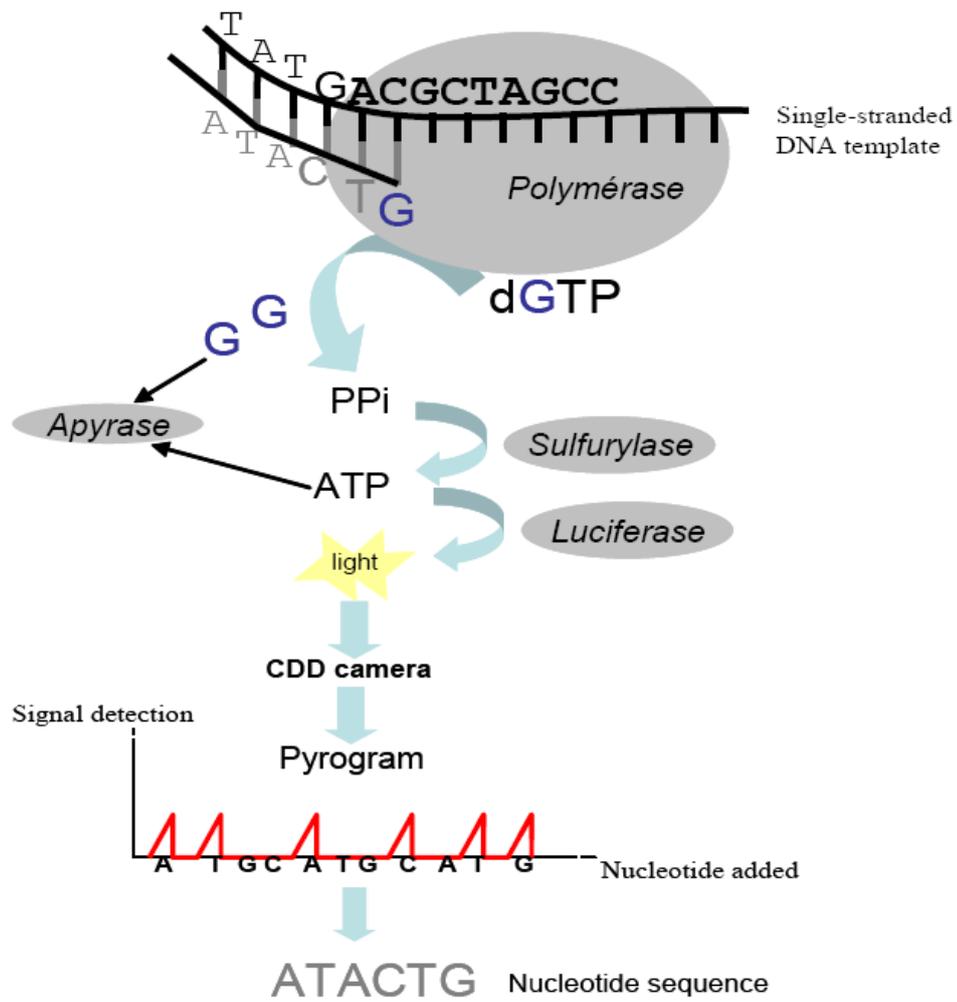


Figure 23 : Principe du pyroséquençage ¹¹⁵

5.2. PCR primaire

Son but était l'amplification de la partie hypervariable V5-V6 du gène codant pour l'ARNr 16S. Nous avons utilisé 2 amorces : 784F et 1061R ¹¹⁶ (Tableau V).

Amorce	Séquence 5' 3'
784F	AGGATTAGATACCC TGGTA C
1061R	CRRCACGAGCTGACGAC

Tableau V. Amorces utilisées pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S lors du pyroséquençage, régions hypervariables V5 et V6.

L'amorce Forward contenait la séquence de l'adaptateur Titanium A (5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3') et une séquence code-barres. L'amorce Reverse contenait la séquence de l'adaptateur Titanium B (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG-3'). Pour chaque échantillon, un mix de PCR de 100 µL a été préparé contenant le tampon PCR, 2 Unités de KAPA HiFi Hotstart polymerase blend, dNTPs (KAPA biosystems®), 300 nM primer (Eurogentec®), et 60 ng d'ADN. Le cycle thermique consistait en une phase de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, puis 25 cycles de dénaturation à 98°C pendant 20 secondes, puis une extension à 56°C pendant 40 secondes, puis une extension à 72°C pendant 20 secondes, et une extension finale à 72°C pendant 5 minutes.

L'amplification a ensuite été contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose 1,5%. 5 µL de produit PCR ont été déposés avec 1,2 µL de bleu de dépôt. La migration s'est effectuée dans un tampon TEA 1X sous un champ électrique de 100 volts et la lecture s'est faite sur table UV. Aucune inhibition n'a été mise en évidence. Les amplicons ont été purifiés en utilisant le gel Wizard® SV et le système PCR Clean-up (Promega®) suivant les instructions du fournisseur.

5.3. Quantification des amplicons, assemblage et pyroséquençage

La concentration des amplicons d'ADN a été déterminée en utilisant le Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen®) sur un ABI Prism 7900HT (Invitrogen®) suivant les instructions du fournisseur. 10 µL de produits de PCR purifiés ont été mis en réaction pour un volume total de 200 µL

dans 96 micropipettes. La fluorescence a été mesurée avec le lecteur Perkin-Elmer Victor Plate utilisant le filtre d'excitation/émission de 485/530 nm couplé à un temps de mesure de 0,1 seconde. Suite à la quantification, les amplicons purifiés ont été combinés en ratio équimolaires dans un seul tube. Le pool final d'ADN a été précipité sur glace pendant 45 minutes en y associant 5 M de NaCl (pour une concentration finale de 0.2 M) et 2 volumes d'éthanol (100% glacé). L'ADN précipité était ensuite centrifugé à 7800 rpm pendant 40 minutes à 4°C, et la solution obtenue était alors lavée avec un mélange équivalent d'éthanol (70% glacé) et encore centrifugé à 7800 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant était récupéré et la solution laissée à température ambiante pendant 10 minutes et était suspendu dans 100 µL de nuclease-free water (Ambion®). La concentration finale de l'ADN était déterminée par spectrophotomètre nanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc®). Le pyroséquençage a pu être réalisé en utilisant le primer A dans le 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX (454 Life Sciences-Roche®).

6. Analyses statistiques

6.1. Tests statistiques usuels

Les données quantitatives ont été exprimées en moyenne et écart-type (SD) et ont été comparées à l'aide du test *t* de Student. Lorsque les conditions n'étaient pas remplies pour faire ce test, les données ont été exprimées en médiane et interquartiles et comparées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. Les données qualitatives ont été exprimées en pourcentage et intervalle de confiance à 95% et comparées à l'aide du test des rangs de Wilcoxon. Une valeur de *p* inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative. L'analyse statistique a été faite à l'aide du logiciel Matlab® R2010b, Mathworks®, Inc et du logiciel GraphPad Prism 5.01®.

6.2. Analyses des données de la dHPLC

6.2.1. Analyse en composantes principales

Une analyse en composantes principales a été effectuée sur les échantillons de selles prélevés avant et après la chimiothérapie. L'analyse en composantes principales est une technique qui permet de faire la synthèse de l'information contenue dans un grand nombre de variables de façon non supervisée et simultanée ¹¹⁷. Les composantes principales sont de nouvelles variables, indépendantes, combinaisons linéaires des variables initiales, construites pour expliquer le maximum de la variance des variables étudiées. Dans notre étude, où nous avons un grand nombre de variables, on souhaite avoir une vue d'ensemble et répondre à la question : « Y a-t-il un ou plusieurs sous-groupes de patients ? ». Dans une telle situation, l'analyse en composantes principales est une technique de choix, car elle permet, à partir de la représentation graphique de 2 composantes principales, de résumer l'essentiel de l'information contenue dans l'ensemble des variables analysées. Ainsi, l'ensemble des variables initiales est synthétisé en un point qui caractérise la structure du patient. De plus, à l'aide du cercle de corrélation, on peut représenter graphiquement les variables initiales afin d'éclaircir leurs interrelations. Pour l'analyse des profils de dHPLC, l'analyse en composantes principales a été réalisée sur les profils entre 4 et 11 min. La zone située entre la 4ème et la 11ème minute correspond à la zone dite d'intérêt représentant les pics correspondant aux produits d'amplification. Elle fait suite à la zone d'injection, correspondant au début du gradient d'élution et au passage des produits non retenus par la colonne. Elle est suivie par une zone de lavage et une zone d'équilibration.

6.2.2. Analyse en cluster

Une analyse en cluster a aussi été réalisée pour l'interprétation des données issues de la dHPLC suivant une classification hiérarchique ascendante. Cette analyse en cluster, si elle permet de dégager des groupes homogènes, ne permet pas de dire quelles variables initiales sont à l'origine ces regroupements, à la différence de l'analyse en composantes principales. Dans notre analyse, les

distances ont été calculées selon la méthode euclidienne et les regroupements effectués selon la méthode Ward.

6.3. Analyse des séquences obtenues par pyroséquençage

6.3.1 Analyse de la diversité et analyse taxonomique

L'analyse des séquences obtenues par pyroséquençage a été faite grâce au logiciel en accès libre QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) version 1.7.0.¹¹⁸ Il permet de réaliser, à l'aide de scripts, une analyse de la diversité (alpha et bêta-diversité) et une analyse taxonomique. Les séquences a été analysées suivant les paramètres par défaut de QIIME, incluant l'identification et l'exclusion des chimères.

Les séquences ont été assignées à OTU au seuil de 97% en les comparant à une banque de données contenant des séquences non redondantes (UCLUSTref)^{119,120}.

Etant donné qu'il y avait un nombre très variable de séquences par échantillon (de 3033 à 24636 séquences), les données ont été raréfiées à 3030 séquences par échantillon pour réaliser les analyses de diversité. Les échantillons ont aussi été analysés avec les différents outils disponibles pour les analyses taxonomiques (LEfSe, MaAsLin)^{44,45,121}.

6.3.2. Prédiction de la métagénomique fonctionnelle

Nous avons utilisé PICRUSt qui permet de prédire la métagénomique fonctionnelle à partir d'une analyse du gène codant pour l'ARNr 16S¹²². Cet algorithme estime le potentiel fonctionnel des communautés bactériennes à partir de l'étude d'un gène marqueur (ici l'ARNr 16S) et une base de données de références des génomes séquencés courants (Greengenes 13_5 database) avec une précision de 80% à 90% sur les communautés bactériennes de l'intestin humain¹¹⁹.

RESULTATS

1. Caractéristiques cliniques des patients

Nous avons inclus 40 patients dans notre étude. Finalement, les données de 36 patients ont été analysées, après avoir écarté les 4 patients qui ont développés une colite à *Clostridium difficile*. Les caractéristiques cliniques des patients sont listées dans le **Tableau VI**. Le sexe ratio homme/femme est égal à 2 et l'âge médian des patients est de 55 ans [45-62]. La majorité des patients a reçu une antibioprophylaxie avant l'hospitalisation dans le service d'hématologie.

Douze (33% [20-50]) patients ont développé une diarrhée post-chimiothérapie sévère, dans un délai médian de 13 jours [11-14].

Caractéristiques des patients	n
Sexe masculin	24 (67% [50-80])
Age	55 [45-62]
Index de masse corporel	24 [23-27]
Antibioprophylaxie reçue avant l'hospitalisation	32 (89% [74-96])
phénoxyméthylpénicilline	36% [22-52]
sulfaméthoxazole, triméthoprime	19% [9-35]
phénoxyméthylpénicilline + sulfaméthoxazole, triméthoprime	33% [20-50]
Diarrhée post-chimiothérapie sévère	12 (33% [20-50])
Délai de survenue de la diarrhée, par rapport à J0	13 [11-14]

Tableau VI. Caractéristiques cliniques des 36 patients ayant un lymphome non-hodgkinien et recevant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques dont les données ont été analysés dans le cadre de l'étude. Médiane [25% Percentile-75% Percentile], n (% [intervalle de confiance à 95%]).

2. Collection des échantillons de selles

Au total, 59 échantillons de selles ont été collectés durant la période de l'étude. Le 1^{er} échantillon de selles (S1) a pu être collecté chez tous les patients mais le 2^{ème} échantillon de selles (S2) n'a pu être obtenu que chez 23 patients.

Ainsi, nous avons collecté :

- 36 échantillons fécaux **S1**.
- 15 échantillons fécaux S2 chez les patients n'ayant pas développé de diarrhée post-chimiothérapie sévère. Ces échantillons sont appelés **S2_nosCID**
- 8 échantillons fécaux S2 chez les patients ayant développé une diarrhée post-chimiothérapie sévère. Ces échantillons sont appelés **S2_sCID**.

3. Modifications du microbiote intestinal suite à la chimiothérapie : analyse par la dHPLC.

3.1. Généralités

Cette analyse en dHPLC s'est effectuée uniquement chez les 8 premiers patients ayant un échantillon de selles collecté avant et après la chimiothérapie, c'est-à-dire ayant un prélèvement S1 et un prélèvement S2. Le **Tableau VII** rapporte les caractéristiques cliniques des 8 patients dont les échantillons fécaux ont été analysés par dHPLC.

Patient	Age (ans)	Sexe	Antibioprophylaxie
1	65	Femme	phénoxyméthylpénicilline + sulfaméthoxazole, triméthoprim
2	48	Femme	phénoxyméthylpénicilline
3	45	Homme	phénoxyméthylpénicilline + sulfaméthoxazole, triméthoprim
4	40	Homme	phénoxyméthylpénicilline + sulfaméthoxazole, triméthoprim
5	56	Femme	sulfaméthoxazole, triméthoprim
6	36	Homme	Pas d'antibioprophylaxie
7	35	Homme	phénoxyméthylpénicilline + sulfaméthoxazole, triméthoprim
8	49	Homme	phénoxyméthylpénicilline

Tableau VII. Caractéristiques des 8 patients pour qui les échantillons fécaux ont été analysés par dHPLC.

3.2. Analyse en composantes principales

3.2.1. Représentation de l'analyse en composantes principales

Nous avons débuté par une première analyse en composantes principales incluant les échantillons fécaux collectés avant et après la chimiothérapie. La meilleure distinction entre les échantillons collectés avant et après la chimiothérapie était obtenue en combinant les composantes principales 1 et 4, qui représentaient respectivement 46,1 % et 8 % de la variance totale. Ces 2 composantes principales séparaient bien les échantillons de selles avant et après chimiothérapie avec 2 nuages de points distincts (**Figure 24**).

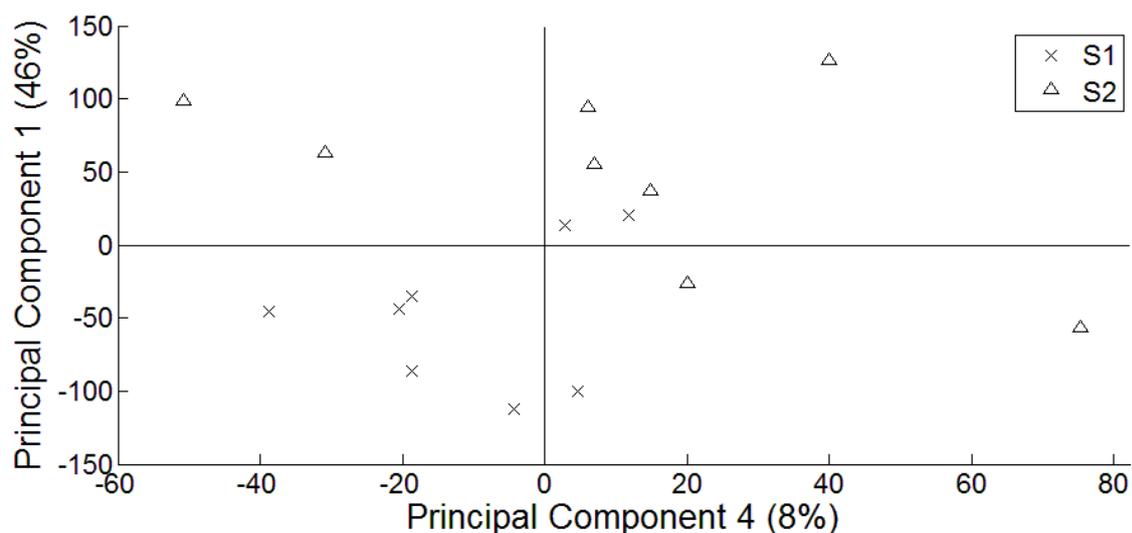


Figure 24. Score plot de l'analyse en composantes principales avec les composantes principales 1 et 4 (53,8% de la variance totale). Chaque point représente un prélèvement de selles. On peut séparer 2 nuages de points, l'un correspondant aux prélèvements avant la chimiothérapie et l'autre correspondant aux prélèvements après la chimiothérapie. S1 : prélèvement avant la chimiothérapie ; S2 : prélèvement après la chimiothérapie.

3.2.2. Les pics associés aux prélèvements avant et après chimiothérapie

Le cercle de corrélation montre que les temps d'élution suivants : 9,21 ; 9,45 ; 9,71 et 10,16 minutes sont les plus liés au prélèvement après chimiothérapie (**Figure 25**). Les pics correspondant à ces temps d'élution sont augmentés au cours de la chimiothérapie, de façon significative pour le temps 10,16 minutes ($p=0,002$) (**Figure 26**).

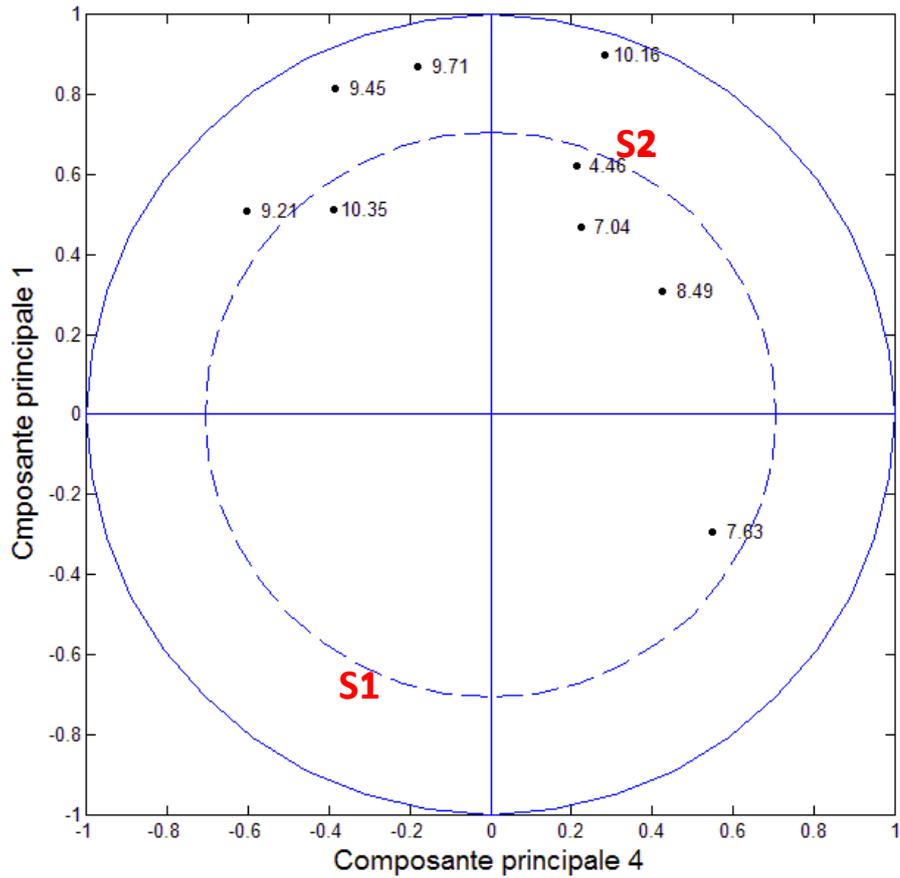


Figure 25. Cercle de corrélation de l'analyse en composantes principales avec les composantes principales 1 et 4 (53,8% de la variance totale). Il permet de visualiser la relation entre les variables initiales (c'est à dire les temps d'élution) et le critère « prélèvement avant chimiothérapie-prélèvement après chimiothérapique », codé respectivement S1 et S2. On voit ici que les temps d'élution 9,21 ; 9,45 ; 9,71 ; 10,16 minutes sont les plus liés au prélèvement après la chimiothérapie.

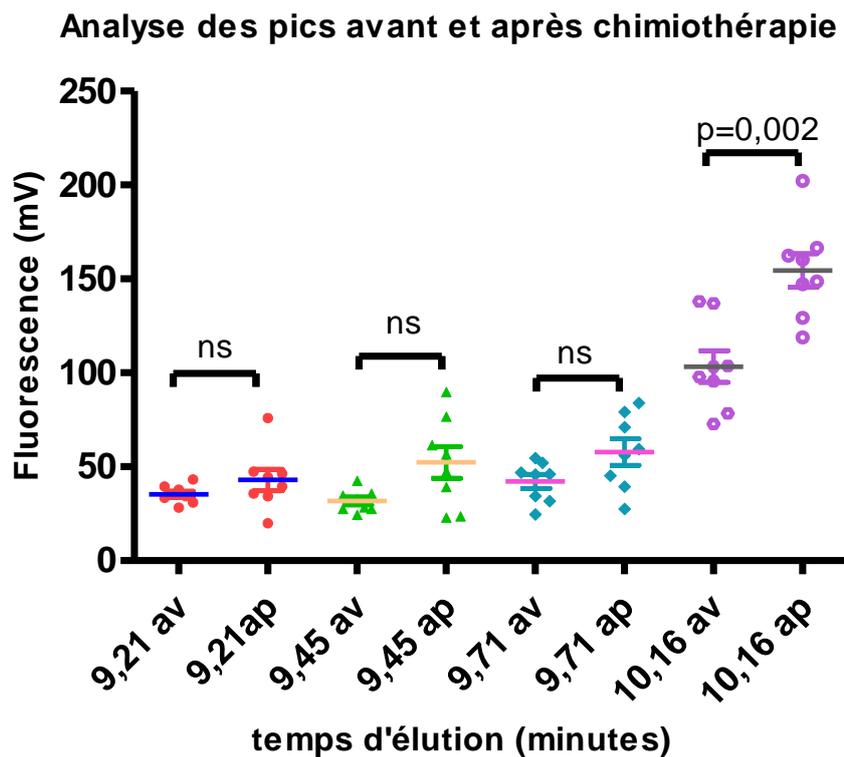


Figure 26. Comparaison des intensités des pics des prélèvements de selles avant et après la chimiothérapie. Les médianes ont été comparées à l'aide du test de Mann-Whitney. av : prélèvement avant chimiothérapie (S1) ; ap : prélèvement après chimiothérapie (S2).

Les pics d'intérêt, c'est à dire les pics mis en évidence au cours de l'analyse en composantes principales, ont été séquencés. Ainsi, pour caractériser les différences du microbiote intestinal survenant au cours de la chimiothérapie, nous avons séquencés 4 pics correspondant aux temps d'élution suivants : 9,21 ; 9,45 ; 9,71 ; 10,16 minutes.

Le séquençage du pic présent au temps d'élution 10,16 minutes, présentant une augmentation statistiquement significative au cours de la chimiothérapie, était associé au phylum Proteobacteria (Classe Gamma Proteobacteria) ^{113,114}. Les autres pics, dont la différence n'était pas significative, étaient associés à la Classe Gamma Proteobacteria (9,21 et 9,71 minutes) et Clostridia (9,45 minutes).

Cependant, le pourcentage de similarité des séquences par rapport à la base de données RDPII n'est que de 86% au niveau de la Classe et ne permet pas d'atteindre la famille ni le genre avec un pourcentage de similarité suffisant ^{113,114}.

3.3. Classification hiérarchique ascendante

Nous avons aussi réalisé une analyse en cluster suivant une classification hiérarchique ascendante (**Figure 27**). Le dendrogramme montre 2 clusters principaux :

- un cluster contenant 5 échantillons post-chimiothérapie
- un cluster contenant tous les échantillons préchimiothérapie et 3 échantillon post-chimiothérapie

Cette analyse en cluster permet, elle aussi, une distinction assez claire entre les échantillons de selles collectés avant et après la chimiothérapie.

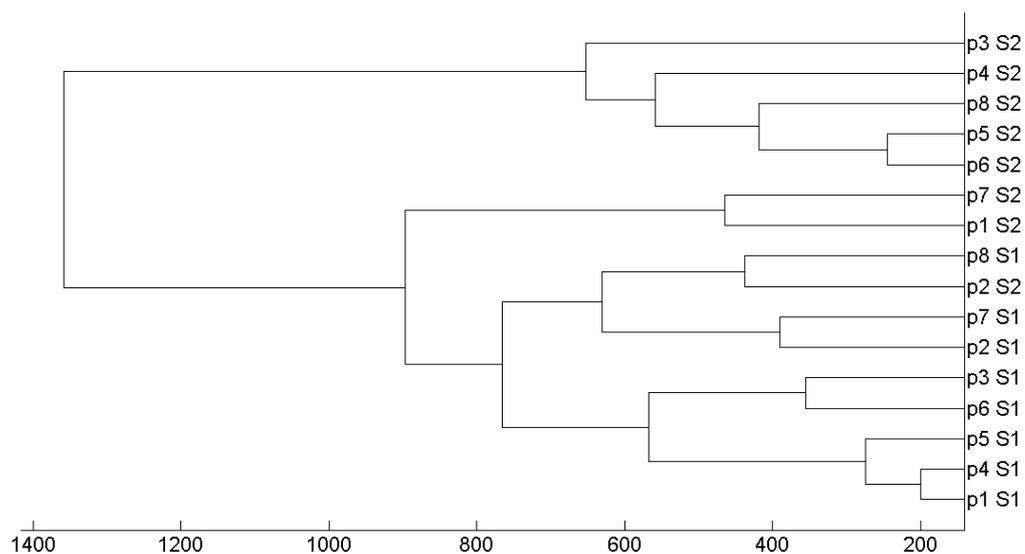


Figure 27. Analyse en clusters, résultat du dendrogramme des prélèvements de selles avant et après chimiothérapie des 8 patients. On identifie 2 clusters séparant les patients suivant le critère « prélèvement collecté avant la chimiothérapie (S1)/prélèvement collecté après la chimiothérapique (S2) ».

3.4. Conclusions de l'analyse par dHPLC

L'analyse par dHPLC des échantillons de selles de 8 patients a permis une séparation assez satisfaisante des échantillons suivant le critère « prélèvement collecté avant la chimiothérapie/prélèvement collecté après chimiothérapie ». Cependant, l'information taxonomique apportée par la dHPLC s'est révélée décevante, car le séquençage des pics d'intérêt n'a permis de fournir qu'une analyse à l'échelon de la classe, ce qui est relativement peu informatif.

Etant donné les limites de la dHPLC, qui ne s'intéresse qu'aux groupes bactériens dominants et dont l'analyse des pics obtenus n'apporte finalement que peu d'informations taxonomiques, nous avons poursuivi l'analyse de la cohorte totale de patients avec la technique de pyroséquençage.

4. Modifications du microbiote intestinal suite à la chimiothérapie : analyse par pyrosequencing

4.1. Détail des séquences obtenues

Au total, parmi les 59 échantillons collectés, en utilisant le pipeline QIIME, un total de 590883 séquences de haute qualité codant pour l'ARNr 16S ont été identifiées, représentant 9867 OTUs. Le nombre médian de séquences par échantillon était de 9441 [7379-12514]. Le plus petit nombre de séquences contenues dans un échantillon était 3033. Ainsi, pour les analyses de la diversité, nous avons effectué une raréfaction à 3030 séquences. Le Tableau **VIII** représente pour chaque échantillon fécal collecté, le nombre de séquences obtenus lors du pyroséquençage et son assignation à un groupe de patients.

Patient	Collection de l'échantillon de selles	Nombre de séquences	Groupe de l'échantillon
Patient 1	avant chimiothérapie	9215	S1
	après chimiothérapie	7956	S2_nosCID
Patient 2	avant chimiothérapie	12944	S1
	après chimiothérapie	10637	S2_sCID
Patient 3	avant chimiothérapie	6573	S1
Patient 4	avant chimiothérapie	3033	S1
Patient 5	avant chimiothérapie	13191	S1
Patient 6	avant chimiothérapie	12072	S1
	après chimiothérapie	13195	S2_sCID
Patient 7	avant chimiothérapie	8281	S1
Patient 8	avant chimiothérapie	11844	S1
	après chimiothérapie	13984	S2_nosCID
Patient 9	avant chimiothérapie	7478	S1
Patient 10	avant chimiothérapie	8724	S1
	après chimiothérapie	7379	S2_sCID
Patient 11	avant chimiothérapie	10358	S1
Patient 12	avant chimiothérapie	5399	S1
	après chimiothérapie	8452	S2_nosCID
Patient 13	avant chimiothérapie	7139	S1
	après chimiothérapie	12013	S2_nosCID
Patient 14	avant chimiothérapie	8318	S1
Patient 15	avant chimiothérapie	8359	S1
	après chimiothérapie	12516	S2_nosCID
Patient 16	avant chimiothérapie	12078	S1
	après chimiothérapie	12997	S2_sCID
Patient 17	avant chimiothérapie	8823	S1
	après chimiothérapie	11946	S2_nosCID
Patient 18	avant chimiothérapie	8697	S1
	après chimiothérapie	9309	S2_nosCID

Patient 19	avant chimiothérapie	9220	S1
	après chimiothérapie	12005	S2_nosCID
Patient 20	avant chimiothérapie	13072	S1
	après chimiothérapie	3423	S2_nosCID
Patient 21	avant chimiothérapie	7978	S1
	après chimiothérapie	3939	S2_nosCID
Patient 22	avant chimiothérapie	10458	S1
	après chimiothérapie	4522	S2_nosCID
Patient 23	avant chimiothérapie	10702	S1
	après chimiothérapie	6745	S2_nosCID
Patient 24	avant chimiothérapie	24636	S1
Patient 25	avant chimiothérapie	12514	S1
	après chimiothérapie	12900	S2_sCID
Patient 26	avant chimiothérapie	10884	S1
Patient 27	avant chimiothérapie	10934	S1
Patient 28	avant chimiothérapie	7178	S1
	après chimiothérapie	6186	S2_nosCID
Patient 29	avant chimiothérapie	6284	S1
Patient 30	avant chimiothérapie	12579	S1
	après chimiothérapie	13224	S2_sCID
Patient 31	avant chimiothérapie	8524	S1
Patient 32	avant chimiothérapie	9441	S1
	après chimiothérapie	5385	S2_nosCID
Patient 33	avant chimiothérapie	11629	S1
	après chimiothérapie	5766	S2_sCID
Patient 34	avant chimiothérapie	11605	S1
	après chimiothérapie	4910	S2_nosCID
Patient 35	avant chimiothérapie	13299	S1
	après chimiothérapie	18672	S2_sCID
Patient 36	avant chimiothérapie	19359	S1

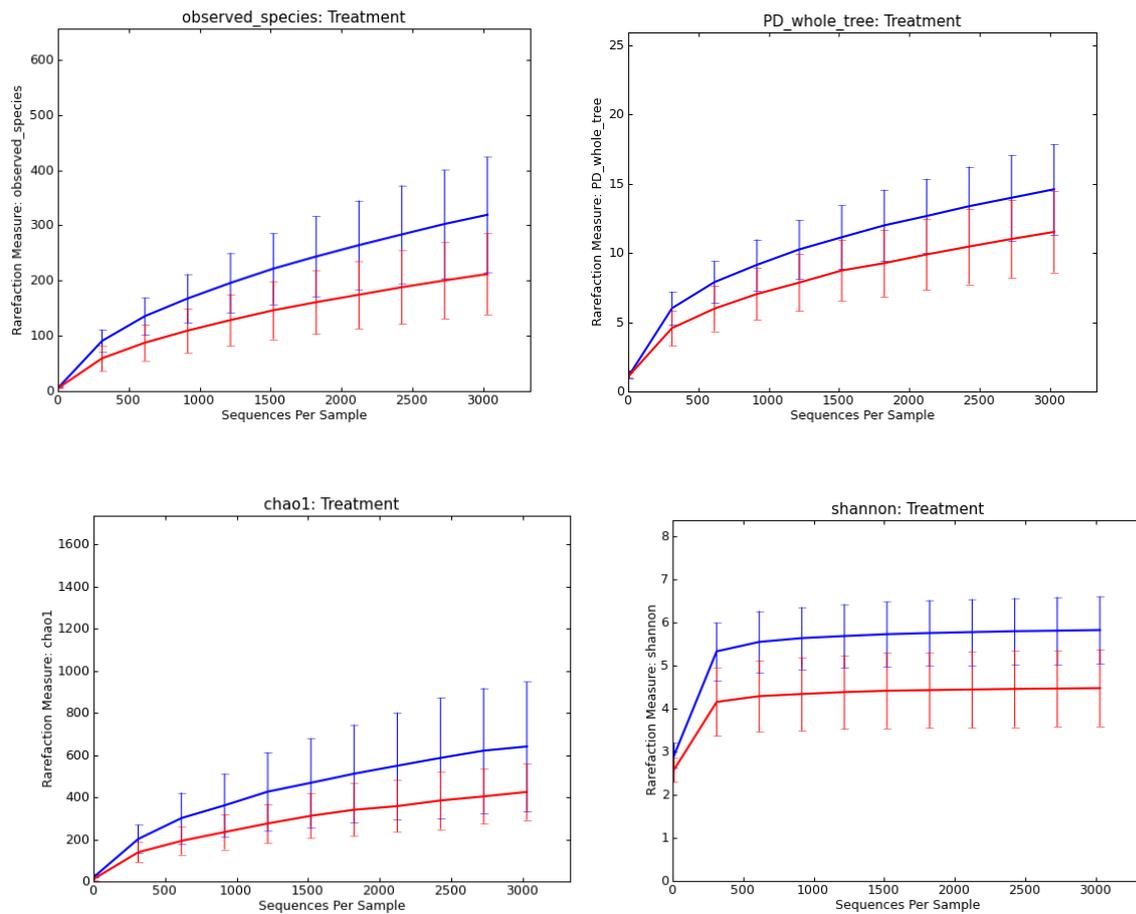
Tableau VIII. Séquences obtenues par l'analyse d'échantillons fécaux des différents patients inclus dans l'étude. S1: échantillon collecté avant chimiothérapie, S2_sCID: échantillon collecté après chimiothérapie chez les patients ayant développé une diarrhée post-chimiothérapie sévère, S2_nosCID: échantillon collecté après chimiothérapie chez les patients n'ayant pas développé une diarrhée post-chimiothérapie sévère.

4.2. Comparaison de la diversité avant et après chimiothérapie

4.2.1. Alpha-diversité

Nos résultats montrent qu'il y a une diminution drastique de l'alpha-diversité au cours de la chimiothérapie, lorsque que l'on analyse les différents paramètres permettant de décrire l'alpha-diversité, que ce soit avec des mesures phylogénétiques (arbre phylogénétique complet) ou non phylogénétiques (nombre d'espèces observées, index Chao1, index de Shannon) (**Figure 28**). Lorsque l'on compare les échantillons collectés avant et après la chimiothérapie, la différence est statistiquement significative (**Tableau IX**).

Cette analyse montre, pour la première fois, qu'il y a une perte de la biodiversité au cours de la chimiothérapie.



— Echantillons fécaux collectés avant la chimiothérapie (S1)

— Echantillons fécaux collectés après la chimiothérapie (S2)

Figure 28. Représentation graphique des différents paramètres évaluant l'alpha-diversité des échantillons fécaux collectés avant et après la chimiothérapie: le nombre d'espèces observées, l'arbre phylogénétique total, l'index Chao1, l'index de Shannon.

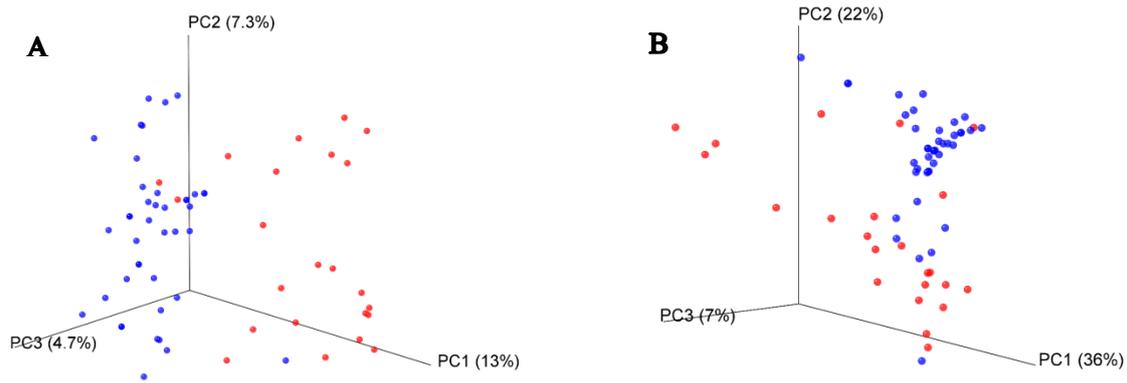
	Espèces observées	Index Chao1	Index de Shannon	Arbre phylogénétique complet
Prélèvements collectés avant chimiothérapie	327,7±108,1	666,1±308,6	5,8±0,8	14,9±3,3
Prélèvements collectés après chimiothérapie	212,3±74,3	425,1±147,6	4,5±0,9	11,5±3,0
p	0,001	0,002	0,001	0,001

Tableau IX. Evaluation des différences observées avec les paramètres évaluant l'alpha-diversité par test de Student avec permutations Monte-Carlo entre les échantillons fécaux collectés avant et après la chimiothérapie (moyenne±écart-type)

4.2.2. Beta-diversité

Les résultats de l'analyse en coordonnées principales basée sur la distance métrique UniFrac (Unweighted et Weighted) mettent en évidence une séparation en 2 nuages de points distincts entre les échantillons collectés avant la chimiothérapie et les échantillons collectés après la chimiothérapie (**Figure 29**).

De plus, la méthode ADONIS montre que cette séparation entre les échantillons fécaux collectés avant la chimiothérapie et les échantillons collectés après la chimiothérapie est statistiquement significative, que ce soient pour la distance métrique UniFrac Unweighted ($R = 0,59$; $p = 0,001$) et UniFrac Weighted ($R = 0,49$; $p = 0,001$).



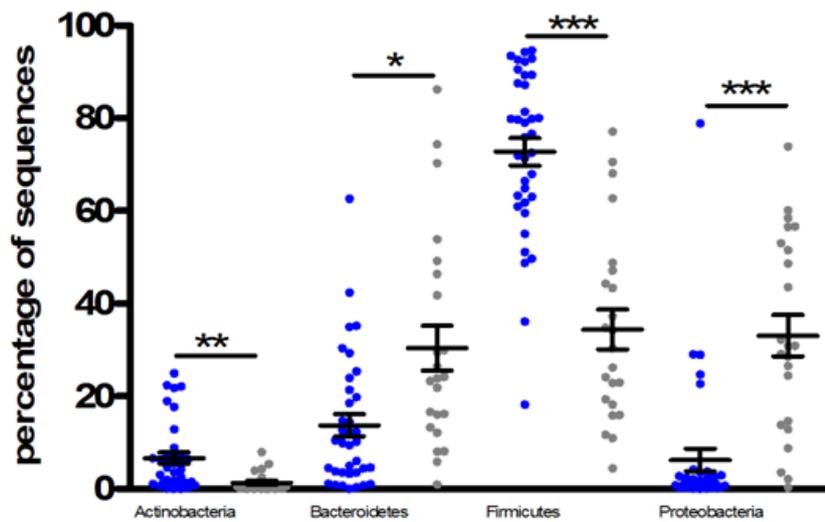
- Echantillon fécal collecté avant la chimiothérapie (S1)
- Echantillon fécal collecté après la chimiothérapie (S2)

Figure 29. Représentation graphique de l'analyse de la bêta-diversité par ordination basée sur la distance métrique UniFrac Unweighted (A) et UniFrac Weighted (B).

4.3. Différences taxonomiques entre les échantillons collectés avant et après la chimiothérapie

Afin de voir quels sont les taxa affectés au cours de la chimiothérapie, nous avons réalisé une analyse discriminante linéaire avec le module LEfSE^{44,121}. Cette analyse montre que les phyla Firmicutes et Actinobacteria sont fortement associés aux échantillons collectés avant la chimiothérapie et que les phyla Proteobacteria et Bacteroidetes sont fortement associés aux échantillons collectés après la chimiothérapie (**Figure 30, Figure 31**).

A l'échelon du genre, les genres *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Dorea* et *Oscillospira* sont fortement associés aux prélèvements collectés avant la chimiothérapie. Les genres *Escherichia*, *Parabacteroides* et *Enterococcus* sont eux fortement associés aux échantillons collectés après la chimiothérapie (**Figure 31, Figure 32**).



● Echantillons fécaux collectés avant la chimiothérapie (S1)

● Echantillons fécaux collectés après la chimiothérapie (S2)

Figure 30. Modifications du microbiote fécal au cours de la chimiothérapie à l'échelon du phylum. * p : 0,05-0,005 ; ** p= 0,005-0,001 ; * p<0,001**

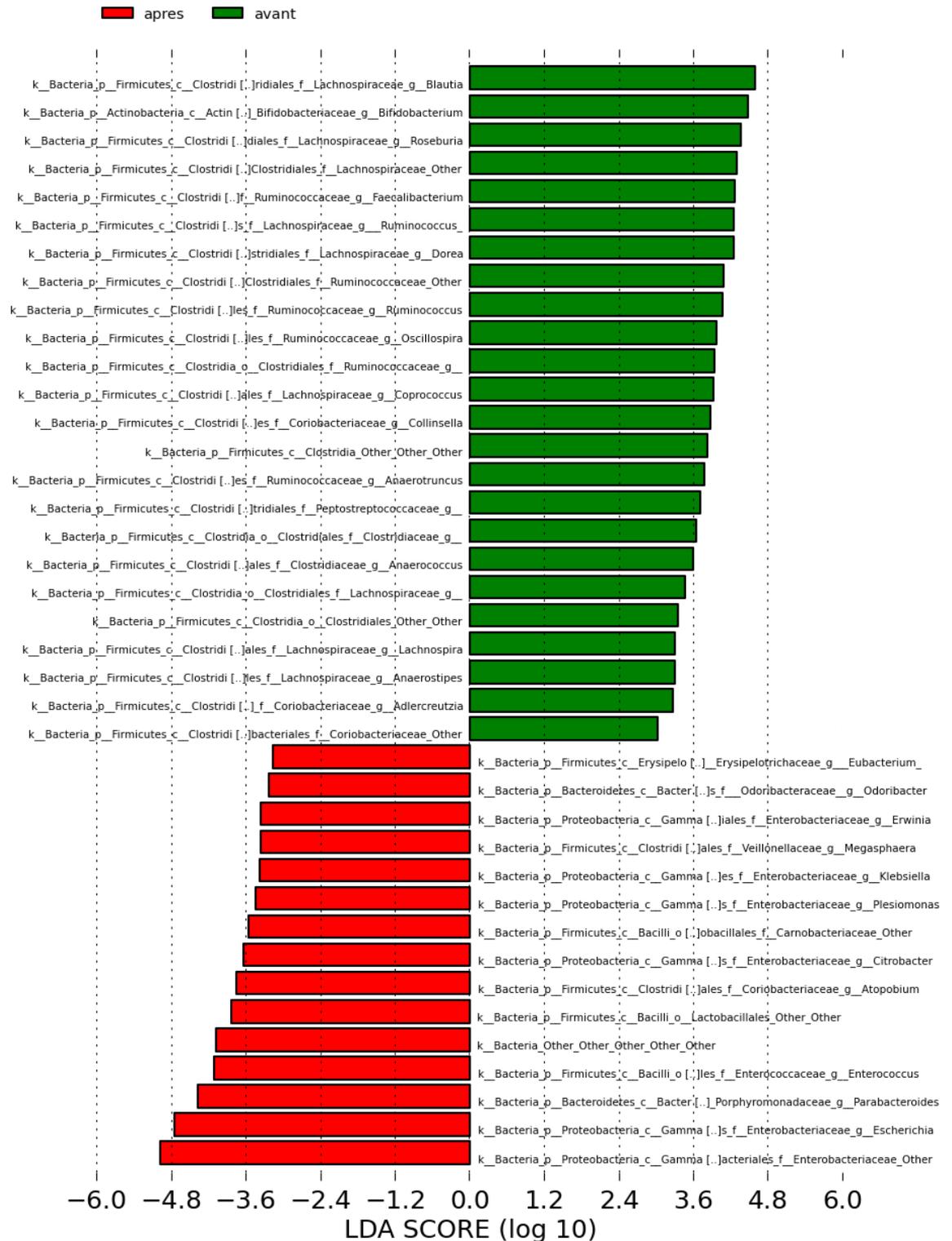
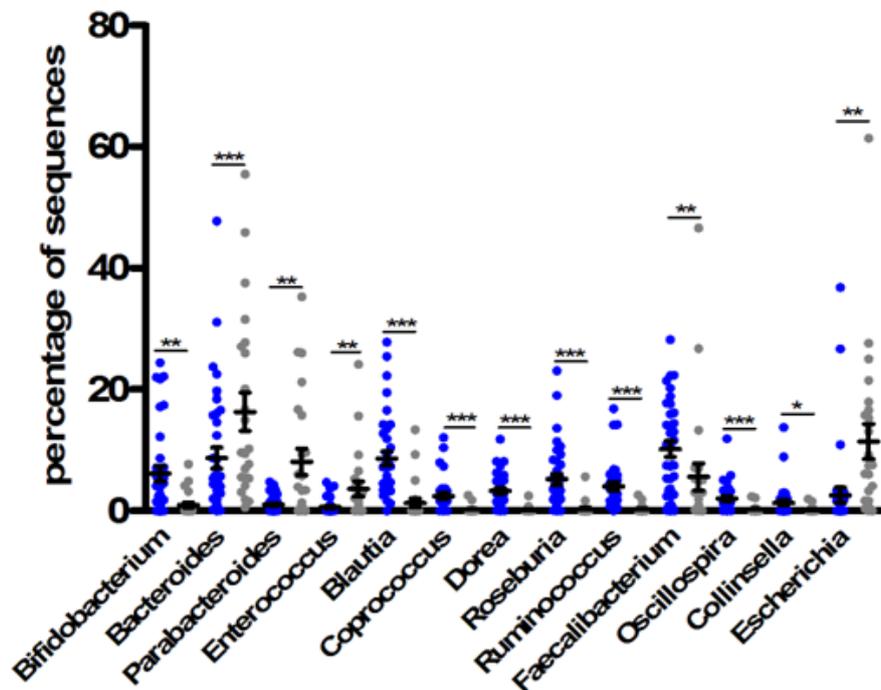


Figure 31. Représentation graphique de l'analyse discriminante linéaire permettant de définir les taxa significativement associées aux échantillons fécaux collectés avant ou après la chimiothérapie⁴⁴. Un score supérieur en valeur absolue à 2,5 est considéré comme significatif.



- Echantillons fécaux collectés avant la chimiothérapie (S1)
- Echantillons fécaux collectés après la chimiothérapie (S2)

Figure 32. Modifications du microbiote fécal au cours de la chimiothérapie à l'échelon du genre.

* p : 0,05-0,005 ; ** p= 0,005-0,001 ; *** p<0,001

4.4. Prédiction de la métagénomique fonctionnelle

Nous avons utilisé l'algorithme PICRUSt qui permet de prédire la composition fonctionnelle du microbiote fécal chez nos patients à partir de l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S avec une précision de 80 à 90%^{122,123}. Les métagénomés prédits ont ensuite été introduits dans le module MaAsLin pour déterminer quelles sont les voies métaboliques qui sont significativement altérées ou au contraire augmentées au cours de la chimiothérapie (**Tableau X**)^{44,45}.

Voies métaboliques (selon la base de données KEGG Pathway ¹²³)	Coefficient	P-value	Q-value
1. metabolism			
1.1. Carbohydrate metabolism			
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;Ascorbate and aldarate metabolism	0,14	0,001	0,001
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;Butanoate metabolism	0,14	0,001	0,001
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;C5-Branched dibasic acid metabolism	-0,04	0,011	0,058
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;Citrate cycle (TCA cycle)	0,15	0,001	0,001
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;Galactose metabolism	-0,19	0,001	0,001
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0,10	0,001	0,001
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;Inositol phosphate metabolism	0,04	0,007	0,040
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;Pentose phosphate pathway	-0,20	0,001	0,002
Metabolism;Carbohydrate Metabolism;Propanoate metabolism	0,06	0,001	0,001
1.2. Energy metabolism			
Metabolism;Energy Metabolism;Carbon fixation in photosynthetic organisms	-0,05	0,019	0,101
Metabolism;Energy Metabolism;Nitrogen metabolism	0,09	0,001	0,005
Metabolism;Energy Metabolism;Photosynthesis	-0,15	0,001	0,001
Metabolism;Energy Metabolism;Photosynthesis proteins	-0,14	0,001	0,001
1.3. Lipid metabolism			
Metabolism;Lipid Metabolism;Arachidonic acid metabolism	0,09	0,003	0,020
Metabolism;Lipid Metabolism;Biosynthesis of unsaturated fatty acids	0,11	0,001	0,001
Metabolism;Lipid Metabolism;Fatty acid biosynthesis	-0,04	0,021	0,112
Metabolism;Lipid Metabolism;Fatty acid metabolism	0,14	0,001	0,001
Metabolism;Lipid Metabolism;Glycerolipid metabolism	-0,09	0,001	0,001
Metabolism;Lipid Metabolism;Linoleic acid metabolism	-0,22	0,001	0,001
Metabolism;Lipid Metabolism;Sphingolipid metabolism	-0,08	0,002	0,015
1.5. amino acid metabolism			
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Cysteine and methionine metabolism	-0,16	0,005	0,028
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Glycine, serine and threonine metabolism	0,02	0,043	0,207
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Histidine metabolism	-0,12	0,001	0,001
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Lysine biosynthesis	-0,33	0,001	0,001
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Lysine degradation	0,18	0,001	0,001
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Phenylalanine metabolism	0,09	0,001	0,002
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	-0,19	0,001	0,001
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Tryptophan metabolism	0,18	0,001	0,001
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Tyrosine metabolism	0,07	0,001	0,001
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	-0,13	0,001	0,001
Metabolism;Amino Acid Metabolism;Valine, leucine and isoleucine degradation	0,18	0,001	0,001

1.6. Metabolism of other amino acids			
Metabolism;Biosynthesis of Other Secondary Metabolites;Butirosin and neomycin biosynthesis	-0,20	0,001	0,001
Metabolism;Biosynthesis of Other Secondary Metabolites;Isoquinoline alkaloid biosynthesis	0,17	0,001	0,001
Metabolism;Biosynthesis of Other Secondary Metabolites;Phenylpropanoid biosynthesis	-0,06	0,007	0,040
1.7. Glycan biosynthesis and metabolism			
Metabolism;Glycan Biosynthesis and Metabolism;Glycosaminoglycan degradation	0,10	0,032	0,156
Metabolism;Glycan Biosynthesis and Metabolism;Glycosyltransferases	0,11	0,001	0,001
Metabolism;Glycan Biosynthesis and Metabolism;Lipopolysaccharide biosynthesis	0,42	0,001	0,001
Metabolism;Glycan Biosynthesis and Metabolism;Lipopolysaccharide biosynthesis proteins	0,42	0,001	0,001
Metabolism;Glycan Biosynthesis and Metabolism;Other glycan degradation	-0,10	0,002	0,013
1.8. Metabolism of cofactors and vitamins			
Metabolism;Metabolism of Cofactors and Vitamins;Lipoic acid metabolism	0,22	0,001	0,001
Metabolism;Metabolism of Cofactors and Vitamins;One carbon pool by folate	-0,09	0,001	0,001
Metabolism;Metabolism of Cofactors and Vitamins;Pantothenate and CoA biosynthesis	-0,10	0,001	0,001
Metabolism;Metabolism of Cofactors and Vitamins;Porphyrin and chlorophyll metabolism	-0,23	0,002	0,011
Metabolism;Metabolism of Cofactors and Vitamins;Retinol metabolism	0,15	0,001	0,003
Metabolism;Metabolism of Cofactors and Vitamins;Riboflavin metabolism	0,06	0,001	0,001
Metabolism;Metabolism of Cofactors and Vitamins;Thiamine metabolism	-0,07	0,001	0,001
Metabolism;Metabolism of Cofactors and Vitamins;Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	0,25	0,001	0,001
1.9. metabolism of terpenoids and polyketides			
Metabolism;Metabolism of Terpenoids and Polyketides;Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	0,24	0,001	0,001
Metabolism;Metabolism of Terpenoids and Polyketides;Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	-0,15	0,001	0,002
Metabolism;Metabolism of Terpenoids and Polyketides;Geraniol degradation	0,31	0,001	0,001
Metabolism;Metabolism of Terpenoids and Polyketides;Limonene and pinene degradation	0,06	0,001	0,003
Metabolism;Metabolism of Terpenoids and Polyketides;Polyketide sugar unit biosynthesis	-0,07	0,001	0,002
Metabolism;Metabolism of Terpenoids and Polyketides;Prenyltransferases	-0,06	0,001	0,002
Metabolism;Metabolism of Terpenoids and Polyketides;Terpenoid backbone biosynthesis	-0,13	0,001	0,001
1.11. Xenobiotics biodegradation and metabolism			
Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Aminobenzoate degradation	0,07	0,001	0,001

Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Bisphenol degradation	-0,18	0,001	0,001
Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Caprolactam degradation	0,22	0,001	0,001
Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Chloroalkane and chloroalkene degradation	-0,06	0,001	0,001
Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Drug metabolism - cytochrome P450	0,19	0,001	0,001
Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Drug metabolism - other enzymes	-0,04	0,004	0,021
Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Ethylbenzene degradation	0,18	0,001	0,001
Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	0,19	0,001	0,001
Metabolism;Xenobiotics Biodegradation and Metabolism;Toluene degradation	0,07	0,001	0,001
2. Genetic information processing			
2.1. Transcription			
Genetic Information Processing;Transcription;RNA polymerase	-0,08	0,001	0,001
Genetic Information Processing;Transcription;Transcription machinery	-0,36	0,001	0,001
2.2. Translation			
Genetic Information Processing;Translation;RNA transport	-0,07	0,002	0,015
Genetic Information Processing;Translation;Translation factors	-0,05	0,001	0,001
2.3. Folding, sorting and degradation			
Genetic Information Processing;Folding, Sorting and Degradation;Chaperones and folding catalysts	0,18	0,001	0,001
Genetic Information Processing;Folding, Sorting and Degradation;Protein export	-0,08	0,001	0,001
2.4. Replication and repair			
Genetic Information Processing;Replication and Repair;Base excision repair	-0,02	0,033	0,163
Genetic Information Processing;Replication and Repair;DNA replication	-0,11	0,001	0,001
Genetic Information Processing;Replication and Repair;Homologous recombination	-0,19	0,001	0,001
Genetic Information Processing;Replication and Repair;Mismatch repair	-0,17	0,001	0,001
Genetic Information Processing;Replication and Repair;Nucleotide excision repair	-0,13	0,001	0,001
3. Environmental Information Processing			
3.1. Membrane Transport			
Environmental Information Processing;Membrane Transport;Bacterial secretion system	0,18	0,001	0,001
Environmental Information Processing;Membrane Transport;Phosphotransferase system (PTS)	0,22	0,006	0,037
4. Cellular processes			
4.2. Cell motility			
Cellular Processes;Cell Motility;Cytoskeleton proteins	-0,21	0,001	0,001
Cellular Processes;Cell Motility;Flagellar assembly	-0,15	0,010	0,055

Tableau X. Classification des différentes voies métaboliques qui sont modifiées au cours de la chimiothérapie, comparaison entre les échantillons fécaux collectés avant ou après la chimiothérapie, selon la base de données KEGG Pathway ¹²³. Un coefficient positif signifie une association aux échantillons fécaux collectés après la chimiothérapie, un coefficient négatif signifie une association aux échantillons fécaux collectés avant la chimiothérapie. La significativité statistique est retenue lorsque $p < 0,05$ et $q < 0,25$.

Au total, soixante-dix-huit fonctions prédites portées par le microbiote intestinal étaient significativement modifiées au cours de la chimiothérapie. Ces modifications touchaient les différentes voies métaboliques décrites dans la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ¹²³. Les changements les plus significatifs incluaient une perte dans la biosynthèse des acides aminés (lysine, tyrosine, tryptophane, leucine, isoleucine), une perte de la biosynthèse des acides gras, une diminution des voies métaboliques responsables de la mobilité des cellules et une perte de la réplication et de la réparation de l'ADN.

Des voies métaboliques étaient significativement augmentées au cours de la chimiothérapie. Les augmentations les plus significatives étaient en rapport avec la biodégradation des xénobiotiques (aminobenzoate, caprolactam, éthylbenzène et toluène), avec le métabolisme du carbohydrate (ascorbate et aldarate) et avec la dégradation du glycane.

Les intermédiaires du métabolisme du benzoate sont connus pour influencer la dysbiose en réponse à un stress et ont la possibilité de promouvoir la croissance des *Enterobacteriaceae* et leur virulence ^{124,125}. Cependant, seule une analyse métagénomique permettrait de relier précisément les espèces bactériennes aux fonctions KEGG.

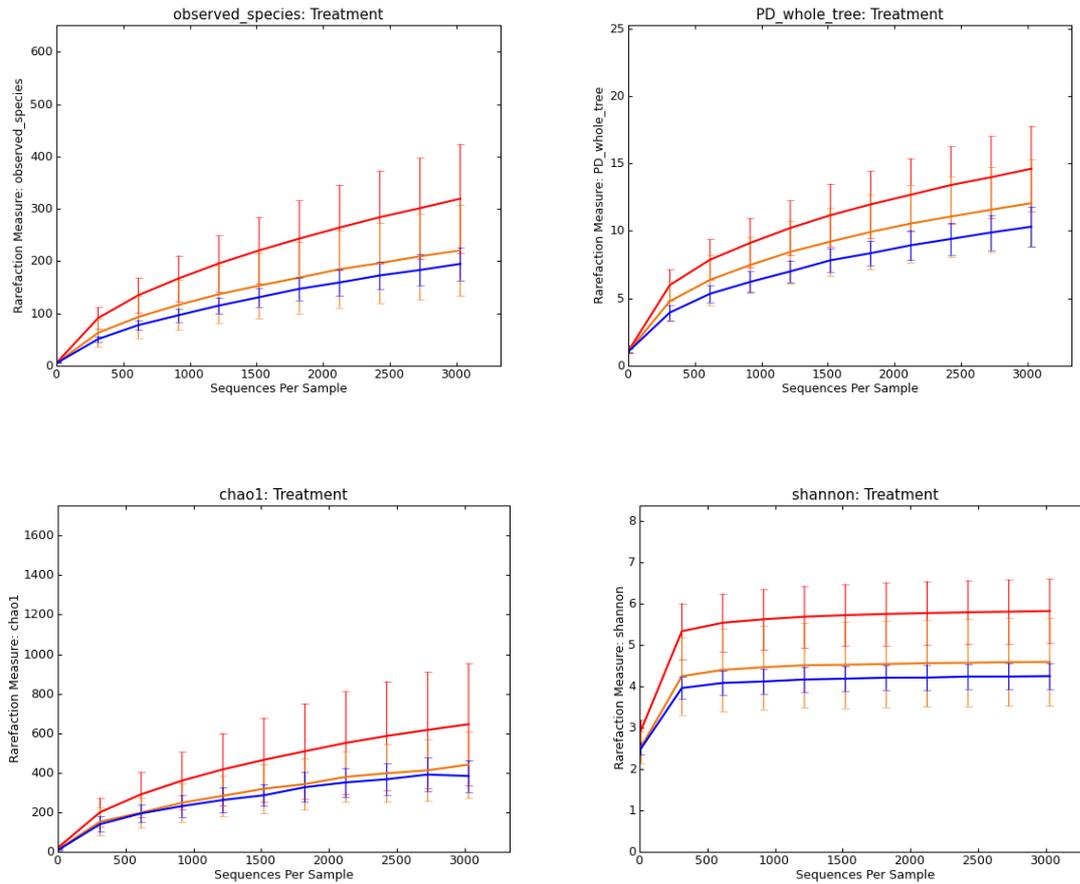
5. Modifications du microbiote intestinal prédictives de la survenue d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère

Le deuxième objectif de notre travail était d'analyser le 2^{ème} échantillon de selles, c'est-à-dire celui collecté au 7^{ème} jour, afin de voir s'il présentait des caractéristiques permettant de différencier les patients qui vont développer ensuite une diarrhée post-chimiothérapie sévère des patients ne développant pas de diarrhée post-chimiothérapie sévère.

5.1. Diversité réduite dans l'échantillon post-chimiothérapie chez les patients développant une diarrhée post-chimiothérapie sévère

5.1.1. Alpha-diversité

Nos résultats montrent qu'il y a une diminution de l'alpha-diversité au cours de la chimiothérapie et que cette diminution est encore plus marquée chez les patients développant une diarrhée post-chimiothérapie sévère (**Figure 33, Tableau XI**).



- Echantillons fécaux collectés avant la chimiothérapie (S1)
- Echantillons fécaux collectés après la chimiothérapie, pas de diarrhée sévère (S2_nosCID)
- Echantillons fécaux collectés après la chimiothérapie, diarrhée sévère (S2_sCID)

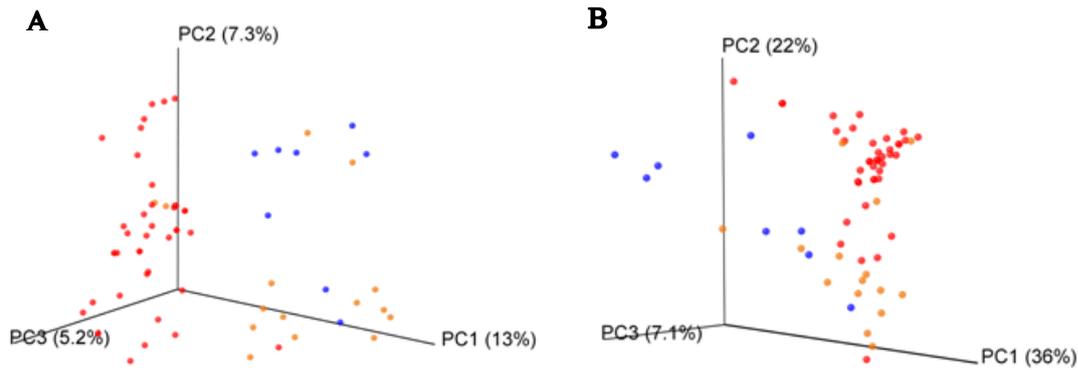
Figure 33. Représentation graphique des différents paramètres évaluant l’alpha-diversité des échantillons fécaux collectés.

Espèces observées					
Groupe1	Groupe2	Groupe1 moyenne±SD	Groupe2 moyenne±SD	t stat	p-value
S1	S2_sCID	328,1±108,2	194,8±31,2	3,4	0,003
S1	S2_nosCID	328,1±108,2	220,6±87,4	2,5	0,03
Index Chao1					
S1	S2_sCID	671,8±318,8	383,3±79,9	2,5	0,033
S1	S2_nosCID	671,8±318,8	441,1±169,3	2,9	0,048
Index Shannon					
S1	S2_sCID	5,8±0,8	4,2±0,3	5,2	0,003
S1	S2_nosCID	5,8±0,8	4,6±1,1	2,6	0,03
Arbre phylogénétique complet					
S1	S2_sCID	14,8±3,3	10,3±1,5	3,7	0,003
S1	S2_nosCID	14,8±3,3	12,1±3,2	2,7	0,021

Tableau XI. Comparaisons des différents paramètres évaluant l'alpha-diversité entre les échantillons collectés avant la chimiothérapie (S1), les échantillons collectés après la chimiothérapie des patients ne développant pas de diarrhée sévère (S2_nosCID) et les échantillons collectés après la chimiothérapie des patients développant une diarrhée sévère (S2_sCID). Test de Student avec permutations de Monte-Carlo.

5.1.2. Beta-diversité

L'analyse en coordonnées principales basée la distance métrique UniFrac (Unweighted et Weighted) permet de séparer, en 3 groupes distincts, les échantillons collectés avant la chimiothérapie, les échantillons collectés après la chimiothérapie des patients ne développant pas de diarrhée sévère et les échantillons collectés après la chimiothérapie des patients développant une diarrhée sévère (**Figure 34**).



- Echantillon fécal collecté avant la chimiothérapie
- Echantillon fécal collecté après la chimiothérapie, pas de diarrhée sévère
- Echantillon fécal collecté après la chimiothérapie, diarrhée sévère

Figure 34. Représentation graphique de l'analyse de la bêta-diversité par ordination basée la distance métrique UniFrac Unweighted (A) et Weighted (B).

L'application de la méthode ADONIS montre que cette séparation en 3 clusters (échantillon collecté avant la chimiothérapie, échantillon collecté après la chimiothérapie/pas de diarrhée sévère et échantillons collectés après la chimiothérapie/diarrhée sévère) est statistiquement significative (Tableau XII).

Unweighted Unifrac						
	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
QIIME data	2	2,1	1,1	3,8	0,1	0,001
Residuals	56	15,5	0,3		0,9	
Total	58	17,6			1,0	
Weighted Unifrac						
QIIME data	2	0,9	0,5	13,5	0,3	0,001
Residuals	56	2,1	0,1		0,7	
Total	58	3,1			1,0	

Tableau XII. Résultats de la méthode ADONIS qui détermine si les différences observées en termes de bêta-diversité sont statistiquement significatives entre les 3 groupes (échantillons collectés avant la chimiothérapie, échantillons collectés après la chimiothérapie chez les patients développant une diarrhée sévère, échantillons collectés après la chimiothérapie chez les patients ne développant pas de diarrhée sévère).

5.1.3. Classification Random Forrest

Pour déterminer le degré de différenciation entre les échantillons collectés avant la chimiothérapie, les échantillons collectés après la chimiothérapie chez les patients développant une diarrhée sévère et les échantillons collectés après la chimiothérapie chez les patients ne développant pas de diarrhée sévère, nous avons réalisé une classification Random Forrest de nos échantillons ¹²⁶.

Ce modèle permet de classer les échantillons d'origine inconnue avec un taux d'erreur de 10,2±0,1%, ce qui est 4 fois supérieur au taux d'erreur de base. Les auteurs ont décrit que le taux d'erreur de classification est significatif si le ratio avec le taux d'erreur de base est supérieur à 2 ¹²⁶. Ainsi, ce résultat indique que les différents échantillons ont des caractéristiques hautement significatives qui permettent de différencier les échantillons collectés avant la chimiothérapie,

échantillons collectés après la chimiothérapie des patients développant une diarrhée sévère et échantillons collectés après la chimiothérapie des patients ne développant pas une diarrhée sévère.

5.2. Taxa différenciant les patients développant une diarrhée post-chimiothérapie sévère

Afin de rechercher des facteurs de risque de développer une diarrhée post-chimiothérapie sévère dans le microbiote fécal, nous avons réalisé une analyse discriminante linéaire au niveau des taxa retrouvés dans le 2^{ème} échantillon de selles. Nous avons comparé les échantillons fécaux des patients développant une diarrhée post-chimiothérapie sévère et les échantillons fécaux des patients ne développant pas de diarrhée sévère.

Cette analyse rapporte que le genre *Bacteroides* est significativement associé à la survenue d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère alors que les genres *Escherichia*, *Atobopium*, *Oribacterium*, *Anaerococcus*, *Blautia*, *Mogibacterium*, *Bifidobacterium* sont significativement associés à l'absence de survenue d'une diarrhée (**Figure 35, Figure 36**).

Ainsi, il est possible de décrire, sur l'échantillon collecté après la chimiothérapie, c'est-à-dire en médiane 6 jours avant la survenue de la diarrhée post-chimiothérapie, des modifications au sein du microbiote fécal qui sont prédictives de la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie.

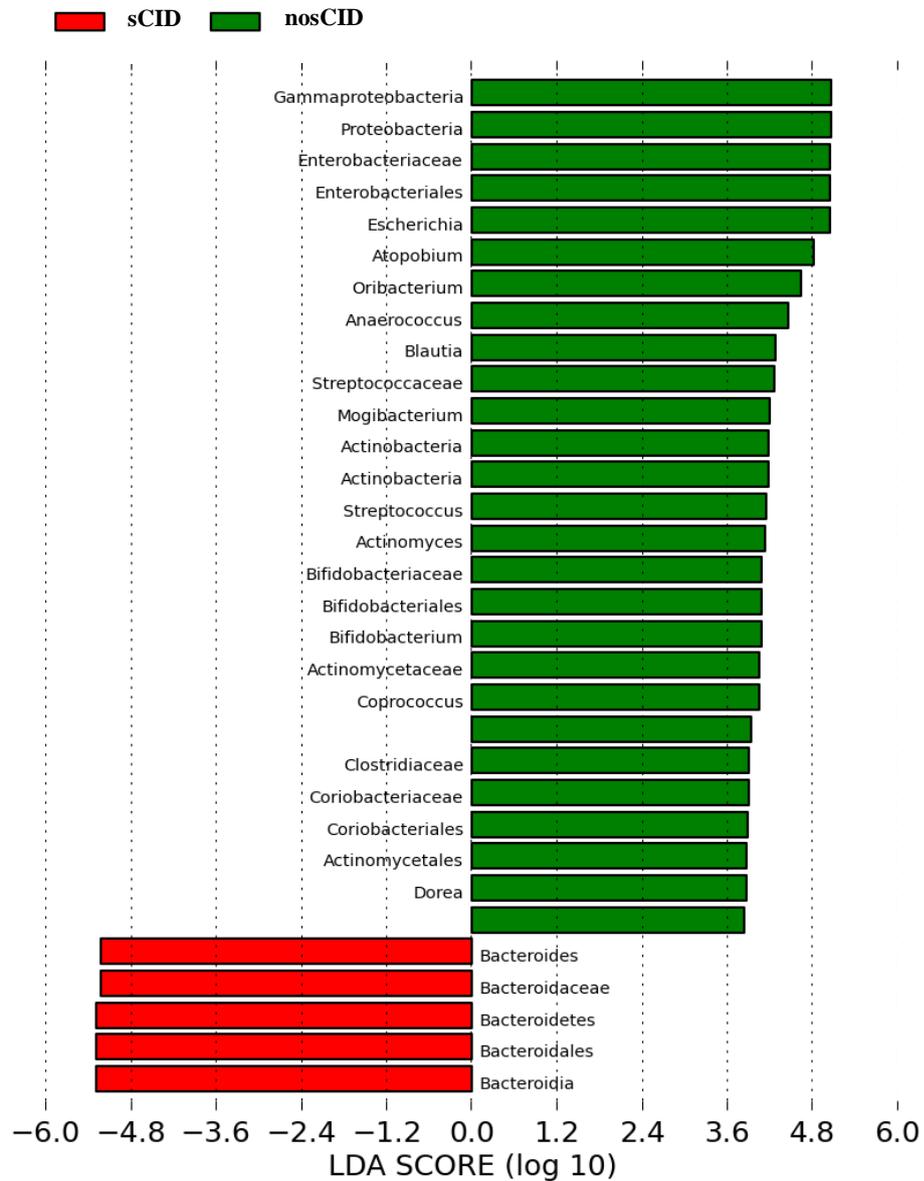


Figure 35. Analyse discriminante linéaire des échantillons fécaux collectés après la chimiothérapie. Les taxa en vert sont significativement associés à l'absence de diarrhée post-chimiothérapie sévère (nosCID) tandis que les taxa en rouge sont significativement associés à la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère (sCID). Un score supérieur en valeur absolue à 2,5 est considéré comme significatif.

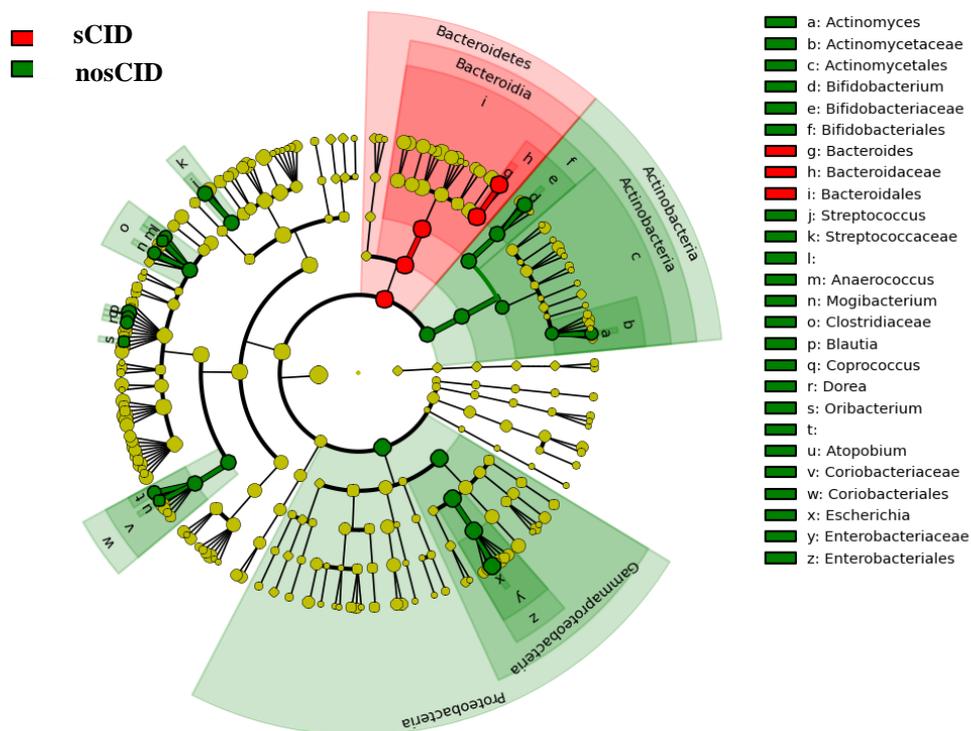


Figure 36. Cladogramme représentant les taxa significativement associés à la diarrhée post-chimiothérapie sévère et les taxa qui sont associés à l'absence de survenue d'une diarrhée sévère. Les taxa en vert sont significativement associés à l'absence de diarrhée post-chimiothérapie sévère (nosCID) tandis que les taxa en rouge sont significativement associés à la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère (CID).

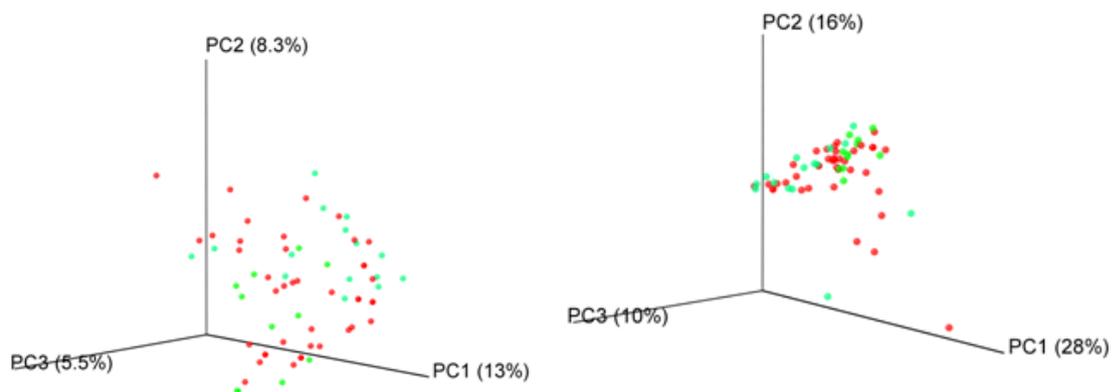
6. Evaluation de nos échantillons de selles par rapport à différentes études déjà publiées

Enfin, nous avons cherché à comparer les résultats obtenus avec les échantillons fécaux que nous avons collecté à ceux d'analyses effectuées avec la même technologie (454 Life Sciences-Roche®) et séquençant les mêmes régions hypervariables (V5 et V6 du gène codant pour l'ARNr 16S).

Nous avons retrouvé 2 études dont les séquences sont à disposition sur QIIME ¹²⁷: 1) une étude de l'effet à court terme de l'antibiothérapie sur le microbiote fécal et 2) une étude de l'impact du régime alimentaire en comparant des individus européens et des individus d'Afrique rurale ^{60,128}.

L'utilisation d'une analyse en coordonnées principales basée sur la distance métrique UniFrac (Unweighted et Weighted), montre que les échantillons collectés avant la chimiothérapie forment un cluster avec les individus européens sains et les sujets contrôles ne recevant pas d'antibiothérapie (**Figure 37**). De plus, la méthode ADONIS montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les 3 groupes, que ce soient pour la distance métrique UniFrac Unweighted ($p = 0,45$) et UniFrac Weighted ($p = 0,49$).

Ainsi, les patients inclus dans notre étude ont un microbiote fécal avant chimiothérapie qui partage des caractéristiques avec les sujets sains en termes de diversité.



- Echantillon fécal d'un patient inclus dans notre étude collecté avant la chimiothérapie
- Echantillon fécal d'un patient sujet contrôle d'une étude sur l'effet de l'antibiothérapie
- Echantillon fécal d'un sujet sain européen

Figure 37. Comparaison de nos échantillons fécaux collectés avant chimiothérapie avec les patients sains de 2 autres études effectuant un séquençage des parties hypervariables V5-V6 du gène codant pour l'ARNr 16S avec le 454 FLX instrument (454 Life Sciences-Roche®).

DISCUSSION

1. Modifications du microbiote fécal au cours de la chimiothérapie

Notre étude a permis, pour la première fois à notre connaissance, de faire un inventaire des modifications du microbiote fécal survenant au cours de la chimiothérapie, en termes de diversité et de taxonomie. Notre projet a aussi permis de mettre en évidence des modifications du microbiote fécal qui sont significativement associées à la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie.

Cet inventaire a été rendu possible grâce à l'utilisation d'une technique de séquençage haut-débit, le pyroséquençage, alors que la dHPLC, technique de biologie moléculaire bas-débit a montré ses limites dans l'identification taxonomique.

Nous rapportons ici les modifications remarquables du microbiote fécal au cours de la chimiothérapie et celles spécifiquement associées à la survenue d'une diarrhée post-chimiothérapie.

1.1. Déplétion du phylum Firmicutes au cours de la chimiothérapie : Facteur de risque de diarrhée post-chimiothérapie sévère

Nous avons montré dans notre travail que le phylum Firmicutes diminuait au cours de la chimiothérapie. De plus, de nombreux membres du phylum Firmicutes (*Oribacterium*, *Anaerococcus*, *Blautia*, *Streptococcus*, *Atopobium*, *Coprococcus*, *Mogibacterium* et *Dorea*) étaient significativement associés à la protection contre la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère.

La diminution du phylum Firmicutes a déjà été rapportée dans une étude chez la souris suite à une antibiothérapie large spectre ¹²⁹. De plus, la plupart des espèces bactériennes appartenant au phylum Firmicutes qui sont modifiées au cours de la chimiothérapie sont des bactéries productrices de butyrate. Le butyrate est un acide gras à chaîne courte qui a des effets anti-inflammatoires bien documentés et qui est la source d'énergie préférentielle pour la synthèse de l'ATP au niveau des colonocytes ^{130,131}. De nombreux acides gras à chaîne courte préviennent la diminution de la

perméabilité de l'épithélium intestinal en augmentant l'expression des protéines des jonctions serrées. De plus, il a été rapporté que le butyrate pourrait renforcer les barrières de défense de l'intestin en augmentant les taux de peptides antimicrobiens et la production de mucines^{130,131}. De plus, une autre étude a rapporté que plusieurs bactéries productrices de butyrate sont absentes ou diminuées chez les patients ayant une diarrhée à *Clostridium difficile* et chez les patients ayant une diarrhée nosocomiale non due à *Clostridium difficile*. Cette étude suggère que la diminution des bactéries productrices de butyrate pourrait rendre l'hôte susceptible à la diarrhée nosocomiale¹³². Nous faisons donc ici l'hypothèse que la déplétion des bactéries productrices de butyrate induirait un dysfonctionnement de l'épithélium et augmenterait la charge osmotique dans la lumière intestinale, conduisant à la survenue de la diarrhée post-chimiothérapie.

Par ailleurs, ce phylum est largement plus abondant chez les patients obèses que chez les sujets maigres : le microbiote de souris obèses se montre très efficace en termes de récupération d'énergie à partir des résidus alimentaires^{133,134}. Ainsi, la diminution marquée du phylum Firmicutes au cours de la chimiothérapie a des conséquences importantes chez les patients cancéreux, ayant souvent une altération de l'état général, car elle entraîne une chute de la capacité à extraire de l'énergie de l'alimentation.

De plus, nous avons observé une diminution au cours de la chimiothérapie du genre *Faecalibacterium*, dont le constituant principal est *Faecalibacterium prausnitzii*. Cette diminution de *F. prausnitzii* avait déjà été mise en évidence par van Vliet et al., dans leur étude chez 9 enfants ayant une leucémie aiguë myéloïde, où ils retrouvaient une diminution de *F. prausnitzii* d'un facteur 3000 dans les échantillons fécaux collectés au cours du traitement par rapport aux sujets sains¹⁰¹. Il a aussi été mis en évidence qu'il existe une diminution de la diversité du microbiote intestinal dans la maladie de Crohn spécialement associée à une diminution de *F. prausnitzii*. En effet, il a été rapporté que les patients atteints de maladie de Crohn, présentant moins de *F. prausnitzii* au niveau de la muqueuse iléale au moment d'une chirurgie avec iléocoléctomie droite et du contrôle endoscopique à 6 mois ont plus de récurrence post-opératoire de leur maladie. *F. prausnitzii* serait donc un facteur protecteur contre l'inflammation intestinale. Cette constatation chez l'homme est appuyée par des études parallèles in

vitro et chez la souris montrant une action anti-inflammatoire de cette bactérie avec diminution de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation ¹³⁵. Ainsi, ces données suggèrent que les altérations du microbiote intestinal au cours de la chimiothérapie pourraient être impliquées dans la physiopathologie de la mucite, indiquant l'impossibilité de maintenir un microbiote intestinal ayant des propriétés anti-inflammatoires lorsqu'il est soumis à la chimiothérapie.

1.2. Augmentation du phylum Bacteroidetes au cours de la chimiothérapie : Facteur de risque de diarrhée post-chimiothérapie sévère

Associée à cette décroissance du phylum Firmicutes, on retrouve une augmentation du phylum Bacteroidetes au cours de la chimiothérapie. De plus, le genre *Bacteroides* dans le 2^{ème} échantillon fécal est significativement associé avec la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie.

Cette augmentation du genre *Bacteroides* au cours de la chimiothérapie avait déjà été rapportée par Zwielehner et al. dans une population adulte ayant plusieurs types de cancer (avant chimiothérapie : 26±11% ; après chimiothérapie : 28±14%) ainsi que par van Vliet et al. dans une population pédiatrique porteur d'une leucémie aiguë myéloïde (de 10⁷ au début du traitement à 10⁸ par gramme de contenu à la fin du traitement) ^{101,102}.

Une autre étude a montré que la famille *Bacteroidaceae* était augmentée dans un modèle murin d'inflammation intestinale aiguë induite par le DSS ⁷⁸. De même, une étude a rapporté que *Bacteroides* serait impliqué dans l'induction de l'inflammation dans un modèle de colite expérimentale induite par le TNBS ⁷⁵.

Cette augmentation de *Bacteroides* au cours de la chimiothérapie est aussi similaire à ce que l'on peut retrouver chez la souris soumise à une antibiothérapie large spectre ¹²⁹. Par ailleurs, le microbiote d'un homme adulte non obèse est caractérisé par un ratio entre les phyla Firmicutes et Bacteroidetes de l'ordre de 10 pour 1. Ce ratio diminue au cours de certaines affections comme les MICI (rapport de 1/1 à 3/1) ¹³⁶. Ces données suggèrent, là-aussi, que les altérations du microbiote

intestinal au cours de la chimiothérapie pourraient être impliquées dans la physiopathologie de la mucite.

Les espèces du genre *Bacteroides* sont des bacilles Gram-négatif encapsulés anaérobies stricts non sporulés. Le genre *Bacteroides* est un constituant majeur du microbiote intestinal et il participe activement à l'homéostasie intestinale¹³⁷. Cependant, avec une banque génomique très large à sa disposition, *Bacteroides* peut aisément devenir un micro-organisme pathogénique. Ainsi, *Bacteroides* peut agir comme pathogène opportuniste quand l'intégrité de la paroi colique est interrompue, avec une morbi-mortalité significative^{138,139}.

Les principaux facteurs de virulence de *Bacteroides* sont : les propriétés d'adhérence à la muqueuse, la capsule polysaccharidique, l'équipement enzymatique (héparinase, collagénase, DNase, neuraminidase, fibrinolysine, hyaluronidase, chondroïtine sulfatase, protéases), l'aéro-tolérance, le lipopolysaccharide, la résistance aux mécanismes de défense de l'hôte grâce à l'activité anti-chimiotactique du peptidoglycane, et la sécrétion d'une entérotoxine par certaines souches de *B. fragilis* (Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* : ETBF)^{138,139}.

Par ailleurs, une étude a d'ailleurs rapporté qu'ETBF, peut à lui seul, stimuler l'inflammation colique et significativement augmenter l'inflammation colique dans un modèle de colite induite par le DSS. Ainsi, l'acquisition d'une colonisation par ETBF est un facteur potentiel de l'initiation et de l'exacerbation de la colite et ce mécanisme pourrait intervenir dans la mucite post-chimiothérapie¹⁴⁰. De plus, plusieurs études ont rapporté qu'ETBF était associé à la diarrhée chez des enfants et chez des adultes¹⁴¹⁻¹⁴³. Sears et al. ont rapporté qu'ETBF était retrouvé chez 17,5% des patients ayant une diarrhée, aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte. Les isolats ETBF étaient confirmés par PCR pour le gène *bft*. Ils montraient aussi que les leucocytes fécaux, la lactoferrine et les cytokines pro-inflammatoires (Interleukine 8, Tumor Necrosis factor α) augmentaient rapidement chez les patients infectés par l'ETBF, traduisant une inflammation colique associée à l'ETBF¹⁴². Cohen et al. ont analysé les échantillons fécaux de 152 patients hospitalisés et ayant une diarrhée nosocomiale avec une recherche d'ETBF par une qPCR spécifique. La détection des séquences du gène ETBF était significativement supérieure par rapport aux sujets contrôles (9,2% vs 2,3% ; $p = 0,04$). Les auteurs

concluaient qu'ETBF pouvait jouer un rôle dans la diarrhée acquise à l'hôpital ¹⁴⁴. Nous faisons donc ici l'hypothèse que l'ETBF est impliqué dans la physiopathologie de la diarrhée post-chimiothérapie.

1.3. Augmentation du phyla Proteobacteria au cours de la chimiothérapie

Notre étude montre que durant la chimiothérapie, les patients ont une augmentation du phylum Proteobacteria. A l'échelon du genre, on observe une augmentation d'*Escherichia* et de *Klebsiella*. Ces résultats confirment des données obtenues par des études utilisant des modèles animaux ^{92-94,96}.

De plus, l'analyse de métagénomique fonctionnelle prédictive rapporte une augmentation du métabolisme du benzoate au cours de la chimiothérapie. Des études ont montré qu'une augmentation des dérivés du benzoate pouvait promouvoir la croissance des *Enterobacteriaceae* et leur virulence ^{124,125}.

1.3.1. Les bactériémie à bactérie à Gram-négatif

Cette augmentation d'*Escherichia* a des conséquences cliniques car chez les patients cancéreux, *Escherichia coli* est l'une des bactéries les plus fréquemment isolées dans les hémocultures ⁹⁷. Elle est particulièrement fréquente chez les patients d'oncohématologie en raison de l'utilisation de régime de chimiothérapie intensifs de conditionnement à l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques qui sont responsables d'une aplasie post-chimiothérapie ^{145,146}.

Dans une revue, nous avons compilé les données les plus récentes de la littérature avec pour objectif d'inventorier les dernières tendances en termes d'épidémiologie des bactériémies des patients cancéreux ⁹⁷. Les différentes études retrouvées dans la littérature sont rapportées dans le **tableau XIII**.

	Irfan et al., 2008 ¹⁴⁷	Cattaneo et al., 2012 ¹⁴⁸	Kjellander et al., 2012 ¹⁴⁹	Chong et al., 2011 ¹⁵⁰	Kang et al., 2012 ¹⁵¹	Gudiol et al., 2012 ¹⁵²
Période de l'étude	2001-2006	2004-2010	2002-2008	2006-2009	2006-2007, 2008-2008	2006-2010
Pays	Pakistan	Italie	Suède	Japon	Corée du Sud	Espagne
Antibioprophylaxie	Non reportée	Non reportée	Non	Non	Non	Non
Bactérie à Gram-négatif	41%	57,3%	46,9%	48,1%	55,6%	49%
<i>P. aeruginosa</i>	9,7%	15%	5,3%	14,7%	7,1%	23%
<i>E. Coli</i>	36,6%	NS	17,8%	18,6%	25%	51%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2%	NS	0,8%	NS	NS	1%
<i>Acinetobacter</i> spp.	14,8%	NS	0,1%	NS	2,6%	1%
<i>Klebsiella</i> spp.	11,6%	NS	9,8%	9%	16,2%	22%
<i>Enterobacter</i> spp.	8,5%	NS	5,4%	3,5%	4,7%	9%
<i>Citrobacter</i> spp.	1,7%	NS	1,3%	NS	NS	NS
Bactérie à Gram-positif	54%	33,6%	53,1%	45,5%	32,7%	41%
<i>Staphylococcus</i> spp.	55,2%	NS	NS	33%	NS	NS
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,5%	NS	6,9%	1,3%	9,8%	12%
<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative	NS	NS	14,7%	23,1%	8,3%	43%
<i>Enterococcus</i> spp.	5,1%	NS	9,5%	5,8%	9,2%	23%
<i>Streptococcus</i> spp.	5,5%	NS	NS	6,4%	3,4%	NS
<i>S. pneumoniae</i>	3,5%	NS	2,3%	NS	2%	6%
<i>S. viridans</i>	NS	NS	14%	5,8%	NS	23%

Tableau XIII. Distribution des micro-organismes isolés dans les bactériémies chez les patients cancéreux. Etudes publiées depuis l'année 2008.

Cette revue montre, qu'à ce jour, les bactéries à Gram-négatif sont les micro-organismes les plus fréquemment isolés dans les hémocultures des patients recevant une chimiothérapie.

Plusieurs causes sont impliquées dans cette situation. La plus significative est la moindre utilisation de quinolone en antibioprofylaxie que ce qui a été fait par le passé ^{145,153-156}. L'utilisation de quinolone est l'un des moyens pour réduire l'incidence des bactériémies à bactérie à Gram-négatif ¹⁵⁷. L'incidence des bactéries à Gram-négatifs était ainsi significativement plus élevée dans les études regroupant des patients n'ayant pas d'antibioprofylaxie par quinolone. D'ailleurs, l'arrêt de l'antibioprofylaxie par quinolone dans plusieurs institutions était associé à la réémergence de bactériémies à bactérie à Gram-négatif, en comparaison aux données épidémiologiques des années 1990 ^{150-153,158}. Ainsi, l'utilisation décroissante de l'antibioprofylaxie par quinolone est l'un des ressorts de l'augmentation des bactériémies à bactérie à Gram-négatif ces dernières années.

En outre, cette utilisation de quinolone en antibioprofylaxie est associée à la détection croissante de bactéries à Gram-négatif résistantes aux quinolones. Dans les études les plus récentes, plus de la moitié des bactéries à Gram-négatif sont résistantes aux quinolones, la proportion étant de plus de 2/3 pour *E. coli* ^{148,150-152,159}. L'utilisation de quinolone en antibioprofylaxie semble jouer un rôle crucial dans cette augmentation car, dans plusieurs études rapportant une utilisation minimale de l'antibioprofylaxie, on y note un taux de résistance aux quinolones relativement plus faible. Ainsi, l'utilisation d'une antibioprofylaxie reposant sur les quinolones contribue à sélectionner des souches résistantes dans le microbiote intestinal et est associée, non seulement à l'émergence d'*E. coli* résistant à la quinolone, mais aussi aux entérobactéries produisant une bêtalactamase à spectre élargi (BLSE) ou aux staphylocoques résistants à la méticilline ^{148,149,152,160-165}.

D'autres facteurs expliquant la modification du spectre des micro-organismes isolés dans les hémocultures chez les patients cancéreux sont aussi rapportés dans les études comme le type de chimiothérapie utilisée (chimiothérapie myéloablatrice ou non-myéloablatrice), des changements dans la prise en charge des patients (utilisation de cathéter intraveineux qui facilite la colonisation et l'infection par la flore cutanée) ou les conditions environnementales (par exemple le type de climat) ¹⁵⁹. Ainsi, l'utilisation d'agents moins cytotoxiques, responsable de mucite moins sévère et de

neutropénie moins profonde est associée à une diminution des bactériémies aux streptocoques viridans, entérocoques et Gram-négatifs¹⁵²⁻¹⁵⁴. De plus, la réduction de l'utilisation de cathéters intraveineux est associée à une diminution des bactériémies associées à la flore cutanée, le plus souvent à Gram-positif, qui prédominaient ces dernières années (staphylocoque à coagulase-négative)^{145,152-154,166}. Enfin, l'incidence de bactériémie à *Pseudomonas aeruginosa* semble être plus fréquente dans les climats chauds^{159,167}.

1.3.2. Relation entre le microbiote intestinal et la bactériémie à Gram-négatif

Dans le modèle de mucite post-chimiothérapie développé par Sonis, il est décrit une phase d'ulcération conduisant à une destruction de la barrière épithéliale, favorisant la translocation bactérienne⁷⁹. C'est donc dans ce contexte que les bactériémies à bactérie à Gram-négatif peuvent survenir chez les patients cancéreux^{80,93,97}. Une équipe a étudié le microbiote fécal de 94 patients recevant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Une partie des patients avait un microbiote fécal dominé par l'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV), c'est-à-dire que plus de 30% des séquences analysées dans le microbiote fécal correspondait à l'ERV. Cette dominance par l'ERV au niveau du microbiote fécal était associée chez 8 patients sur 9 à la survenue ultérieure d'une bactériémie à ERV (risque relatif : 9,3 ; intervalle de confiance à 95% : 2,4-45,4 ; p = 0,001). De même, une dominance par Proteobacteria était retrouvée chez 2 des 10 patients ayant une bactériémie à Gram-négatif (risque relatif : 5,46 ; intervalle de confiance à 95% : 1,0-19,9 ; p=0,47). Au total, 11 des 22 patients qui développaient une bactériémie avaient une dominance du microbiote intestinal par le micro-organisme correspondant¹⁶⁸.

De plus, dans une autre étude, cette même équipe a montré que la présence de *Barnesiella* dans les échantillons fécaux était associée à une protection contre l'émergence d'une domination du microbiote fécal par l'ERV. Ces résultats suggèrent qu'un microbiote intestinal ayant une quantité suffisante de *Barnesiella* peut conférer une protection contre la colonisation par l'ERV, et qu'il existe bien un microbiote associé à la colonisation par l'ERV¹⁶⁹.

Ainsi donc, des modifications du microbiote intestinal au cours de la chimiothérapie peuvent faciliter l'établissement de micro-organismes potentiellement pathogènes. En sachant qu'approximativement 80% des infections chez les patients neutropéniques sont rapportées comme étant causées par la flore endogène, il semble important de maintenir à l'équilibre le microbiote intestinal et la barrière intestinale ^{95,168-170}.

1.4. Diminution des Bifidobacteria

Dans notre étude, nous rapportons une diminution des Bifidobacteria dans les échantillons de selles collectés après la chimiothérapie par rapport aux échantillons de selles collectés avant la chimiothérapie.

Une diminution de l'abondance de *Bifidobacterium* a déjà été mise en évidence par van Vliet et al., dans leur étude sur une population pédiatrique (de 10^8 au début du traitement à 10^6 par gramme de contenu à la fin du traitement) ¹⁰¹. De plus, une diminution de l'abondance relative de *Bifidobacterium* a aussi été rapportée dans les maladies inflammatoires du tube digestif ¹⁷¹. Une autre étude, utilisant la qPCR a rapporté que les Bifidobacteria étaient significativement diminuées dans un modèle murin d'inflammation intestinale aiguë ⁷⁷. Cette diminution des Bifidobacteria a un impact sur l'homéostasie car elles sont impliquées dans la stimulation du système immunitaire et dans certains processus métaboliques ^{61,172,173}.

Une autre étude a démontré que l'inflammation intestinale aiguë est corrigée chez les souris qui ont consommé un lait fermenté contenant *Bifidobacterium lactis* ¹⁷⁴. Par ailleurs, une étude randomisée contre placebo, incluant 42 enfants traités par chimiothérapie a montré que la supplémentation avec Yakult® (souche *Bifidobacterium breve*) a entraîné une diminution de l'incidence de la fièvre, associée à une utilisation moindre de l'antibiothérapie intraveineuse, et a permis de prévenir des modifications du microbiote intestinal, en particulier elle a permis de limiter l'augmentation des *Enterobacteriaceae* ¹⁷⁵. Prévenir la diminution des bifidobacteria semble donc une

des clés pour limiter les complications en rapport avec une inflammation intestinale aiguë pouvant faire suite à la chimiothérapie par exemple.

De surcroît, nous montrons dans notre étude qu'une diminution de *Bifidobacterium* sur l'échantillon fécal collecté après la chimiothérapie est associée à la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère. Dans une étude randomisée en double aveugle, étudiant l'incidence et la sévérité de la diarrhée suite à une irradiation pelvienne et une chimiothérapie par Cisplatine, Chitapanarux et al. ont montré que l'association de 2 probiotiques (*Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum*) réduisait la survenue de la diarrhée grade 2 et 3 dans le groupe expérimental comparativement au groupe placebo (45 contre 9%, $P = 0,002$)¹⁷⁶.

Au total, ces données suggèrent qu'il serait possible de limiter les complications de la mucite post-chimiothérapie ou post-radiothérapie chez les patients cancéreux, par des modulations du microbiote intestinal limitant l'altération du microbiote intestinal, et en particulier en limitant la déplétion en Bifidobacteria.

2. Limites de l'étude

Notre projet de recherche a plusieurs limites. Tout d'abord, nous n'avons utilisé que des échantillons fécaux pour analyser les modifications du microbiote intestinal au cours de la chimiothérapie. Bien que plusieurs études aient démontré que le microbiote fécal est, en partie, différent du microbiote adhérent à la muqueuse colique, la collection d'échantillons biopsiques a été impossible car elle faisait courir un risque aux patients immunodéprimés de notre étude^{55,56}.

Ensuite, la majorité des patients recevaient une antibioprofylaxie au cours de notre étude. Cette antibioprofylaxie pouvait avoir un impact sur le microbiote intestinal. En outre, nous n'avions pas d'échantillons fécaux provenant de patients sains pouvant représenter les sujets contrôles. Cependant, la méta-analyse que nous avons faite montre que les échantillons fécaux des patients collectés avant la chimiothérapie forment un même cluster avec les patients contrôles des 2 autres études^{60,128}.

Enfin notre étude était limitée à l'étude d'un seul gène marqueur phylogénétique : l'ARNr 16S. Cependant à l'aide de PICRUSt, nous avons pu prédire les fonctions portées par le microbiote intestinal ce qui a permis d'obtenir des informations métagénomiques ¹²².

3. Perspectives

3.1. Médecine prédictive

Notre étude montre qu'il est possible de prédire la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère par une analyse du microbiote fécal une semaine avant la survenue de la diarrhée. Ces résultats permettent d'envisager la possibilité d'une modulation du microbiote intestinal en vue de prévenir la survenue de cet effet indésirable potentiellement grave. Ces modulations pourraient reposer sur l'utilisation de probiotiques, de prébiotiques ou de la transplantation fécale.

3.2. Probiotiques et prébiotiques

Des stratégies thérapeutiques, basées sur la consommation de probiotiques ou de prébiotiques, ont déjà été testées dans plusieurs essais cliniques avec pour objectif de prévenir les complications liées à la mucite, que nous avons rapporté dans une revue ⁸¹. Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ¹⁷⁷. Les prébiotiques sont des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne qui échappent à la digestion. Ils sont des substrats potentiels pour les bactéries ¹⁷⁸.

Certains probiotiques ont montré des résultats prometteurs, notamment dans le syndrome de l'intestinal irritable ^{179,180}. En ce qui concerne la mucite post-chimiothérapie ou post-radiothérapie, les preuves fondées sur des essais clinique randomisés sont limitées ¹⁸⁰. Les mécanismes potentiels impliqués dans les effets bénéfiques des probiotiques sur la muqueuse intestinale incluent un effet sur la régulation du système immunitaire, la suppression de la croissance des micro-organismes

pathogènes par compétition et des modifications de la fonction de la barrière intestinale^{180,181}. Des études récentes, in vitro et in vivo, ont permis de mieux appréhender ces mécanismes. Dans ces modèles murins de colite aiguë, les probiotiques prévenaient une augmentation de la perméabilité intestinale, une diminution de l'expression des protéines des jonctions serrées et une augmentation de l'apoptose des cellules de l'épithélium intestinal¹⁸²⁻¹⁸⁴. L'effet protecteur sur la barrière intestinale pourrait être médié par l'activation de p38 et ERK, qui participent à la régulation des jonctions serrées via l'activation du récepteur de l'Epidermal Growth Factor^{183,185,186}. De plus, les probiotiques peuvent réguler la réponse immunitaire en augmentant le nombre de lymphocytes T régulateurs (CD4+ FoxP3+) et en diminuant l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Tumor Necrosis Factor α , Interferon γ et Interleukine 10)¹⁸⁷.

Les probiotiques ont été évalués dans la prévention de la diarrhée post-chimiothérapie. Dans des modèles précliniques, des résultats prometteurs ont été rapportés. Par exemple chez le rat traités par une dose intrapéritonéale d'Irinotecan, VSL#3 prévenait de façon significative la survenue d'une diarrhée modérée à sévère et une perte de poids¹⁸⁸. Cependant les résultats obtenus dans les différentes études précliniques dépendent du modèle, des souches de probiotiques utilisées, du dosage et du plan de traitement. Par exemple, les ingestions orales de *Streptococcus thermophilus* entraînaient une atténuation des dommages intestinaux chez le rat recevant une cure de méthotrexate¹⁸⁹. Cependant, une autre étude avec le même probiotique et avec la même chimiothérapie mais avec un dessin expérimental différent ne démontrait aucun effet bénéfique¹⁹⁰. Dans un modèle de rat recevant une chimiothérapie par 5-FU, *Lactobacillus fermentum* seul ou en association avec le prébiotique fructo-oligosaccharide, réduisait l'inflammation jéjunale sans autre effet bénéfique¹⁹¹.

En pratique clinique, plusieurs essais randomisés ont été publiés à ce jour et sont rapportés dans le **Tableau XIV**. Ainsi, dans une large étude de phase III, incluant 150 patients traités par 5-FU, une supplémentation par *Lactobacillus rhamnosus* a diminué l'incidence de la diarrhée grade 3 ou 4 et la nécessité de réduire les doses de chimiothérapie comparativement au groupe placebo¹⁹².

Cependant, l'utilisation de ces produits doit être prudente chez les patients cancéreux qui ont une immunodépression secondaire à la pathologie ou au traitement. Une revue systématique a rapporté

des complications septiques suite à la consommation de probiotiques en regroupant des cas cliniques de bactériémie (n=5) ou de fongémie (n=27). Les facteurs de risque associés à la survenue de ces complications étaient : prescription d'une antibiothérapie, présence d'une voie veineuse centrale, mucite, immunodépression ¹⁹³. Cependant, les essais cliniques rapportés dans notre revue n'ont pas fait état d'effets indésirables graves d'origine septique ⁸¹. Il a même été observé que la réduction de l'intensité de la mucite par la consommation de probiotiques diminuait le risque de complications septiques chez les patients cancéreux.

Ainsi, il reste à évaluer, pour chaque souche de probiotiques, les risques septiques et la balance bénéfice/risque dans des essais de bonne qualité chez les patients recevant une chimiothérapie intensive dans le cadre d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques pour une hémopathie.

Etude	Patients (N)	Critère de jugement principal	Population et traitement	Probiotique testé	Commentaires sur les résultats
Salminen et al., 1988 ¹⁹⁴	24	Incidence de la diarrhée	Femmes traitées par radiothérapie pelvienne interne et EBRT	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Moins de diarrhée mais plus de flatulence
Urbancsek et al., 2001 ¹⁹⁵	205	Utilisation de traitements anti-diarrhéiques	Patients traités par EBFT en région abdominale	<i>Antibiophilus</i>	Pas de différence statistique sur le critère de jugement principal
Delia et al., 2007 ¹⁹⁶	490	Incidence et sévérité de la diarrhée post-radiothérapie	EBRT pour cancer abdominal ou pelvien	VSL#3	Moins de diarrhée de tout stade (58% vs 38%, p<0,001), moins de diarrhée Grade3/4 (29% vs 6%, p<0,001)
Giralt et al., 2008 ¹⁹⁷	85	Incidence et sévérité de la diarrhée post-radiothérapie	EBRT pour cancer cervical ou de l'endomètre	<i>Lactobacillus casei</i> DN-114001	Pas de différence statistique sur le critère de jugement principal
Chitapanarux et al., 2010 ¹⁷⁶	63	Incidence et sévérité de la diarrhée	Radiothérapie pelvienne et Cisplatine	<i>Lactobacillus acidophilus</i> et <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Réduction de la diarrhée grade 2/3 (45 vs 9%, p=0,002)
Wada et al., 2010 ¹⁷⁵	42	Survenue de complications infectieuses	Enfants recevant une chimiothérapie	<i>Bifidobacterium breve</i> (Yakult)	Réduction de la survenue d'épisodes fébriles, du recours à l'antibiothérapie
Osterlund et al., 2007 ¹⁹²	150	Incidence de la diarrhée sévère	Cancer colorectal, 5-FU	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Moins de diarrhée grade 3/4 (37% vs 22%, p=0,027)

Tableau XIV. Essais cliniques évaluant des probiotiques chez des patients cancéreux.

3.3. Transplantation fécale

3.3.1. Application dans la colite à *Clostridium difficile*

A ce jour, la transplantation fécale a été utilisée dans le cadre des récurrences de *Clostridium difficile*. Plusieurs études qui ont employé la transplantation fécale dans la prise en charge de

réurrences d'infections à *Clostridium difficile* ont obtenu des taux de succès de 86 à 100%¹⁹⁹⁻²⁰³. van Nood et al. ont récemment publié le premier essai clinique comparant la transplantation fécale avec de la vancomycine seule ou de la vancomycine associée à un lavage intestinal pour le traitement de la récurrence de l'infection à *Clostridium difficile*. Ils ont montré que la transplantation fécale résout 81% des cas comparé à un taux de succès de 31% pour la vancomycine seule et de 23% pour la vancomycine associée au lavage intestinal²⁰³.

De plus, l'analyse du microbiote fécal après la transplantation fécale, par une méthode basée sur l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S, rapportait une augmentation de la diversité bactérienne dans les échantillons fécaux, qui devenait similaire à celle observée chez les patients sains, associée à une augmentation des Bacteroidetes et des *Clostridium* cluster IV et XIVa et une diminution des Proteobacteria²⁰³.

Par ailleurs, une étude par pyroséquençage de prélèvements de selles a montré que les patients ayant une récurrence d'infection à *Clostridium difficile* avait une diminution de la richesse et de diversité bactérienne, une diminution des familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae* (bactéries productrices de butyrate) ainsi qu'une augmentation des familles *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae* comparativement à des sujets sains et aux échantillons post-transplantation fécale des mêmes patients. La perte de certaines familles (*Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*), connues pour leur rôle dans l'homéostasie intestinale, est associée au risque de développer une infection à *Clostridium difficile*, comme nous l'avons rapporté pour la diarrhée post-chimiothérapie. De plus, la restauration de ces mêmes familles par la transplantation fécale est associée au retour à l'homéostasie, c'est-à-dire au retour à l'équilibre du microbiote intestinal chez les patients ayant une colite à *Clostridium difficile*. Un microbiote altéré est restauré par la transplantation fécale : le microbiote fécal des patients ayant une récurrence d'infection à *Clostridium difficile* est restauré par la transplantation fécale pour devenir proche de celui des individus sains²⁰⁴. Il est donc possible de moduler un microbiote associé à une situation pathologique pour réorienter l'écosystème vers un état d'équilibre.

3.3.2. Applications à la bactériémie à ERV

Les bactériémies à ERV sont particulièrement fréquentes chez les patients cancéreux et représentent un problème de santé publique dans de nombreux pays ⁹⁷. Une équipe a étudié le microbiote fécal associé à la colonisation par ERV. Dans un premier temps, des souris ont été traitées par ampicilline puis les souris recevaient un gavage par ERV pour devenir colonisée à ERV. Puis, les souris ont reçu, soit des transplants fécaux provenant de souris non traitées, soit des cultures aérobies provenant de transplants fécaux, soit des cultures anaérobies provenant de transplants fécaux. Il a alors été observé une disparition de l'ERV tant chez les souris ayant reçu des transplants fécaux que chez les souris ayant reçu des cultures anaérobies. En revanche, rien de tel ne s'est produit chez celles qui ont reçu des cultures aérobies. Ensuite, il a été montré que les souris qui avaient éliminé l'ERV possédaient une bactérie anaérobie nommée *Barnesiella*, contrairement à celles qui n'avaient pas pu éliminer l'ERV ¹⁶⁹. Ainsi, la restauration d'un microbiote intestinal par la transplantation fécale pourrait limiter les conséquences cliniques de la chimiothérapie, de la radiothérapie ou de l'antibiothérapie large spectre, elle aussi largement prescrite chez les patients cancéreux.

3.3.3. Applications en cancérologie clinique

Ces résultats très prometteurs permettraient donc d'envisager l'application de la transplantation fécale chez les patients cancéreux pour prévenir la survenue de la diarrhée post-chimiothérapie. Ainsi, un nouveau champ d'investigation s'ouvre avec d'une part, l'utilisation du séquençage haut-débit, qui permet de définir quels sont les patients à risque de développer une complication au cours de la chimiothérapie, et d'autre part, l'utilisation de la transplantation fécale, pour corriger l'altération dépistée du microbiote intestinal et empêcher la survenue de complications potentiellement graves.

A ce jour, l'équipe d'Eric Pamer (Sloan Kettering Institute, New York) a débuté un essai clinique appliquant le séquençage haut-débit du microbiote fécal et la transplantation fécale chez les patients recevant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques dans le cadre d'une hémopathie

dont le protocole a été présenté au cours du Cell Symposia on Intestinal Health (Lisbon, 2013). Les résultats sont attendus pour l'année 2015.

CONCLUSION

Au total, notre étude a permis de montrer qu'il existe des modifications du microbiote fécal au cours de la chimiothérapie et que des modifications spécifiques sont significativement associées à la survenue ultérieure d'une diarrhée post-chimiothérapie. Ainsi, il est possible de prédire la survenue d'une diarrhée, complication potentiellement grave de la chimiothérapie, par une analyse du microbiote fécal une semaine avant la survenue de la diarrhée.

Ces résultats permettent d'envisager la possibilité d'une modulation du microbiote intestinal en vue de prévenir la survenue de cet effet indésirable potentiellement grave.

Dans un contexte de développement exponentiel des plateformes de séquençage haut-débit, on peut s'attendre à ce que des analyses du microbiote intestinal « en temps réel » voient le jour dans les années à venir afin de guider la prise en charge des patients cancéreux dans le but de limiter les complications graves pouvant survenir au cours du traitement.

REFERENCES

1. Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2001) Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science* 292: 1115-8.
2. Holdeman, L.V., Good, I.J., Moore, W.E.C. (1976) Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl Environ Microbiol* 31:359-75.
3. Savage, D.C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Microbiol* 31:107-33.
4. Ley, R.E., Peterson, D.A., Gordon, J.I. (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124:837-48.
5. Yang, X., Xie, L., Li, Y., Wei, C. (2009) More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: estimating gene numbers inside a human body. *PLoS One* 4:e6074.
6. The Human Microbiome Project Consortium. (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-14
7. Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley, R.E. et al. (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480-4.
8. Hollister, E.B., Gao, C., Versalovic, J. (2014) Compositional and Functional Features of the Gastrointestinal Microbiome and Their Effects on Human Health. *Gastroenterol* 146:1449-5.
9. Zoetendal, E.G., Rajilic-Stojanovic, M., de Vos, W.M. (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 57:1605-15.
10. Stanghellini, V., Barbara, G., Cremon, C., Cogliandro, R., Antonucci, A., Gabusi, V., et al. (2010) Gut microbiota and related diseases: clinical features. *Intern Emerg Med* 5:57-63.
11. Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005) Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308:1635-8.
12. Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., Relman, D.A. (2007) An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449:811-8.
13. Sekirov, I., Russell S.L., Antunes L.C., Finlay B.B. (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90:859-904.
14. Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-69.
15. Peterson, D.A., Frank, D.N., Pace N.R., Gordon J.I. (2008) Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* 3:417-27.

16. http://fr.wikipedia.org/wiki/Classification_scientifique_des_esp%C3%A8ces
17. Edlund, C., Nord, C.E. (2000) Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother* 46:1-8.
18. Donskey, C.J., Hujer, A.M., Das, S.M., Pultz, N.J., Bonomo, R.A., Rice, L.B. (2003) Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J Microbiol Methods* 54:249-56.
19. Duncan, S.H., Lobley, G.E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A.M., Louis, P., et al. (2008) Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes* 32:1720-4.
20. Huys, G., Vanhoutte, T., Vandamme, P. (2008) Application of sequence-dependent electrophoresis fingerprinting in exploring biodiversity and population dynamics of human intestinal microbiota: what can be revealed? *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008:597-603.
21. de La Cochetiere, M.F., Montassier, E., Hardouin, J.B., Carton, T., Le Vacon, F., Durand, T., et al. (2010) Human intestinal microbiota gene risk factors for antibiotic-associated diarrhea: perspectives for prevention. *Risk factors for antibiotic-associated diarrhea. Microb Ecol* 59:830-7.
22. Domann, E., Hong, G., Imirzalioglu, C., Turschner, S., Kühle, J., Watzel, C., et al. (2003) Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 41:5500-10.
23. Barlaan, E.A., Sugimori, M., Furukawa, S., Takeuchi, K. (2005) Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods* 61:399-412.
24. Goldenberg, O., Herrmann, S., Marjoram, G., Noyer-Weidner, M., Hong, G., et al. (2007) Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *J Microbiol Methods* 68:94-105.
25. Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D., De Vos, W.M. (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64: 3854-9.
26. Manichanh, C., Varela, E., Martinez, C., Antolin, M., Llopis, M., Doré, J., et al. (2008) The gut microbiota predispose to the pathophysiology of acute postradiotherapy diarrhea. *Am J Gastroenterol* 103:1754-61.
27. Kalliomäki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., Isolauri, E. (2001). Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 107:129-34.
28. Harmsen, H. J., Raangs, G. C., He, T., Degener, J. E., Welling, G. W. (2002) Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68:2982-90.
29. Zwieler, J., Liszt, K., Handschur, M., Lassl, C., Lapin, A., Haslberger, A.G. (2009) Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal

population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly. *Exp Gerontol* 44:440-6.

30. Jung, R., Soondrum, K., Neumaier, M. (2000) Quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 38:833-6.
31. Bacchetti de Gregoris, T., Aldred, N., Clare, A.S., Burgess, J.G. (2011) Improvement of Phylum- and Class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods* 86: 351-6.
32. Blackwood, C.B., Oaks, A., Buyer, J.S. (2005) Phylum- and Class-Specific PCR Primers for General Microbial Community Analysis. *App Environ Microbiol* 71(10): 6193-8.
33. Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Dore, J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *App Environ Microbiol* 65: 4799-807.
34. Zhang, H., DiBaise, J.K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., et al. (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2365-70.
35. Gilbert, J.A., Field, D., Huang, Y., Edwards, R., Li, W., Gilna, P., et al. (2008) Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PLoS One* 3:e3042.
36. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-80.
37. Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363-70.
38. Morgan, X.C., and Huttenhower, C. (2012) Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol* 8:e1002808.
39. Lozupone, C.A., and Knight, R. (2008) Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev* 32:557-78.
40. Chazdon, R.L., Colwell, R.K., Denslow, J.S., Guariguata, M.R. (1998) Statistical methods for estimating species richness of woody regeneration in primary and secondary rain forests of NE Costa Rica. In: Comiskey FDaJA, ed. *Forest biodiversity research, monitoring and modeling: Conceptual background and Old World case studies*. Paris: Parthenon Publishing:285-309.
41. Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163:688.
42. Zuur, A.F., Leno, E.N., Smith, G.M. (2007) *Statistical for biology and health. Analysing Ecological Data*, Springer, New-York. ISBN 978-0-387-45972-1.
43. Lozupone, C., Hamady, M., Knight, R. (2006) UniFrac--an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics* 7:371.

44. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C. (2011) Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Gen Biol* 12:60.
45. Morgan, X.C, Tickle, T.L., Sokol, H. Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V., et al. (2012) Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Gen Biol* 13:79.
46. Maron, P.A., Ranjard, L., Mougel, C., Lemanceau, P. (2007) Metaproteomics: A New Approach for Studying Functional Microbial Ecology. *Microb Ecol* 53:486-93.
47. Lagier, J.C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C. et al. (2012) Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect* 18:1185-93.
48. Xu, J., Bjursell, M.K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L.K., Chiang, H.C. et al. (2003) A Genomic View of the Human-Bacteroides thetaiotaomicron Symbiosis. *Science* 299:2074-6.
49. Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R. (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13780-5.
50. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., et al. (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174-80.
51. Bik, E. M., Eckburg, P.B., Gill, S.R., Nelson, K.E., Purdom, E.A., Francois, F., et al. (2006) Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:732-7.
52. Coudeyras, S., and Forestier, C. (2010) Microbiota and probiotics: effects on human health. *Can J Microbiol* 56:611-50.
53. Cummings, J. H., Gibson, G.R., Macfarlane, G.T. (1989) Quantitative estimates fermentation in the hind gut of man. *Acta Vet Scand* 86:76-82.
54. Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6578-83.
55. Marteau, P., Pochart, P., Doré, J., Béra-Maillet, C., Bernalier, A., Corthier, G. (2001) Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*, 67:4939-42.
56. Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K. , Akkermans, A.D. , de Vos, W.M. (2002) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 68:3401-7.
57. Favier, C.F., Vaughan, E.E., De Vos, W.M., Akkermans, A.D. (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol* 68:219-26.

58. Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F.F., Snijders, B., Kummeling, I., et al. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118:511-21.
59. Perez, P.F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., et al. (2007) Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *Pediatrics* 119:724-32.
60. de Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., et al. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14691-6.
61. Woodmansey, E.J. (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 102:1178-86.
62. Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., et al. (2009) The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9: 123.
63. Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. (2005) Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 307:1915-20.
64. Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9:313-23.
65. Srikanth, C.V., and McCormick, B.A. (2008) Interactions of the intestinal epithelium with the pathogen and the indigenous microbiota: a three-way crosstalk. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008:626827.
66. Hill, M.J. (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 6:43-5.
67. Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Engelhardt, H., Bengmark, S., et al. (2007) Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 56:343-50.
68. Macpherson, A.J., Geuking, M.B., McCoy, K.D. (2005) Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunol* 115:153-62.
69. Macpherson, A.J., and Harris, N.L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4:478-85.
70. Chung, H., Pamp, S.J., Hill, J.A., Surana, N.K., Edelman, S.M., Troy, E.B., et al. (2012) Gut immune maturation depends on colonization with a host specific microbiota. *Cell* 149:1578-93.
71. Peterson, D.E., Bensadoun, R.J., Roila, F. (2011) Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 22:78-84.
72. Arnold, R.J., Gabrail, N., Rat, M., Kim, R., Sung, J.C., Zhou, Y. (2005) Clinical implications of chemotherapy induced diarrhea in patients with cancer. *J Support Oncol* 3:227-32.

73. Thorpe, D.W., Stringer, A.M., Gibson, R.J. (2013) Chemotherapy-induced mucositis: the role of the gastrointestinal microbiome and toll-like receptors. *Exp Biol Med* 238:1-6.
74. Crawford, P.A., Gordon, J.I. (2005) Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13254-9.
75. Garcia-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F., Crespo, E., Salas, A., Forcada, P., et al. (1997) Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol* 272:10-5.
76. Hakansson, A., Tormo-Badia, N., Baridi, A., Xu, J., Molin, G., Hagslätt, M.L., et al. (2014) Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice. *Clin Exp Med* [Epub ahead of print]
77. Verma, N., Verma, R., Kumari, R., Ranjha, R., Paul, J. (2014) Effect of salicin on gut inflammation and on selected groups of gut microbiota in dextran sodium sulfate induced mouse model of colitis. *Inflamm Res* 63:161-9.
78. Berry, D., Schwab, C., Milinovich, G., Reichert, J., Ben Mahfoudh, K., Decker, T., et al. (2012) Phylotype-level 16S rRNA analysis reveals new bacterial indicators of health state in acute murine colitis. *ISME J* 6:2091-106.
79. Sonis, S.T. (2004) The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 4:277-84.
80. van Vliet, M.J., Harmsen, H.J., de Bont, E.S., Tissing, W.J. (2010). The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced Mucositis. *PLoS Pathog* 6:1000879.
81. Touchefeu, Y., Montassier, E., Nieman, K., Gastinne, T., Potel, G., Bruley des Varannes, S., et al. (2014) The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis: current evidence and potential clinical applications. *Aliment Pharmacol Ther* In revision
82. Stringer, A.M. (2013) Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. *Nutr* 5:1488-99.
83. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229-41.
84. Cario, E. (2005) Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 54:1182-93.
85. Carneiro-Filho, B.A., Lima, I.P., Araujo, D.H., Cavalcante, M.C., Carvalho, G.H., Brito, G.A., et al. (2004) Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. *Dig Dis Sci* 49: 65-72.
86. Russo, F., Linsalata, M., Clemente, C., D'Attoma, B., Orlando, A., Campanella, G., et al. (2013) The effects of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC60) on the intestinal barrier function and gut peptides in breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer* 13:56.

87. Nejdfor, P., Ekelund, M., Westrom, B.R., Willen, R., Jeppsson, B. (2000) Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy. *Dis Colon Rectum* 43:1582-7.
88. Melichar, B., and Zezulova, M. (2011) The significance of altered gastrointestinal permeability in cancer patients. *Curr Opin Support Palliat Care* 5:47-54.
89. Keefe, D.M., Brealey, J., Goland, G.J., Cummins, A.G. (2000) Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. *Gut* 47:632-7.
90. Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Wells, J.M., Roy, N.C. (2011) Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J Nutr* 141:769-76.
91. Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., Chadee, K. (2007) The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:315-22.
92. Stringer, A.M., Gibson, R.J., Logan, R.M., Bowen, J.M., Yeoh, A.S., Hamilton, J., et al. (2009) Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Exp Biol Med* 234:430-41.
93. von Bultzingslowen, I., Adlerberth, I., Wold, A.E., Dahlen, G., Jontell, M. (2003) Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 18: 278-84.
94. Stringer, A.M., Gibson, R.J., Logan, R.M., Bowen, J.M., Yeoh, A.S., Burns, J., et al. (2007) Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. *Exp Biol Med* 232:96-106.
95. Stringer, A.M., Gibson, R.J., Logan, R.M., Bowen, J.M., Yeoh, A.S., Keefe, D.M. (2008) Faecal microflora and beta-glucuronidase expression are altered in an irinotecan-induced diarrhea model in rats. *Cancer Biol Ther* 7:1919-25.
96. Lin, X.B., Dieleman, L.A., Ketabi, A., Bibova, I., Sawyer, M.B., Xue, H., et al. (2012) Irinotecan (CPT-11) chemotherapy alters intestinal microbiota in tumour bearing rats. *PLoS One* 7:e39764.
97. Montassier, E., Batard, E., Gastinne, T., Potel, G., de La Cochetiere, M.F. (2013) Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32:841-50.
98. de La Cochetière, M.F., Durand, T., Lepage, P., Bourreille, A., Galmiche, J.P., Doré, J. (2005) Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *J Clin Microbiol* 43:5588-92.
99. Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., Gordon, J.I. (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11070-5.
100. Imaoka, A., Setoyama, H., Takagi, A., Matsumoto, S., Umesaki, Y. (2004) Improvement of human faecal flora-associated mouse model for evaluation of the functional foods. *J Appl Microbiol* 96:656-63.

101. van Vliet, M.J., Tissing, W.J., Dun, C.A., Meessen, N.E., Kamps, W.A., de Bont, E.S., et al. (2009) Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. *Clin Infect Dis* 49:262-70.
102. Zwielehner, J., Lassl, C., Hippe, B., Pointner, A., Switzeny, O.J., Remely, M., et al. (2011) Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting. *PLoS One* 6:e28654.
103. Common Terminology Criteria for Adverse Effects (CTCAE) v4.0. Available at: <http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>. Accessed October, 2013
104. Benson, A.B.3rd., Ajani, J.A., Catalano, R.B., Engelking, C., Kornblau, S.M., Martenson, J.A.Jr., et al. (2004) Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. *J Clin Oncol* 22:2918-26.
105. Keefe, D.M., Schubert, M.M., Elting, L.S., Sonis, S.T., Epstein, J.B., Raber-Durlacher, J.E., et al. (2007) Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 109: 820-31.
106. Falcone, A., Ricci, S., Brunetti, I., Pfanner, E., Allegrini, G., Barbara, C., et al. (2007) Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 25:1670-6.
107. Stringer, A.M., Gibson, R.J., Bowen, J.M., Logan, R.M., Ashton, K., Yeoh, A.S., et al. (2009). Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. *Int J Exp Pathol* 90:489-99.
108. Stringer, A.M., Al-Dasooqi, N., Bowen, J.M., Tan, T.H., Radzuan, M., Logan, R.M., et al. (2013) Biomarkers of chemotherapy-induced diarrhoea: a clinical study of intestinal microbiome alterations, inflammation and circulating matrix metalloproteinases. *Support Care Cancer* 21:1843-52.
109. <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>
110. http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book
111. Sharma, B.K. (2001) *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, 20th edition, GOEL Publishing House:54-83.
112. Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., et al. (2004) Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 70: 5628-43.
113. <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>
114. Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261-7.

115. Armougom, A.F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, C., Raoult, D. (2009) Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One* 4:e7125
116. Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., Engstrand, L. (2008) Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS One* 30:e2836
117. Falissard, B. (2005) *Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie*. Masson, Paris : 303-30.
118. <http://qiime.org/>
119. DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72:5069-72
120. Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-1.
121. <http://huttenhower.org/galaxy/>
122. Langille, M.G., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., et al. (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 31:814-21.
123. <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
124. Eloe-Fadrosh, E.A., Rasko, D.A. (2013) The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. *Annu Rev Med* 64:145-63.
125. Freestone, P.P., Walton, N.J., Haigh, R.D., Lyte, M. (2007) Influence of dietary catechols on the growth of enteropathogenic bacteria. *Int. J. Food Microbiol* 119: 159-69.
126. Knights, D., Costello, E.K., Knight, R. (2011) Supervised classification of human microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 35:343-59.
127. www.microbio.me/qiime/
128. Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K., Engstrand, L. (2010) Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One* 5:e9836.
129. Hill, D.A., Hoffmann, C., Abt, M.C., Du, Y., Kobuley, D., Kirn, T., et al (2010) Metagenomic Analyses Reveal Antibiotic-Induced Temporal and Spatial Changes in Intestinal Microbiota with Associated Alterations in Immune Cell Homeostasis. *Mucosal Immunol* 3: 148-58.
130. Cook, S.I., and Sellin, J.H. (1998) Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 12:499-507.

131. Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., Jenkins, D.J. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40:235-43.
132. Antharam, V.C., Li, E.C., Ishmael, A., Sharma, A., Mai, V., Rand, K.H., et al. (2013) Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. *J Clin Microbiol* 51:2884-92.
133. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I. (2006) An Obesity-Associated Gut Microbiome with Increased Capacity for Energy Harvest. *Nature* 444:1027-31.
134. Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., et al. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15718-23.
135. Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.J., et al. (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* Is an Anti- Inflammatory Commensal Bacterium Identified by Gut Microbiota Analysis of Crohn Disease Patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16731-6.
136. Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., et al. (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55:205-11.
137. Liu, C.Y., Song, Y., McTeague, M., Vu, A.W., Wexler, H., Finegold, S.M. (2003) Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* 222:9-16.
138. Goldstein, E.J. (1996) Anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis* 23:97-101
139. Wexler, H.M., (2007) *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* 20:593-621.
140. Rabizadeh, S., Rhee, K.J., Wu, S., Huso, D., Gan, C.M., Golub, J.E., et al. (2007) Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis. *Inflamm Bowel Dis* 13: 1475-83.
141. Jiang, Z.D., Dupont, H.L., Brown, E.L., Nandy, R.K., Ramamurthy, T., Sinha, A., et al. (2010) Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *J Clin Microbiol* 48:1417-9.
142. Sears, C.L., Islam, S., Saha, A., Arjumand, M., Alam, N.H., Faruque, A.S., et al. (2008) Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. *Clin Infect Dis* 47:797-803.
143. Sack, R.B., Albert, M.J., Alam, K., Neogi, P.K., Akbar, M.S. (1994) Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi children with diarrhea: a controlled study. *J Clin Microbiol* 32:960-3.

144. Cohen, S.H., Shetab, R., Tang-Feldman, Y.J., Sarma, P., Silva, J. Jr., Prindiville, T.P. (2006) Prevalence of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in hospital-acquired diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 55:251-4.
145. Klastersky, J. (2004) Management of fever in neutropenic patients with different risks of complications. *Clin Infect Dis* 39:32-7.
146. Freifeld, A.G., Bow, E.J., Sepkowitz, K.A., Boeckh, M.J., Ito, J.I., Mullen, C.A., et al. (2011) Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 52: 427-31.
147. Irfan, S., Idrees, F., Mehraj, V., Habib, F., Adil, S., Hasan, R. (2008) Emergence of Carbapenem resistant Gram negative and vancomycin resistant Gram positive organisms in bacteremic isolates of febrile neutropenic patients: a descriptive study. *BMC Infect Dis* 8:807.
148. Cattaneo, C., Antoniazzi, F., Casari, S., Ravizzola, G., Gelmi, M., Pagani, C., et al. (2012) *P. aeruginosa* bloodstream infections among hematological patients: an old or new question? *Ann Hematol* 91:1299-304.
149. Kjellander, C., Björkholm, M., Cherif, H., Kalin, M., Giske, C.G. (2012) Hematological: low all-cause mortality and low occurrence of antimicrobial resistance in hematological patients with bacteremia receiving no antibacterial prophylaxis: a single-center study. *Eur J Haematol* 88:422-30.
150. Chong, Y., Yakushiji, H., Ito, Y., Kamimura, T. (2011) Clinical impact of fluoroquinolone prophylaxis in neutropenic patients with hematological malignancies. *Int J Infect Dis* 15:277-81
151. Kang, C.I., Song, J.H., Chung, D.R., Peck, K.R., Yeom, J.S., Son, J.S., et al. (2012) Bloodstream infections in adult patients with cancer: clinical features and pathogenic significance of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Support Care Cancer* 20:2371-8.
152. Gudiol, C., Bodro, M., Simonetti, A., Tubau, F., González-Barca, E., Cisnal, M., et al. (2013) Changing aetiology, clinical features, antimicrobial resistance, and outcomes of bloodstream infection in neutropenic cancer patients. *Clin Microbiol Infect* 19:474-9.
153. Ramphal, R. (2004) Changes in the etiology of bacteremia in febrile neutropenic patients and the susceptibilities of the currently isolated pathogens. *Clin Infect Dis* 39:25-31.
154. Klastersky, J., Ameye, L., Maertens, J., Georgala, A., Muanza, F., Aoun, M., et al. (2007) Bacteraemia in febrile neutropenic cancer patients. *Int J Antimicrob Agents* 30:51-9.
155. Cruciani, M., Rampazzo, R., Malena, M., Lazzarini, L., Todeschini, G., Messori, A., et al. (1996) Prophylaxis with fluoroquinolones for bacterial infections in neutropenic patients: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 23:795-805.
156. Bow, E.J. (2011) Fluoroquinolones, antimicrobial resistance and neutropenic cancer patients. *Curr Opin Infect Dis* 24:545-53

157. CLSI (2008) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S18. Enterobacteriaceae M7MIC. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, pp 98-101.
158. Saito, T., Yoshioka, S., Inuma, Y., Takakura, S., Fujihara, N., Ichinohe, T., et al. (2008) Effects on spectrum and susceptibility patterns of isolates causing bloodstream infection by restriction of fluoroquinolone prophylaxis in a hematology–oncology unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:209-16.
159. Saghir, S., Faiz, M., Saleem, M., Younus, A., Aziz, H. (2009) Characterization and anti-microbial susceptibility of Gram-negative bacteria isolated from bloodstream infections of cancer patients on chemotherapy in Pakistan. *Indian J Med Microbiol* 27:341-7.
160. Bhusal, Y., Mihu, C.N., Tarrand, J.J., Rolston, K.V. (2011) Incidence of fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* at a comprehensive cancer center in the United States. *Chemother* 57:335-8.
161. Gudiol, C., Tubau, F., Calatayud, L., Garcia-Vidal, C., Císnal, M., Sánchez-Ortega, I., et al. (2011) Bacteraemia due to multidrug-resistant Gram-negative bacilli in cancer patients: risk factors, antibiotic therapy and outcomes. *J Antimicrob Chemother* 66:657-63.
162. Richard, P., Delangi, M.H., Raffi, F., Espaze, E., Richet, H. (2001) Impact of fluoroquinolone administration on the emergence of fluoroquinolone-resistant, gram-negative bacilli from gastrointestinal flora. *Clin Infect Dis* 32:162-6.
163. Cheong, H.J., Yoo, C.W., Sohn, J.W., Kim, W.J., Kim, M.J., Park, S.C. (2001) Bacteremia due to quinolone-resistant *Escherichia coli* in a teaching hospital in South Korea. *Clin Infect Dis* 33:48-53.
164. Batard, E., Ollivier, F., Boutoille, D., Hardouin, J.B., Montassier, E., Caillon, J., et al. (2013) Relationship between hospital antibiotic use and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Int J Infect Dis* 17:254-8.
165. Wisplinghoff, H., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B. (2003) Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis* 36:1103-10.
166. Zinner, S.H. (1999) Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer: emphasis on gram-positive and resistant bacteria. *Clin Infect Dis* 29:490-4.
167. Ghosh, I., Raina, V., Kumar, L., Sharma, A., Bakhshi, S., Thulkar, S., et al. (2012) Profile of infections and outcome in high-risk febrile neutropenia: experience from a tertiary care cancer center in India. *Med Oncol* 29: 1354-60.
168. Taur, Y., Xavier, J.B., Lipuma, L., Ubeda, C., Goldberg, J., Gouborne, A., et al. (2012) Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 55:905-14.
169. Ubeda, C., Bucci, V., Caballero, S., Djukovic, A., Toussaint, N.C., Equinda, M., et al. (2013) Intestinal microbiota containing *Barnesiella* species cures vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization. *Infect Immun* 81:965-73.

170. Schimpff, S.C., Young, V.M., Greene, W.H., Vermeulen, G.D., Moody, M.R., Wiernik, P.H. (1972) Origin of infection in acute nonlymphocytic leukemia. Significance of hospital acquisition of potential pathogens. *Ann Intern Med* 77:707-14.
171. Sokol, H., Seksik, P., Furet, J.P., Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., et al. (2009) Low Counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in Colitis Microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 15:1183-9.
172. He, F., Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Hosoda, M., Benno, Y., Salminen, S. (2001) Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Curr Microbiol* 43: 351-4.
173. Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Salminen, S.J. (1999) Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiol Lett* 172:61-4.
174. Veiga, P., Gallini, C.A., Beal, C., Michaud, M., Delaney, M.L., DuBois, A., et al. (2010) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18132-7
175. Wada, M., Nagata, S., Saito, M., Shimizu, T., Yamashiro, Y., Matsuki, T., et al. (2010) Effects of the enteral administration of *Bifidobacterium breve* on patients undergoing chemotherapy for pediatric malignancies. *Support Care Cancer* 18: 751-9.
176. Chitapanarux, I., Chitapanarux, T., Traisathit, P., Kudumpee, S., Tharavichitkul, E., Lorvidhaya, V. (2010) Randomized controlled trial of live *Lactobacillus acidophilus* plus *bifidobacterium bifidum* in prophylaxis of diarrhea during radiotherapy in cervical cancer patients. *Radiat Oncol* 5:31.
177. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (October 2001)
178. Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17:259-75.
179. Hungin, A.P., Mulligan, C., Pot, B., Whorwell, P., Agréus, L., Fracasso, P., et al. (2013) Systematic review: probiotics in the management of lower gastrointestinal symptoms in clinical practice - an evidence-based international guide. *Aliment Pharmacol Ther* 38:864-86.
180. Whelan, K., and Quigley, E.M. (2013) Probiotics in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 29:184-9.
181. Vanderpool, C., Yan, F., Polk, D.B. (2008) Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 14:1585-96.
182. Seth, A., Yan, F., Polk, D.B., Rao, R.K. (2008) Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:1060-9.

183. Dai, C., Zhao, D.H., Jiang, M. (2012) VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier in vivo and in vitro via the p38 and ERK signaling pathways. *Int J Mol Med* 29:202-8.
184. Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., et al. (2009) Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:1140-9.
185. Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Whitehead, R., Washington, M.K., Polk, D.B. (2007) Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterol* 132:562-75.
186. Yan, F., and Polk, D.B. (2012) Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. *Gut microbes* 3:25-8.
187. Zakostelska, Z., Kverka, M., Klimesova, K., Rossmann, P., Mrazek, J., Kopecny, J., et al. (2011) Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One* 6: e27961.
188. Bowen, J.M., Stringer, A.M., Gibson, R.J., Yeoh, A.S., Hannam, S., Keefe, D.M. (2007) VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. *Cancer Biol Ther* 6: 1449-54.
189. Tooley, K.L., Howarth, G.S., Lymn, K.A., Lawrence, A., Butler, R.N. (2006) Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* diminishes severity of small intestinal mucositis in methotrexate treated rats. *Cancer Biol Ther* 5:593-600.
190. Tooley, K.L., Howarth, G.S., Lymn, K.A., Lawrence, A., Butler, R.N. (2011) Oral ingestion of *Streptococcus thermophilus* does not affect mucositis severity or tumor progression in the tumor-bearing rat. *Cancer Biol Ther* 12:131-8.
191. Smith, C.L., Geier, M.S., Yazbeck, R., Torres, D.M., Butler, R.N., Howarth, G.S. (2008) *Lactobacillus fermentum* BR11 and fructo-oligosaccharide partially reduce jejunal inflammation in a model of intestinal mucositis in rats. *Nutr Cancer* 60:757-67.
192. Osterlund, P., Ruotsalainen, T., Korpela, R., Saxelin, M., Ollus, A., Valta, P., et al. (2007) *Lactobacillus* supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. *Br J Cancer* 97:1028-34.
193. Whelan, K., and Myers, C.E. (2011) Safety of probiotics in patients receiving nutritional support: a systematic review of case reports, randomized controlled trials, and nonrandomized trials. *Am J Clin Nutr* 91:687-703.
194. Salminen, E., Elomaa, I., Minkkinen, J., Vapaatalo, H., Salminen, S. (1988) Preservation of intestinal integrity during radiotherapy using live *Lactobacillus acidophilus* cultures. *Clin Radiol* 39:435-7.

195. Urbancsek, H., Kazar., T, Mezes, I., Neumann, K. (2001) Results of a double-blind, randomized study to evaluate the efficacy and safety of Antibiophilus in patients with radiation-induced diarrhoea. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:391-6.
196. Delia, P., Sansotta, G., Donato, V., Frosina, P., Messina, G., De Renzis, C., et al. (2007) Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. *World J Gastroenterol* 13:912-5.
197. Giralt, J., Regadera, J.P., Verges, R., Romero, J., de la Fuente, I., Biete, A., et al. (2008) Effects of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 in prevention of radiation-induced diarrhea: results from multicenter, randomized, placebo-controlled nutritional trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71:1213-9.
198. Ciorba, M.A., Riehl, T.E., Rao, M.S., Moon, C., Ee, X., Nava, G.M., et al. (2012) *Lactobacillus* probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclooxygenase-2-dependent manner. *Gut* 61:829-38
199. Bakken, J.S., Borody, T., Brandt, L.J., Brill, J.V., Demarco, D.C., Franzos, M.A., et al. (2011) Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9:1044-9.
200. Shahinas, D., Silverman, M., Sittler, T., Chiu, C., Kim, P., Allen-Vercoe, E., et al. (2012) Toward an understanding of changes in diversity associated with fecal microbiome transplantation based on 16S rRNA gene deep sequencing. *MBio* 3:e00338-12
201. Hamilton, M.J., Weingarden, A.R., Unno, T., Khoruts, A., Sadowsky, M.J. (2013) High-throughput DNA sequence analysis reveals stable engraftment of gut microbiota following transplantation of previously frozen fecal bacteria. *Gut Microbes* 4:125-35.
202. Weingarden, A.R., Hamilton, M.J., Sadowsky, M.J., Khoruts, A. (2013) Resolution of severe *Clostridium difficile* infection following sequential fecal microbiota transplantation. *J Clin Gastroenterol* 47:735-7.
203. van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M., et al. (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 368:407-15.
204. Song, Y., Garg, S., Girotra, M., Maddox, C., von Rosenvinge, E.C., Dutta, A., et al. (2013) Microbiota dynamics in patients treated with fecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection. *PLoS One* 26:e81330.

RESUME

La diarrhée post-chimiothérapie est un effet secondaire fréquent en cancérologie. Elle peut mettre en jeu le pronostic vital. Cependant, la physiopathologie de la diarrhée post-chimiothérapie est à ce jour mal connue et l'impact du microbiote intestinal dans la survenue de la diarrhée n'est pas rapporté à ce jour. L'objectif de notre travail était de décrire les modifications du microbiote fécal survenant au cours de la chimiothérapie et de rechercher des caractéristiques du microbiote fécal prédisposant à la survenue d'une diarrhée. Nous avons inclus 36 patients ayant un lymphome non-hodgkinien et recevant une même chimiothérapie de conditionnement. La flore fécale a été analysée par pyroséquençage. Les séquences ont été analysées avec QIIME. Douze (33%) patients ont développé une diarrhée sévère, dans un délai médian de 13 jours. Nos résultats montrent qu'il y a une diminution de l'alpha-diversité au cours de la chimiothérapie, et que cette diminution est encore plus marquée chez les patients ayant une diarrhée sévère. L'analyse de la bêta-diversité sépare en 3 groupes distincts les échantillons collectés avant la chimiothérapie, les échantillons collectés après la chimiothérapie des patients n'ayant pas de diarrhée sévère et les échantillons collectés après la chimiothérapie des patients ayant une diarrhée sévère ($p < 0,001$). L'analyse discriminante linéaire rapporte que le genre *Bacteroides* est significativement associé à la survenue d'une diarrhée post-chimiothérapie sévère alors que les genres *Escherichia*, *Atobopium*, *Oribacterium*, *Anaerococcus*, *Blautia*, *Mogibacterium*, *Bifidobacterium* sont significativement associés à l'absence de survenue d'une diarrhée. Notre étude a permis de faire un inventaire complet des modifications du microbiote fécal survenant au cours de la chimiothérapie et a montré qu'il est possible de prédire la survenue d'une diarrhée sévère par l'analyse d'un prélèvement de selles collecté en médiane 6 jours plus tôt.