

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2015

N° 051

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Gastroentérologie et Hépatologie

par

Lucille Quénéhervé

né(e) le 21/01/1986

Présentée et soutenue publiquement le 19/06/2015

Le syndrome de l'intestin irritable, une pathologie de la glie entérique ?

Président : Monsieur le Professeur Stanislas BRULEY des VARANNES

Directeur de thèse : Professeur Emmanuel CORON

ABREVIATIONS

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

BEI : Barrière épithéliale intestinale

CGE : Cellule gliale entérique

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HRP : Peroxydase de raifort

PAR : Proteinase activated receptor

RIPA buffer : Radio-immunoprecipitation assay buffer

SII : Syndrome de l'intestin irritable

C-SII : *SII à prédominance de constipation*

D-SII : *SII à prédominance de diarrhée*

M-SII : *SII mixte*

SNE : Système nerveux entérique

TNF : Tumor necrosis factor

ZO : Zona occludens

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	4
Syndrome de l'intestin irritable : définition, épidémiologie	4
Physiopathologie du syndrome de l'intestin irritable.....	4
Objectifs	6
MATERIELS et METHODES	7
1) Patients.....	7
2) Mesure de la perméabilité en chambre d'Ussing.....	7
3) Expression des protéines gliales par Western blot.....	8
4) Production de surnageants de biopsies.....	8
5) Culture cellulaire.....	9
6) Mesure du flux calcique.....	9
7) Etude pharmacologique	9
8) Statistiques	10
RESULTATS	11
A. Données cliniques.....	11
B. Caractérisation des fonctions de la barrière épithéliale intestinale et des cellules gliales entériques <i>ex vivo</i>	11
1) Etude de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire	11
2) Etude des marqueurs gliaux	12
C. Etude des effets du surnageant de biopsies sur le phénotype et les fonctions des cellules gliales entériques <i>in vitro</i>	12
1) Effet du surnageant sur les marqueurs gliaux des cellules gliales entériques de rat. 12	
2) Effet du surnageant sur le flux calcique intra-cellulaire des cellules gliales entériques de rat	12
3) Effet du surnageant sur l'expression de la connexine-43 dans les cellules gliales entériques de rat	13
4) Etude du flux calcique intra-cellulaire des cellules gliales entériques mises en culture avec de l'histamine, de la sérotonine, du SLIGRL	13
DISCUSSION	14
BIBLIOGRAPHIE	18
ANNEXE : Questionnaire	31

INTRODUCTION

Syndrome de l'intestin irritable : définition, épidémiologie

Le syndrome de l'intestin irritable (SII), encore appelé colopathie fonctionnelle, est une pathologie fonctionnelle du tube digestif qui se définit par la coexistence de douleurs abdominales chroniques et de troubles du transit (constipation, diarrhée, alternance des deux) qui se majorent lors des poussées douloureuses. Le **questionnaire de Rome III** élaboré en 2006 propose des critères diagnostiques, uniquement cliniques, pour le SII (Drossman, 2006). On définit plusieurs sous-groupes de SII en fonction du trouble du transit prédominant (C-SII pour *SII à prédominance de constipation*, D-SII pour *SII à prédominance de diarrhée*, M-SII pour *SII mixte* et U-SII pour *SII indéterminé*).

Bien que de larges variations entre les pays semblent exister, la **prévalence mondiale est de 11,2%** (IC 95%, 9.8%–12.8%), (Lovell and Ford, 2012). Le poids économique de cette pathologie est donc très important, générant des coûts directs et indirects de l'ordre de 30 milliards de dollars par an aux USA (Dapoigny, 2009; Hulisz, 2004). Une meilleure compréhension de la physiopathologie du SII est donc nécessaire dans le but de développer de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques.

Physiopathologie du syndrome de l'intestin irritable

Bien que le SII reste souvent considéré comme une pathologie psychosomatique sans substrat organique, les progrès récents de la recherche ont permis de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques de cette maladie chronique, associant des facteurs génétiques de susceptibilité et des facteurs environnementaux.

La barrière épithéliale intestinale, monocouche de cellules épithéliales intestinales favorisant le passage des nutriments et prévenant le passage des pathogènes, joue probablement un rôle central dans la physiopathologie du SII (Rescigno, 2011). En effet dans le SII des altérations de ses fonctions ont été observées telles qu'une **augmentation de la perméabilité** paracellulaire et transcellulaire (Dunlop et al., 2006; Piche et al., 2009; Spiller et al., 2000; Zhou et al., 2009). De manière intéressante, il a été montré une corrélation positive entre l'augmentation de la perméabilité paracellulaire et les scores de douleur viscérale. Ces effets

sont médiés par les protéines des jonctions serrées telles que ZO-1, dont une diminution de l'expression a été décrite dans les biopsies coliques de patients SII (Bertiaux-Vandaële et al., 2011).

De plus l'existence d'une **microinflammation digestive** a été mise en évidence au cours du SII avec par exemple une augmentation du nombre de mastocytes dans la muqueuse des patients SII ou la présence de cytokines pro-inflammatoires dans les surnageants de biopsies coliques (Barbara et al., 2004; Macsharry et al., 2008).

De manière intéressante des études récentes ont montré la capacité du surnageant de biopsies coliques à reproduire sur différents systèmes « sains » les modifications observées au cours du SII. Ainsi, la perfusion intra colique de surnageant de biopsies de SII chez la souris augmente la réponse nociceptive à la distension colique, inhibée par les inhibiteurs de protéases (Cenac et al., 2007). De plus, le surnageant de biopsies de SII est capable d'induire une diminution de la résistance transcellulaire de cellules épithéliales intestinales en culture ou encore d'activer des neurones du système nerveux entérique, cet effet étant aboli par des inhibiteurs de la sérotonine, de l'histamine ou des récepteurs PAR-2 (Piche et al., 2009; Buhner et al., 2009). Dans le surnageant, le rôle de l'histamine, de la sérotonine et des protéases, en particulier via les récepteurs activés par les protéases de type 2 (PAR-2) qui peuvent être activés par le peptide SLIGRL, a ainsi été suggéré.

Le système nerveux entérique (SNE), contrôlant les principales fonctions du tube digestif, est constitué de deux types cellulaires principaux : les neurones et les cellules gliales entériques (CGE). Peu de données sont disponibles quant au rôle des CGE en pathologie humaine et notamment dans le SII. Cependant ces cellules sont susceptibles de jouer un rôle central sur la BEI et la microinflammation digestive pour plusieurs raisons. Tout d'abord les CGE sont 3 à 10 fois plus nombreuses que les neurones entériques et, à l'instar des astrocytes du système nerveux central, jouent un rôle dans la survie et la protection des neurones entériques ainsi que dans la régulation des neuromédiateurs (De Giorgio et al., 2012). Les CGE expriment les mêmes marqueurs que les astrocytes du système nerveux central tels que GFAP ou S100 β dont l'expression peut être modifiée en condition inflammatoire (von Boyen., 2004). D'autre part, les CGE sont capables de moduler les fonctions de la BEI telles que la perméabilité paracellulaire, la prolifération et la cicatrisation (Neunlist et al., 2012). Enfin, la délétion des CGE dans des modèles animaux transgéniques conduit à une rupture sévère de l'intégrité de la BEI et à une dysfonction de la motricité digestive (Aubé et al., 2006; Cornet et al., 2001; Savidge et al., 2007).

Les neurones entériques, les cellules gliales entériques et les cellules épithéliales digestives forment un réseau dense au niveau de la muqueuse digestive et interagissent fortement formant une véritable **unité neuro-glio-épithéliale** fonctionnelle. Par exemple l'activation des CGE par les neurones via la sécrétion d'acétylcholine semble augmenter la capacité des CGE à renforcer la BEI (Costantini et al., 2012). D'autres neuromédiateurs sont aussi capables de modifier les propriétés fonctionnelles des CGE, tels que l'ATP, capable d'induire des modifications de la concentration intracellulaire de calcium dans les CGE via les récepteurs P2Y1/4 et ainsi de favoriser la propagation d'ondes calciques entre les CGE (Gulbransen and Sharkey, 2009; Zhang et al., 2003). Cet effet est probablement médié par des hémicanaux connexine-43, comme le suggère une récente étude chez la souris (McClain et al., 2014). Cependant le rôle exact des CGE sur les fonctions de la BEI ainsi que les médiateurs potentiels de ces effets dans le SII sont inconnus chez l'homme, conséquence du manque de techniques mini-invasives capables d'étudier le SNE et ses composants.

Objectifs

Le but de cette étude était de mettre en évidence l'existence d'une atteinte des CGE dans le SII et d'en caractériser les mécanismes. Ce travail était organisé en trois parties principales. D'une part, il visait à développer une biocollection de biopsies coliques et de surnageants de ces biopsies provenant de patients SII et témoins. D'autre part, il cherchait à caractériser les altérations de la BEI et les modifications du phénotype des CGE dans les biopsies coliques de la biocollection. Dans une dernière partie, ce projet visait à déterminer la capacité du surnageant des biopsies à modifier le phénotype et les fonctions des CGE et à identifier les médiateurs responsables des effets observés.

MATERIELS et METHODES

1) Patients

Les patients SII et les témoins étaient recrutés dans le cadre de consultations à l'Institut des Maladies de l'Appareil Digestif du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes. Les biopsies étaient réalisées au cours d'une coloscopie sous anesthésie générale pour des symptômes digestifs ou dans le cadre du dépistage du cancer colorectal. Après avoir donné leur consentement, les patients remplissaient en présence d'un clinicien un questionnaire, dont les différents items étaient ceux du questionnaire de Rome III (Annexe 1). La sévérité et la fréquence des symptômes douleur et ballonnement étaient cotées de 0 à 4 selon une version modifiée du Bowel Disease Questionnaire (BDQ) (Piche., 2009; Barbara., 2004). Les données cliniques étaient colligées dans une base de données électronique (Integralis, IDBC). Douze biopsies étaient prélevées avec une pince à biopsie sans dard dans le côlon gauche, entre 30 et 40 cm de la marge anale. Une fois les biopsies prélevées, elles étaient placées dans du sérum physiologique à température ambiante puis immédiatement transférées au laboratoire pour différentes analyses.

2) Mesure de la perméabilité en chambre d'Ussing

Trois biopsies étaient montées en chambre d'Ussing (*Transcellab*; TBC, Paris) pour mesurer le flux d'acide sulfonique, reflétant la perméabilité paracellulaire, et mesurer le flux de peroxydase de raifort (HRP), reflétant la perméabilité transcellulaire. Elles étaient placées dans du DMEM-F12. Après équilibration pendant 30 minutes, 275 μ L de milieu au niveau du pôle apical de la biopsie était remplacé par 200 μ L de fluorescéine-5,6-acide sulfonique (1mg/ml) (400D ; *Invitrogen*) et 75 μ L d'HRP (10mg/ml) (*Sigma*). Toutes les 30 minutes pendant 3 heures on prélevait 150 μ L de milieu du côté basolatéral pour mesurer la concentration en acide sulfonique au fluorimètre (*Varioscan*). La variable observée était la moyenne des pentes des droites obtenues. Des échantillons de 40 μ L de milieu étaient également prélevés puis conservés à -80° afin de mesurer ultérieurement la concentration en HRP au fluorimètre au cours du temps par rapport à une gamme connue.

3) Expression des protéines gliales par Western blot

Quatre biopsies étaient conservées dans du tampon RIPA (Radio-immunoprecipitation assay) et congelées à -80° après broyage. Après extraction, les protéines étaient quantifiées par dosage colorimétrique.

Les CGE cultivées avec du surnageant de biopsies ou différentes drogues étaient récupérées dans du tampon RA1 afin de permettre l'extraction des protéines. Ces dernières n'étaient pas quantifiables du fait d'une trop faible concentration.

La solution contenant les protéines des biopsies ou des CGE était ensuite chargée sur un gel de Novex 4-12% Bis Tris 1mm (*Invitrogen*) avec le marqueur de poids moléculaire. La migration était interrompue lorsque le front de migration approchait le bord inférieur du gel. Les protéines étaient alors transférées du gel vers la membrane.

Après bain d'acide acétique et de tampon bloquant, la membrane était incubée avec les dilutions appropriées d'anticorps primaire dans une solution de tampon pendant une nuit à 4°C. Après blocage, la membrane était incubée avec une dilution d'anticorps secondaire marqué dans du tampon bloquant à température ambiante pendant 1 heure.

Les anticorps testés étaient les anti-GFAP (1/2000^e, rabbit, *Dako*), anti-S100β (1/500^e, rabbit, *Dako*), anti-GAPDH (1/500, mouse, *Santa Cruz*) et anti-connexine-43 (1/500, rabbit, *Abcam*). L'analyse des membranes était réalisée grâce au logiciel *ImageLab*.

Les résultats étaient rapportés à l'expression du gène de ménage GAPDH puis normalisés sur la moyenne des témoins.

4) Production de surnageants de biopsies

Quatre biopsies étaient rapidement placées dans des tubes contenant 1mL de solution de Krebs Hepes à 37° pendant 25 minutes. Le surnageant était ensuite filtré avant d'être congelé à -80° en aliquots de 300μL. Les biopsies étaient prélevées et pesées.

Pour les expériences de culture cellulaire, le surnageant aliquoté dans des tubes était décongelé sur glace puis chauffé au bain marie avant d'être ajouté dans les puits.

5) Culture cellulaire

Les cellules gliales entériques embryonnaires de rat (lignée JUG2 *Inserm U913*) étaient issues d'une culture primaire d'intestins d'embryons de rats. Elles étaient cultivées en boîtes de 25cm² dans du milieu de culture DMEM Glutamax.

Pour l'expérience de flux calcique les cellules étaientensemencées à une densité de 4000 cellules/puits en plaque 96 puits, chaque puits contenant 200µL de milieu de culture. L'incubation avec du surnageant ou des drogues était réalisée à J1 et J2 à raison de 10% du puits de culture soit 20µL.

Pour l'expérience de recueil des cellules dans du tampon RA1 pour le Western blot, les cellules étaientensemencées à une densité de 30000 cellules/puits en plaque 96 puits contenant 100µL de milieu de culture. L'incubation avec du surnageant ou des drogues était réalisée à J1 et J2 à raison de 10% du puits de culture soit 10µL.

6) Mesure du flux calcique

Après lavage, les cultures de CGE étaient incubées avec du Fluo-4 AM (0,5µM) (*Invitrogen*) pendant 1 heure à 37°C dans du milieu HBSS. Le Fluo-4 AM est un fluorophore qui interagit avec le calcium cytosolique L'intensité de fluorescence des cellules du champ observé varie en fonction de la concentration de calcium dans le cytosol.

Un microscope à fluorescence inversé (Olympus IX 50) et une caméra digitale (Olympus DP 50) étaient utilisés pour des acquisitions de 120secondes/puits qui débutaient juste avant l'ajout d'ATP (2mM). La variation d'amplitude maximale comparée à la valeur maximale de la réponse calcique à l'ATP était caractérisée grâce au logiciel *ImageJ*.

Le contrôle interne était réalisé grâce à un puits non traité.

7) Etude pharmacologique

Toutes les drogues étaient diluées et reconstituées dans du milieu de culture. Le SLIGRL, un agoniste des récepteurs PAR-2 (*Biochem*) était utilisé aux concentrations finales de 10⁻¹ M à 10⁻¹¹ M. L'histamine (*Sigma*) était utilisée aux concentrations finales de 10⁻⁴, 10⁻⁶ et 10⁻⁸M. La sérotonine (*Sigma*) était utilisée aux concentrations finales de 10⁻⁴, 10⁻⁶ et 10⁻⁸M.

8) Statistiques

Un t-test ou un test de Kruskal-Wallis (ANOVA non paramétrique) complété par un post test de Dunn était réalisé pour chacune des variables quantitatives. Pour les variables qualitatives un test exact de Fisher était réalisé. La différence était considérée significative lorsque la p-value était inférieure à 0,05. Afin d'analyser la relation entre 2 variables quantitatives, nous avons calculé les coefficients de corrélation, le test statistique utilisé était le test de coefficient de corrélation de Pearson.

RESULTATS

A. Données cliniques

De décembre 2013 à septembre 2014, 25 patients SII dont 7 C-SII, 8 D-SII et 10 M-SII ainsi que 14 témoins ont été inclus et ont eu une coloscopie. La moyenne d'âge des patients SII et des témoins était respectivement de 51,2 ans et de 41,4 ans ($p=0,05$). Les patients inclus étaient des femmes à 62%, sans différence entre les groupes ($p=0,40$). Les caractéristiques cliniques des patients en fonction de leur sous-type sont décrites dans le tableau I. Alors que davantage de patients avaient un syndrome dépressif dans le sous-type M-SII (50%) par rapport au groupe témoin (0%) ($p=0,04$), il n'y avait pas de différence entre les différents sous-types de SII. Sur le plan des symptômes, les patients SII rapportaient une intensité et une fréquence des douleurs abdominales plus importantes que les témoins, sans différence entre les sous-types de SII. Les ballonnements étaient significativement plus intenses chez les C-SII et les D-SII que chez les témoins, et leur fréquence était significativement plus importante dans tous les sous-types.

B. Caractérisation des fonctions de la barrière épithéliale intestinale et des cellules gliales entériques *ex vivo*

1) Etude de la perméabilité paracellulaire et transcellulaire

La perméabilité paracellulaire dans les biopsies coliques à 180 minutes n'était pas significativement différente entre les patients SII et les témoins (Figure 1A) ($p=0,73$). De plus il n'y avait pas de différence entre les sous-types de SII (Figure 1B) ($p=0,60$). De même, le flux d'HRP n'était pas différent entre les patients SII et les témoins (Figure 1 C) ($p=0,35$) ni entre les différents sous-groupes de SII (Figure 1 D) ($p=0,23$). Il existait une corrélation positive entre la perméabilité paracellulaire et transcellulaire ($p=0,02$; $r=0,56$).

2) Etude des marqueurs gliaux

Cette partie visait à caractériser l'expression de marqueurs gliaux-clés (GFAP, S100 β) dans les biopsies coliques par Western Blot. GAPDH a été choisi comme gène de ménage de référence car son expression était homogène dans les biopsies et les CGE de culture. L'expression de GFAP n'était pas différente entre les sous-types de SII et les témoins (Figure 2A) ($p=0,53$). L'expression de S100 β n'était pas non plus différente entre les sous-types de SII et les témoins (Figure 2B) ($p=0,52$).

C. Etude des effets du surnageant de biopsies sur le phénotype et les fonctions des cellules gliales entériques *in vitro*

1) Effet du surnageant sur les marqueurs gliaux des cellules gliales entériques de rat

Cette partie du projet visait à déterminer la capacité de facteurs solubles sécrétés par les biopsies à induire des modifications du phénotype et de la fonction des CGE de culture. L'expression des marqueurs gliaux GFAP et S100 β mesurée par Western Blot n'était pas différente entre les CGE mises en culture avec les surnageants de patients de chacun des sous-types de SII et chez les témoins (Figure 3) (respectivement $p=0,60$ et $p=0,35$). L'expression des marqueurs gliaux GFAP et S100 β était corrélée positivement ($r^2=0,91$; $p<0,001$).

2) Effet du surnageant sur le flux calcique intra-cellulaire des cellules gliales entériques de rat

Les CGE cultivées pendant 48h avec du surnageant de patients SII avaient une amplitude de flux calcique en réponse à l'ATP diminuée de manière significative par rapport aux CGE cultivées avec le surnageant de témoins. Cette différence était significative dans chaque sous-type de patients (Figure 4). Ainsi les cellules mises en culture avec du surnageant de témoins avaient une amplitude moyenne de flux calcique de $99,5\pm 7$ contre $91,0\pm 7,3$ ($p=0,03$) dans le

C-SII, $89,1 \pm 4,7$ ($p < 0,01$) dans le D-SII et $88,7 \pm 6,8$ ($p < 0,01$) dans le M-SII (chaque amplitude de contrôle étant rapportée à la moyenne des contrôles de l'expérience). De plus l'amplitude du flux calcique et l'intensité ($p < 0,01$ $r = -0,54$) et la fréquence des douleurs ($p < 0,01$ $r = -0,41$) des patients étaient corrélées négativement.

3) Effet du surnageant sur l'expression de la connexine-43 dans les cellules gliales entériques de rat

Afin d'identifier le mécanisme cellulaire en cause dans la diminution du flux calcique dans les CGE cultivées avec du surnageant de patients SII, l'expression de la protéine connexine 43 a été comparée en Western blot entre les CGE cultivées avec du surnageant de patients et celles cultivées avec du surnageant de témoins. Aucune différence n'était observée entre les différents sous-groupes et les témoins (Figure 5) ($p = 0,47$).

4) Etude du flux calcique intra-cellulaire des cellules gliales entériques mises en culture avec de l'histamine, de la sérotonine, du SLIGRL

Afin d'identifier un ou plusieurs facteurs solubles potentiellement responsables des effets du surnageant de biopsie colique sur les CGE nous avons testé les effets de médiateurs identifiés dans le surnageant (sérotonine, histamine) et d'un agoniste des récepteurs PAR-2, le SLIGRL. Les CGE traitées par SLIGRL et la sérotonine avaient une réponse calcique à l'ATP inchangée tandis que l'histamine induisait une diminution modeste mais significative de l'amplitude de flux calcique par rapport aux CGE contrôles (Figure 6) ($p = 0,01$).

DISCUSSION

Cette étude physiopathologique visait à mettre en évidence la présence ou non d'atteintes des CGE au cours du SII. L'expression de marqueurs gliaux clés, tels que S100 β ou GFAP, n'était pas différente dans les sous-types de patients SII et dans les témoins. La culture de CGE avec du surnageant de biopsies de patients SII ne modifiait pas l'expression des marqueurs gliaux par rapport aux cellules cultivées en présence de surnageant de témoins. En revanche, l'amplitude du flux calcique induit par l'ATP dans les CGE diminuait significativement lorsqu'elles avaient été cultivées en présence de surnageant de patients SII par rapport à celles cultivées avec du surnageant de témoins. Cependant l'expression de la connexine-43, impliquée dans la diffusion du signal calcique dans les CGE, n'était pas modifiée par la culture en présence de surnageant de patient. Mais la culture avec de l'histamine semblait reproduire cet effet, suggérant que ces médiateurs solubles pouvaient être impliqués dans les effets du surnageant de patients. Enfin, contrairement à des études antérieures, nous n'avons pas mis en évidence de différence dans la perméabilité intestinale *ex vivo* entre les patients SII et les témoins.

Notre étude a plusieurs forces. Premièrement ce travail nous a permis de concevoir et de débiter une biocollection dédiée au SII à Nantes, associant les données démographiques et cliniques avec les données biologiques obtenues à partir des biopsies et des surnageants. Les dossiers ont été systématiquement passés en revue afin de rechercher d'autres affections susceptibles de mimer un SII. 25,6% des patients n'ont pas été inclus dans notre analyse car ils ne remplissaient pas les critères précis de Rome III, ou parce qu'ils présentaient des pathologies intercurrentes. Dans l'étude du SII, ce type de biocollection est particulièrement précieux, car il constitue un moyen intéressant de déterminer l'implication des neurones entériques et de la BEI dans les mécanismes physiopathologiques chez l'homme. Deuxièmement, l'étude de marqueurs gliaux clés (GFAP, S100 β) dans des biopsies coliques a montré que les CGE des biopsies de patients SII ne présentaient pas de différences phénotypiques par rapport à celles des biopsies de témoins. De même, les CGE mises en culture avec du surnageant de biopsies de patients SII ne présentaient pas de différences phénotypiques par rapport à celles cultivées avec du surnageant de témoins. Ces données contrastent avec celles obtenues dans les pathologies inflammatoires 'de haut grade' du tube digestif comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, qui ont montré une modification de l'expression des marqueurs gliaux GFAP et S100 β , suggérant l'existence

d'une réactivité gliale en zone inflammatoire (von Boyen et al., 2011; Cornet et al., 2001). Certaines cytokines telles que le TNF α ou l' Interleukine 1 β sont connues comme pouvant augmenter l'expression de l'ARNm et de la protéine GFAP (von Boyen et al., 2004). En revanche, la seule étude préliminaire publiée sur l'étude de la glie entérique dans le SII ne montrait pas non plus de différence au niveau de l'expression de S100 β dans les biopsies de patients par rapport aux contrôles (Andrews et al., 2005). Ainsi il semble que la microinflammation observée dans le SII ne soit pas suffisante pour induire des modifications phénotypiques dans les CGE. Ceci est cohérent avec le fait que les études étudiant le profil cytokinique dans le SII ne mettent pas en évidence de modification majeure, mais plutôt un déséquilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires (Bashashati et al., 2012). Troisièmement, un résultat important de notre étude a été que le surnageant de biopsie de SII est capable de modifier les propriétés fonctionnelles des CGE. En effet, les CGE cultivées avec du surnageant de patients SII avaient une diminution significative de l'amplitude du flux calcique en réponse à l'ATP par rapport aux témoins. Cette modification de la réponse des CGE à l'ATP pourrait conduire à des modifications de l'homéostasie neuronale et gliale. En effet, l'ATP a récemment été identifié comme l'un des médiateurs clés dans le SNE à la fois comme acteur de la communication neuro-gliale mais aussi comme acteur du contrôle des fonctions motrices par les CGE (Gomes et al., 2009; Gulbransen and Sharkey, 2009). Aussi une modification de la réponse à l'ATP pourrait conduire à des modifications observées au cours du SII tels que les troubles de l'excitabilité neuronale (Buhner et al., 2009), de la motricité ou de la perméabilité observée au cours du SII. De manière intéressante nous avons observé une corrélation négative entre l'intensité du flux calcique et les douleurs abdominales. Une hypothèse serait que le surnageant des patients SII induit une atteinte fonctionnelle des CGE et que cette atteinte est liée à la symptomatologie à travers son impact sur les neurones ou les CEI.

Ces modifications fonctionnelles des CGE doivent être confirmées, tout d'abord *in vivo* sur des CGE humaines, difficiles à cultiver, puis *ex vivo*. La mesure du flux calcique a été réalisée sur des ganglions de plexus sous-muqueux de biopsies intestinales humaines avec succès, suggérant que de telles explorations seront possibles sur des CGE de biopsies (Cirillo et al., 2013).

A ce jour les mécanismes responsables de la diminution de la réponse calcique à l'ATP dans les CGE restent à déterminer. Elles pourraient, d'une part, être dues à des modifications de l'expression des récepteurs P2Y précédemment décrites sur les CGE. Néanmoins des données préliminaires de notre laboratoire montrent que le surnageant de biopsies de SII ne modifie

pas l'expression des récepteurs P2Y1 et P2Y4 (données non publiées). D'autre part, le surnageant pourrait aussi modifier la capacité des réserves intracellulaires de calcium (réticulum, mitochondries) à libérer le calcium en réponse à l'ATP. Un rôle de la connexine-43 a été suggéré car cette protéine a été identifiée comme régulant la signalisation calcique en réponse à ATP. Son absence entraîne une diminution *in vivo* de la réponse calcique induite par l'ATP conduisant à des modifications des fonctions motrices et sécrétrices (McClain et al., 2014). Dans notre étude l'expression de la protéine connexine-43 n'était pas modifiée entre les groupes, cependant nous n'avons pas analysé sa localisation intra-cellulaire qui joue un rôle crucial sur la fonction de cette protéine.

Un des objectifs de notre étude était d'identifier un ou plusieurs facteurs solubles responsables des effets des CGE. Nous avons testé des médiateurs tels que la sérotonine, l'histamine et des protéases contenus dans le surnageant de biopsies SII et qui modifient les fonctions des neurones entériques (Barbara et al., 2007; Buhner et al., 2009; Cenac et al., 2007). La réduction de la réponse calcique à l'ATP après application d'histamine mais nécessite d'être confirmée par l'utilisation d'antagonistes. Des études précédentes ont montré que l'application 'aiguë' de sérotonine, histamine (Kimball and Mulholland, 1996) ou d'agoniste de PAR-2 (Garrido et al., 2002) entraînait une réponse calcique en dehors de la stimulation par l'ATP. Néanmoins l'impact de l'application chronique de ces médiateurs sur les fonctions des CGE et leur réponse à l'ATP reste à déterminer.

Notre étude n'a pas mis en évidence de différence de perméabilité intestinale entre les patients SII et les témoins. Ces résultats contrastent avec certaines données de la littérature. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces discordances, et en premier lieu l'utilisation dans les études de différentes méthodes de mesure. En effet les études *in vivo* basées sur la clairance urinaire de sucres explorent principalement l'intestin grêle, et une étude récente a démontré que leurs résultats sont tributaires de nombreux facteurs de confusion (sexe, médicaments, tabac, indice de masse corporelle...) (Mujagic et al., 2014). Ces études sont donc difficiles à comparer avec les études *ex vivo* utilisant les chambres de Ussing. Deuxièmement, la taille de notre échantillon est probablement insuffisante et ce manque de puissance nous empêche peut-être de mettre en évidence une différence (risque de 2^{ème} espèce). Il est important de noter que les résultats d'une étude antérieure basée sur les chambres de Ussing était également sujette à questionnement puisque portant sur de petits effectifs avec 5 témoins et 12 patients, ce qui aurait pu exagérer l'augmentation de perméabilité (Piche et al., 2009). Troisièmement, une différence majeure avec cette étude était que les biopsies étaient prélevées au cours d'une coloscopie après préparation colique par voie orale alors que les biopsies de l'étude de Piche

et al. étaient réalisées au cours d'une coloscopie partielle après un simple lavement à l'eau, ce qui pourrait aussi expliquer la différence de perméabilité. Enfin, nos patients ont été recrutés avec attention dans un d'un centre hospitalier universitaire en excluant les comorbidités sévères. Notamment, nous n'avons pas dans notre cohorte de patients ayant un SII post infectieux chez lesquels une augmentation de perméabilité a été précédemment objectivée (Spiller et al., 2000).

En conclusion, les mécanismes physiopathologiques du syndrome de l'intestin irritable restent mal compris et ne peuvent actuellement ni dicter la prise en charge thérapeutique, qui reste principalement symptomatique, ni guider le diagnostic. La compréhension de cette pathologie est donc cruciale, au vu de sa prévalence et des coûts qu'elle entraîne, afin de développer des traitements ciblés et des marqueurs diagnostiques. Ce travail a permis pour la première fois de montrer qu'il existe des altérations fonctionnelles des CGE dans le SII et également d'en identifier un des facteurs potentiels. Les conséquences de ces altérations des CGE restent à définir, en particulier dans des modèles animaux, dans la perspective de développer des traitements pharmacologiques spécifiques ou des interventions nutritionnelles. De ce fait il est d'une importance cruciale de confirmer les résultats de cette étude pilote par des études prospectives de plus grands effectifs dans le but de développer de nouveaux marqueurs diagnostiques mini-invasifs et d'aider à la prise en charge des patients.

BIBLIOGRAPHIE

Andrews CN, Shaffer, Ho W, Nasser Y, O'Hara JR, and Sharkey KA (2005). Enteric glia and enteroendocrine cells in irritable bowel syndrome: controlled pilot study (Abstract). *Gastroenterology* A-270.

Aubé, A.-C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J.P., and Neunlist, M. (2006). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut* 55, 630–637.

Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., et al. (2004). Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 693–702.

Barbara, G., Wang, B., Stanghellini, V., de Giorgio, R., Cremon, C., Di Nardo, G., Trevisani, M., Campi, B., Geppetti, P., Tonini, M., et al. (2007). Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 132, 26–37.

Bashashati, M., Rezaei, N., Andrews, C.N., Chen, C.-Q., Daryani, N.E., Sharkey, K.A., and Storr, M.A. (2012). Cytokines and irritable bowel syndrome: where do we stand? *Cytokine* 57, 201–209.

Bertiaux-Vandaële, N., Youmba, S.B., Belmonte, L., Lecleire, S., Antonietti, M., Gourcerol, G., Leroi, A.-M., Déchelotte, P., Ménard, J.-F., Ducrotté, P., et al. (2011). The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am. J. Gastroenterol.* 106, 2165–2173.

Von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., and Kirsch, J. (2004). Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 53, 222–228.

Von Boyen, G.B.T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C., and Steinkamp, M. (2011). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterol.* *11*, 3.

Buhner, S., Li, Q., Vignali, S., Barbara, G., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Cremon, C., Zeller, F., Langer, R., Daniel, H., et al. (2009). Activation of human enteric neurons by supernatants of colonic biopsy specimens from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* *137*, 1425–1434.

Cenac, N., Andrews, C.N., Holzhausen, M., Chapman, K., Cottrell, G., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M., Barbara, G., Beck, P., Bunnett, N.W., et al. (2007). Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Invest.* *117*, 636–647.

Cirillo, C., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2013). Nerve activity recordings in routine human intestinal biopsies. *Gut* *62*, 227–235.

Cornet, A., Savidge, T.C., Cabarrocas, J., Deng, W.L., Colombel, J.F., Lassmann, H., Desreumaux, P., and Liblau, R.S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 13306–13311.

Costantini, T.W., Krzyzaniak, M., Cheadle, G.A., Putnam, J.G., Hageny, A.-M., Lopez, N., Eliceiri, B.P., Bansal, V., and Coimbra, R. (2012). Targeting α -7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. *Am. J. Pathol.* *181*, 478–486.

Dapoigny, M. (2009). [Irritable bowel syndrome: epidemiology/economic burden]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *33 Suppl 1*, S3–8.

Drossman, D.A. (2006). The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* *130*, 1377–1390.

Dunlop, S.P., Hebden, J., Campbell, E., Naesdal, J., Olbe, L., Perkins, A.C., and Spiller, R.C. (2006). Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable

bowel syndromes. *Am. J. Gastroenterol.* *101*, 1288–1294.

Garrido, R., Segura, B., Zhang, W., and Mulholland, M. (2002). Presence of functionally active protease-activated receptors 1 and 2 in myenteric glia. *J. Neurochem.* *83*, 556–564.

De Giorgio, R., Giancola, F., Boschetti, E., Abdo, H., Lardeux, B., and Neunlist, M. (2012). Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *303*, G887–893.

Gomes, P., Chevalier, J., Boesmans, W., Roosen, L., van den Abbeel, V., Neunlist, M., Tack, J., and Vanden Berghe, P. (2009). ATP-dependent paracrine communication between enteric neurons and glia in a primary cell culture derived from embryonic mice. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* *21*, 870–e62.

Gulbransen, B.D., and Sharkey, K.A. (2009). Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. *Gastroenterology* *136*, 1349–1358.

Hulisz, D. (2004). The burden of illness of irritable bowel syndrome: current challenges and hope for the future. *J. Manag. Care Pharm. JMCP* *10*, 299–309.

Kimball, B.C., and Mulholland, M.W. (1996). Enteric glia exhibit P2U receptors that increase cytosolic calcium by a phospholipase C-dependent mechanism. *J. Neurochem.* *66*, 604–612.

Lovell, R.M., and Ford, A.C. (2012). Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *10*, 712–721.e4.

Macsharry, J., O'Mahony, L., Fanning, A., Bairead, E., Sherlock, G., Tiesman, J., Fulmer, A., Kiely, B., Dinan, T.G., Shanahan, F., et al. (2008). Mucosal cytokine imbalance in irritable bowel syndrome. *Scand. J. Gastroenterol.* *43*, 1467–1476.

McClain, J.L., Grubišić, V., Fried, D., Gomez-Suarez, R.A., Leininger, G.M., Sévigny, J., Parpura, V., and Gulbransen, B.D. (2014). Ca²⁺ responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice. *Gastroenterology* *146*, 497–

507.e1.

Mujagic, Z., Ludidi, S., Keszthelyi, D., Hesselink, M. a. M., Kruijmel, J.W., Lenaerts, K., Hanssen, N.M.J., Conchillo, J.M., Jonkers, D.M. a. E., and Masclee, A. a. M. (2014). Small intestinal permeability is increased in diarrhoea predominant IBS, while alterations in gastroduodenal permeability in all IBS subtypes are largely attributable to confounders. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *40*, 288-97

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M.M., Derkinderen, P., des Varannes, S.B., and Rolli-Derkinderen, M. (2012). The digestive neuronal–glial–epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 90–100.

Piche, T., Barbara, G., Aubert, P., Bruley des Varannes, S., Dainese, R., Nano, J.L., Cremon, C., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Galimiche, J.P., et al. (2009). Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* *58*, 196–201.

Rescigno, M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* *32*, 256–264.

Savidge, T.C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R., and Sofroniew, M.V. (2007). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* *132*, 1344–1358.

Spiller, R.C., Jenkins, D., Thornley, J.P., Hebden, J.M., Wright, T., Skinner, M., and Neal, K.R. (2000). Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* *47*, 804–811.

Zhang, W., Segura, B.J., Lin, T.R., Hu, Y., and Mulholland, M.W. (2003). Intercellular calcium waves in cultured enteric glia from neonatal guinea pig. *Glia* *42*, 252–262.

Zhou, Q., Zhang, B., and Verne, G.N. (2009). Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* *146*, 41–46.

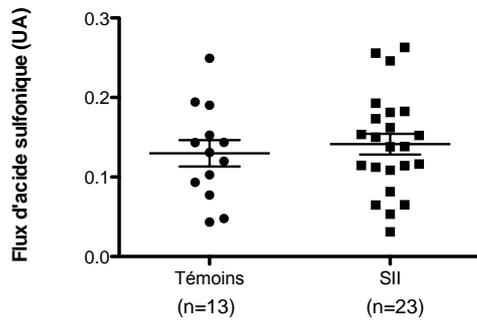
Tableau I : Caractéristiques cliniques des patients

	Témoins (n=14)	C-SII (n=7)	D-SII (n=8)	M-SII (n=10)	Total (SII et témoins)
Age	41±12	47±17 (p=0,48)	54±16 (p=0,048)	54±19 (p=0,12)	48±16 (p=0,20)
Sexe (% femme)	43	71 (p=0,22)	75 (p=0,16)	70 (p=0,18)	72 (p=0,40)
Dépression (%)	0	14 (p=0,41)	14 (p=0,41)	50 (p=0,036)	17 (p=0,053)
Intensité de la douleur	0,0±0,0	1,7±0,8 (p=0,0002)	2,0±0,6 (p=0,0001)	1,6±1,0 (p=0,0006)	1,2±1,1 (p=0,0002)
Intensité des ballonnements	0,6±0,5	1,7±1,0 (p=0,023)	1,6±0,5 (p=0,005)	1,3±0,8 (p=0,053)	1,2±0,8 (p=0,023)
Fréquence de la douleur	0,0±0,0	2,7±0,8 (p=0,0002)	2,4±1,0 (p=0,0001)	1,9±1,4 (p=0,0006)	1,5±1,4 (p=0,0002)
Fréquence des ballonnements	0,8±1,2	2,7±1,2 (p=0,010)	2,7±1,1 (p=0,007)	2,3±1,5 (p=0,038)	2,0±1,5 (p=0,015)

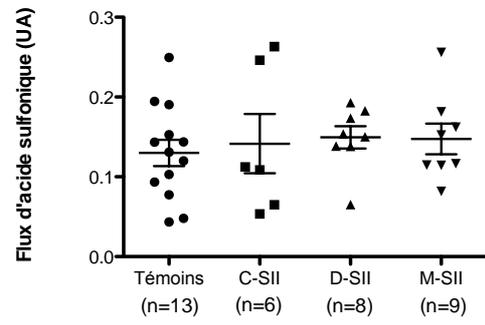
SII : syndrome de l'intestin irritable, C-SII : prédominance de constipation, D-SII : prédominance de diarrhée, M-SII : mixte

Figure 1

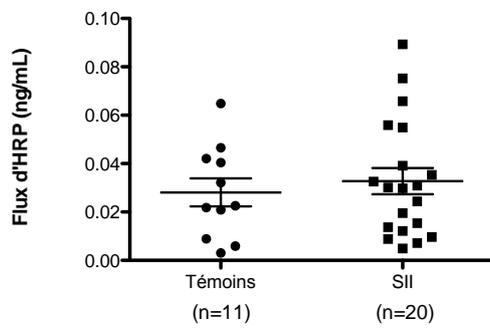
A



B



C



D

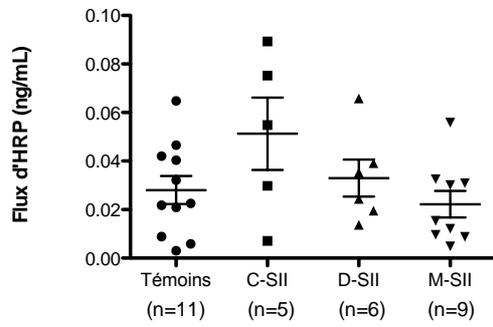
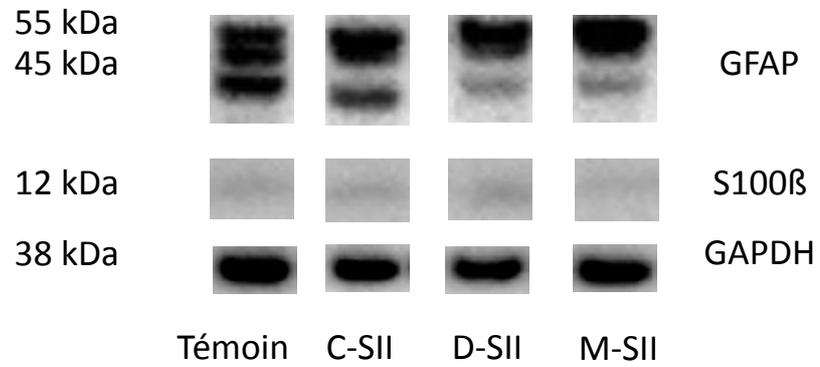
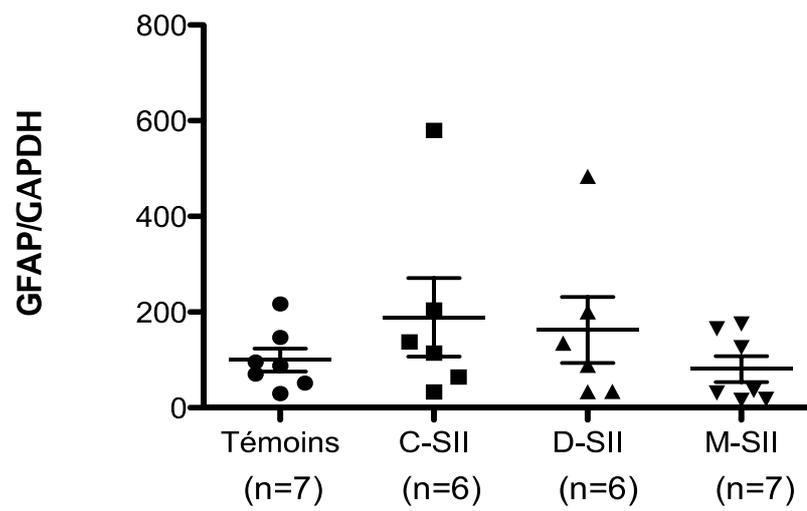


Figure 2 :

A



B



C

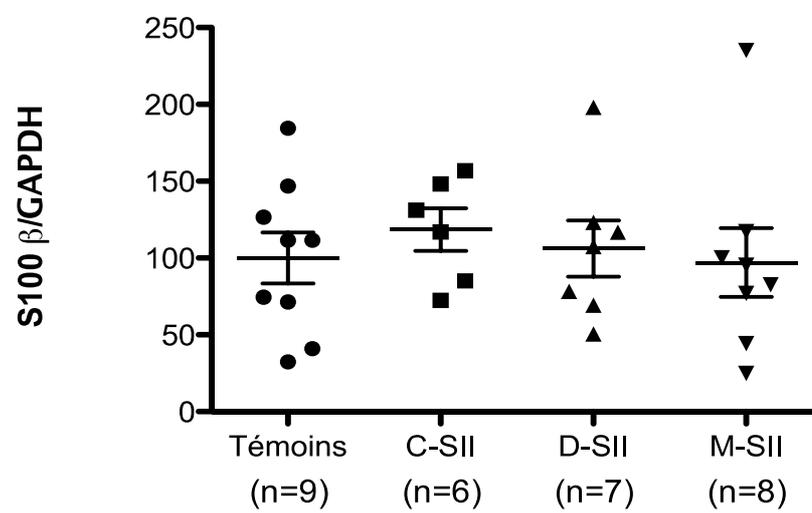
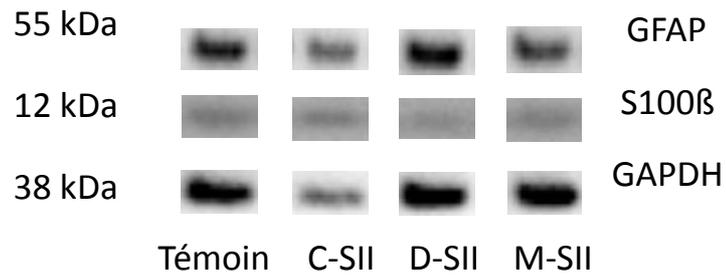
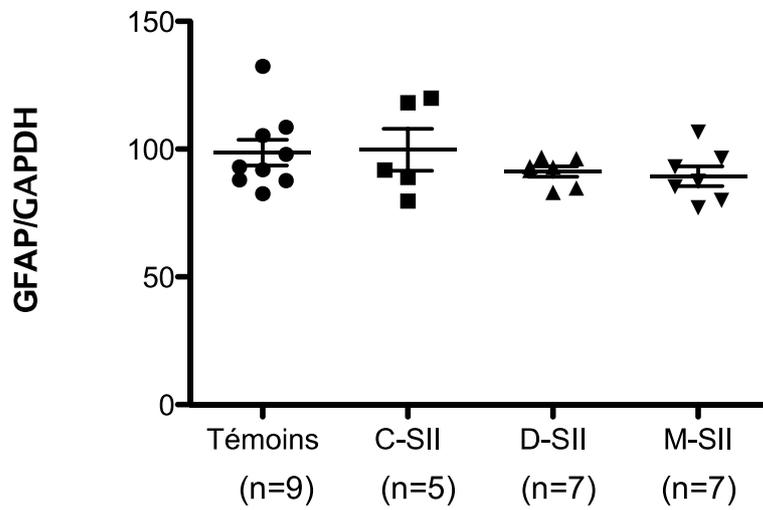


Figure 3 :

A



B



C

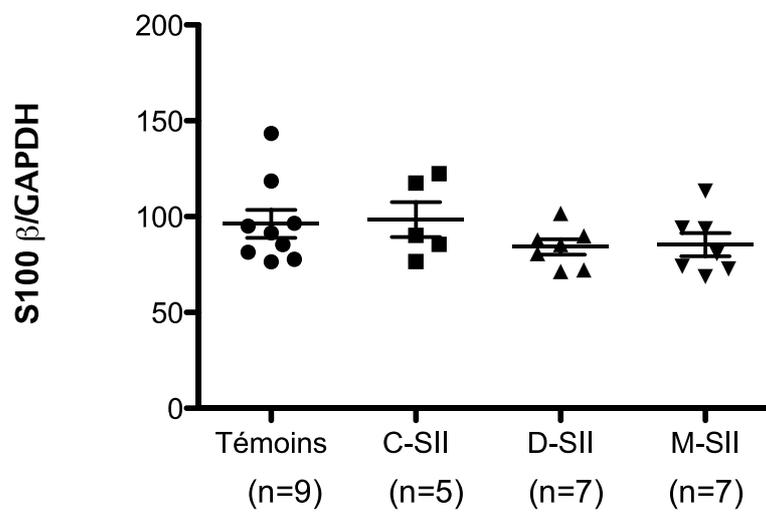
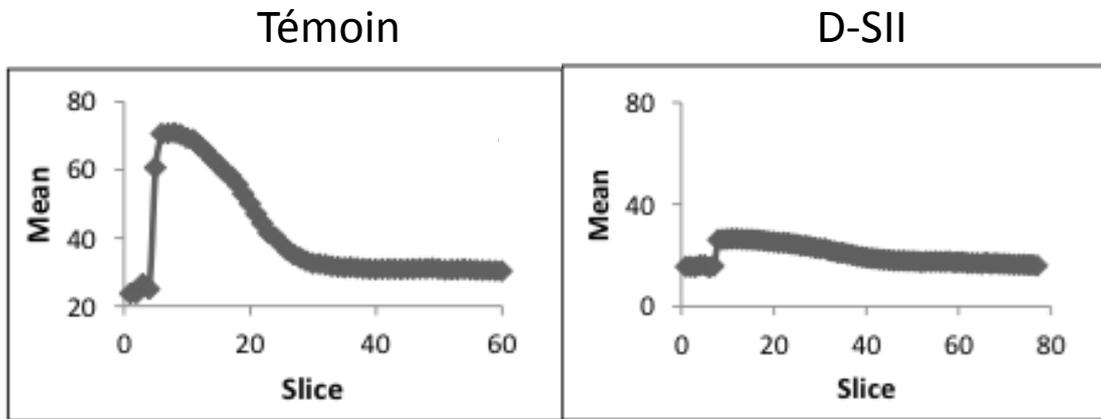
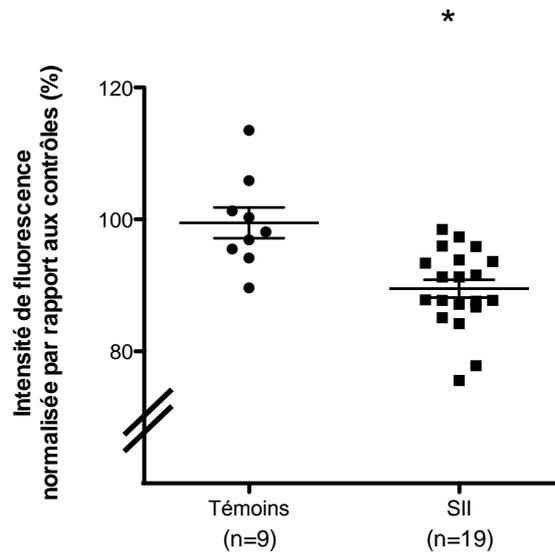


Figure 4 :

A



B



C

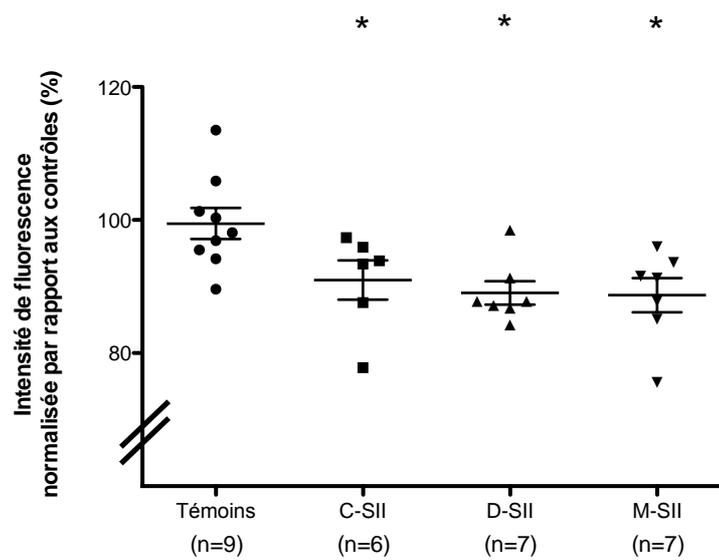


Figure 5 :

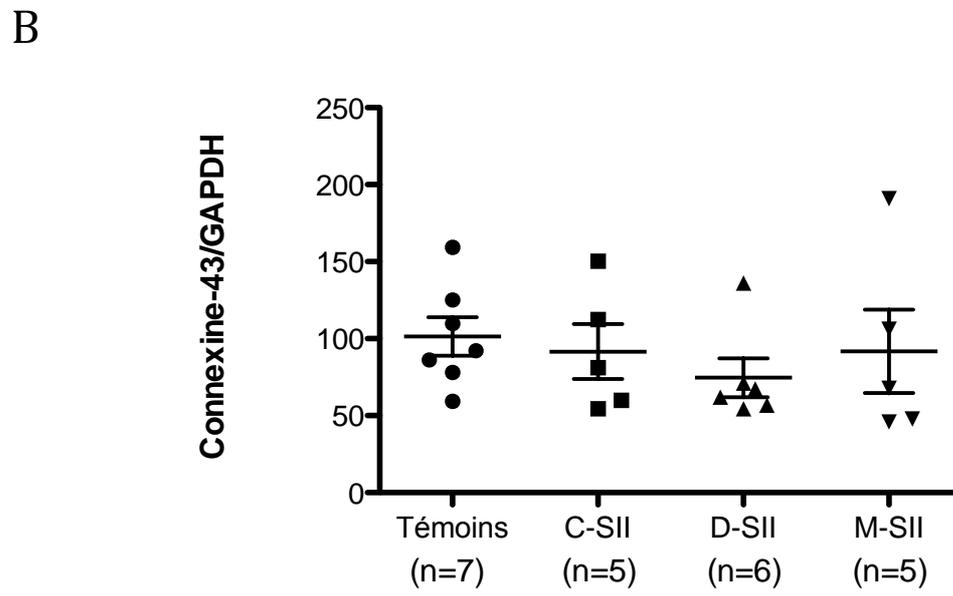
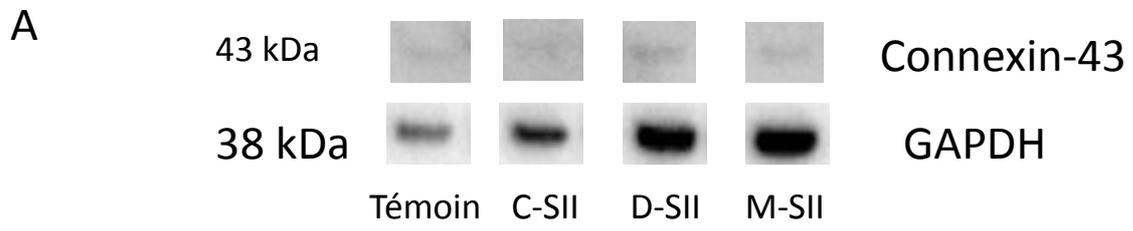


Figure 6 :

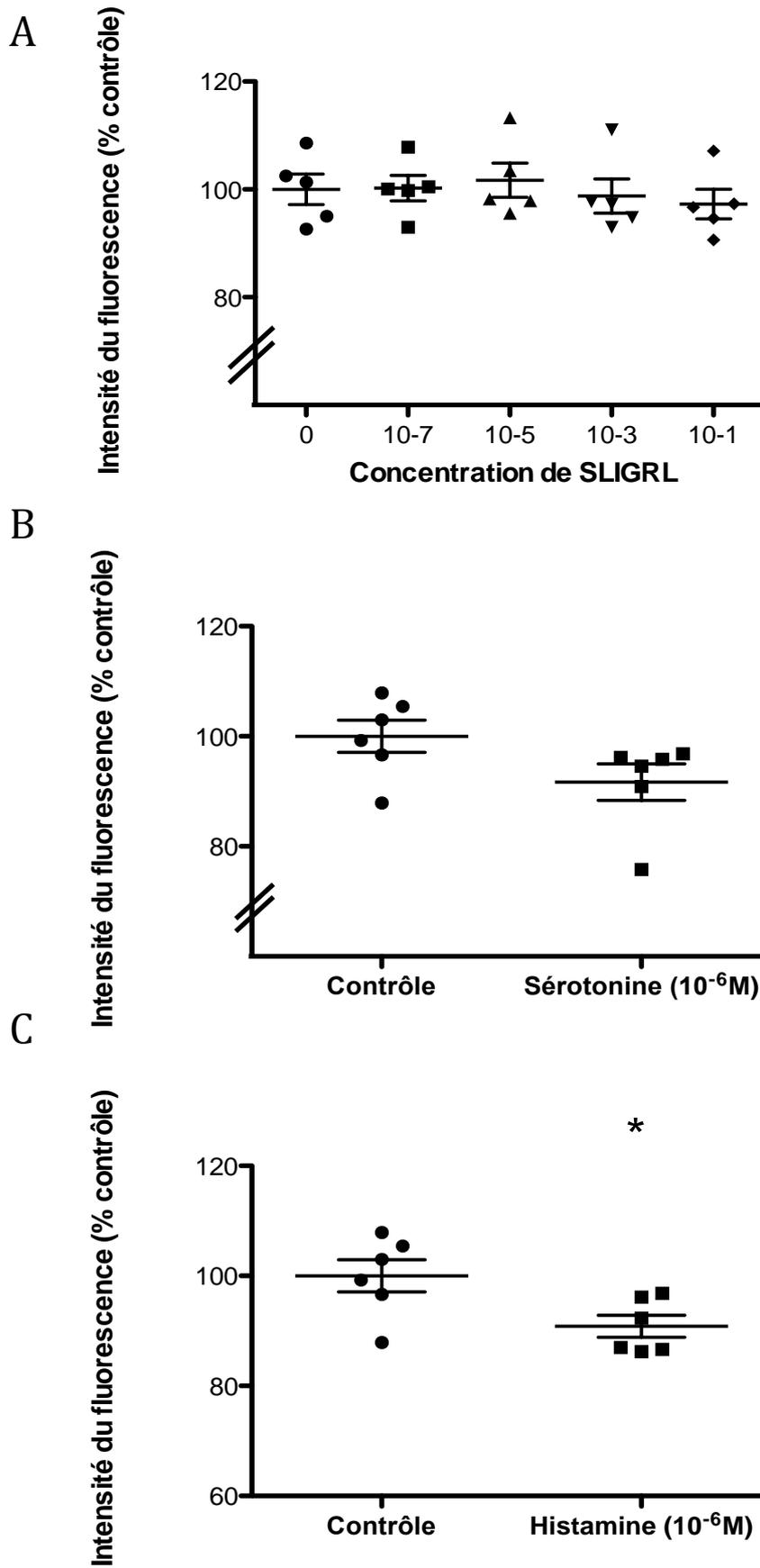


Figure 1 : Mesure *ex vivo* de la perméabilité colique dans les biopsies coliques de patients ayant un syndrome de l'intestin irritable et de témoins.

Perméabilité paracellulaire mesurée par le flux d'acide sulfonique dans les biopsies coliques de patients ayant un syndrome de l'intestin irritable et de témoins (1A) ($p=0.60$) ainsi que dans les différents sous-types de SII (1B) ($p=0.60$). Perméabilité transcellulaire à l'HRP dans les biopsies coliques de patients ayant un syndrome de l'intestin irritable et de témoins (1C) ($p=0.76$) ainsi que dans les différents sous-types de SII (1D) ($p=0.23$). t-test, test de Kruskal Wallis.

SII : syndrome de l'intestin irritable ; C-SII : prédominance de constipation ; D-SII : prédominance de diarrhée ; M-SII : mixte.

Figure 2 : Expression des marqueurs gliaux dans les biopsies coliques de patients ayant un syndrome de l'intestin irritable et de témoins.

Lysats de biopsies analysés en Western Blot en utilisant des anticorps anti-GFAP, anti-S100 β et anti-GAPDH (2A). Expression de GFAP dans les sous-types de SII et les témoins (2B) ($p=0.53$). Expression de S100 β dans les sous-types de SII et les témoins (2C) ($p=0.52$). Test de Kruskal-Wallis.

SII : syndrome de l'intestin irritable ; C-SII : prédominance de constipation ; D-SII : prédominance de diarrhée ; M-SII : mixte ; GFAP : glial fibrillary acidic protein ; GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

Figure 3 : Expression des marqueurs gliaux dans des cellules gliales en culture avec du surnageant de patients ayant un syndrome de l'intestin irritable et de témoins.

Lysat de CGE cultivées avec du surnageant analysé en Western Blot en utilisant des anticorps anti-GFAP, anti-S100 β et anti-GAPDH (3A). Expression de GFAP (3B) et de S100 β (3C) dans les CGE cultivées avec du surnageant des différents sous-types de patients SII et les cellules cultivées avec du surnageant de témoins (respectivement $p=0.60$ and $p=0.35$). Test de Kruskal Wallis.

CGE : cellules gliales entériques ; SII : syndrome de l'intestin irritable ; C-SII : prédominance de constipation ; D-SII : prédominance de diarrhée ; M-SII : mixte ; GFAP : glial fibrillary acidic protein ; GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

Figure 4 : Réponse calcique intra-cellulaire induite à l'ATP dans des cellules gliales entériques cultivées avec du surnageant de biopsies de patients ayant un syndrome de l'intestin irritable et de témoins et incubées avec du Fluo-4.

Exemple de la réponse calcique à l'ATP d'une CGE après traitement avec du surnageant de biopsie de témoin ou de patient ayant un D-SII pendant 48heures (4A). Diminution de l'amplitude de l'intensité de fluorescence du marqueur Fluo-4 au sein de cellules gliales entériques cultivées avec du surnageant de patient SII par rapport aux cellules en culture avec du surnageant de témoins (4B) ($p=0,001$). Diminution de l'amplitude de l'intensité de fluorescence dans tous les sous-types de SII sans différence entre les sous-types (4C). Test de Kruskal Wallis.

CGE : cellules gliales entériques ; SII : syndrome de l'intestin irritable ; C-SII : prédominance de constipation ; D-SII : prédominance de diarrhée ; M-SII : mixte.

Figure 5 : Expression de la connexine-43 en Western Blot sur cellules gliales en culture avec du surnageant de patients ayant un syndrome de l'intestin irritable et de témoins.

Lysat de CGE cultivées avec du surnageant analysé en Western Blot en utilisant des anticorps anti-connexine-43 et anti-GAPDH (5A). Expression de la connexine-43 dans les CGE cultivées avec du surnageant des différents sous-groupes de patients SII et celles cultivées avec du surnageant de témoins ($p=0.47$) (5B). Test de Kruskal Wallis.

CGE : cellules gliales entériques ; SII : syndrome de l'intestin irritable ; C-SII : prédominance de constipation ; D-SII : prédominance de diarrhée ; M-SII : mixte ; GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

Figure 6 : Réponse calcique intra-cellulaire induite à l'ATP dans des cellules gliales entériques cultivées avec de l'histamine, de la sérotonine et du SLIGRL et incubées avec du Fluo-4.

Amplitude de l'intensité de fluorescence du marqueur Fluo-4 au sein de cellules gliales entériques en culture avec différentes concentrations de SLIGRL ou de la sérotonine n'était pas significativement différente de l'amplitude mesurée dans les cellules contrôles (6A et 6B). Diminution de l'amplitude de l'intensité de fluorescence du marqueur Fluo-4 au sein de cellules gliales entériques en culture avec de l'histamine (6C) par rapport aux CGE contrôles. Kruskal Wallis test et t t-test

CGE : cellules gliales entériques ; SII : syndrome de l'intestin irritable ; C-SII : prédominance de constipation ; D-SII : prédominance de diarrhée ; M-SII : mixte

ANNEXE : Questionnaire

Tableau I : Sévérité des symptômes (cocher une case par ligne)

	Absent	Sans impact sur la vie quotidienne	Réduisant un peu les activités quotidiennes	Réduisant fortement les activités quotidiennes	Patient confiné au lit
Douleur/Gêne					
Ballonnements					
Selles anormales					

Tableau II : Fréquence des symptômes en jours par semaine (cocher une case par ligne)

	Absent	Rare (1 j/semaine)	Occasionnel (2 -3 j/ semaine)	Fréquent (4 – 6 j/ semaine)	Très fréquent (7 j/ semaine)
Douleur/Gêne					
Ballonnements					
Selles anormales					

Fréquence des évacuations :

Nombre de selles par joursou Nombre de selles par semaine

Caractéristiques des évacuations

Difficulté d'expulsion []

Sensation d'évacuation incomplète []

Impériosité []

Présence de mucus dans les selles []

EVALUATION GLOBALE DU BIEN-ETRE GENERAL

De 0 à 10

Antécédent de syndrome anxiodépressif

oui, actuel oui, ancien non

Echelle de Bristol

	0-24% du temps	25-49% du temps	50-74% du temps	75-100% du temps
1 ou 2				
3 ou 5				
6 ou 7				



1) Au cours de ces 3 derniers mois, à quelle fréquence avez-vous ressenti une gêne ou une douleur abdominale sans localisation précise ?

- a) Jamais
- b) Moins d'un jour par mois
- c) Un jour par mois
- d) Deux à trois jours par mois
- e) Plus d'un jour par semaine
- f) Un jour par semaine
- g) Tous les jours

2) Pour les femmes : Cette gêne ou cette douleur est-elle apparue uniquement pendant vos règles et pas à d'autres moments ?

- a) Non
- b) Oui
- c) Sans objet, car je suis ménopausée ou je suis un homme

3) Ressentez-vous cette gêne ou cette douleur depuis 6 mois ou plus ?

- a) Non
- b) Oui

4) À quelle fréquence cette gêne ou cette douleur s'est-elle atténuée ou a-t-elle disparu après être allé à la selle ?

- a) Jamais ou rarement
- b) Parfois
- c) Souvent
- d) La plupart du temps
- e) Toujours

5) Lorsque cette gêne ou cette douleur est apparue, avez-vous constaté une augmentation de la fréquence de vos selles ?

- a) Jamais ou rarement
- b) Parfois
- c) Souvent
- d) La plupart du temps
- e) Toujours

6) Lorsque cette gêne ou cette douleur est apparue, avez-vous constaté une diminution de la fréquence de vos selles ?

- a) Jamais ou rarement
- b) Parfois
- c) Souvent
- d) La plupart du temps
- e) Toujours

7) Lorsque cette gêne ou cette douleur est apparue, vos selles étaient-elles plus molles ?

- a) Jamais ou rarement
- b) Parfois
- c) Souvent
- d) La plupart du temps
- e) Toujours

8) Lorsque cette gêne ou cette douleur est apparue, à quelle fréquence avez-vous eu des selles plus dures ?

- a) Jamais ou rarement
- b) Parfois
- c) Souvent
- d) La plupart du temps
- e) Toujours

9) Au cours de ces 3 derniers mois, à quelle fréquence vos selles étaient-elles dures ou en forme de billes ?

- a) Jamais ou rarement
- b) Environ 25 % du temps
- c) Environ 50 % du temps
- d) Environ 75 % du temps
- e) Toujours 100% du temps

10) Au cours de ces 3 derniers mois, à quelle fréquence vos selles étaient-elles molles, pâteuses ou liquides ?

- a) Jamais ou rarement
- b) Environ 25 % du temps
- c) Environ 50 % du temps
- d) Environ 75 % du temps
- e) Toujours 100% du temps

SII si :

- *question 1 >c*
- *question 2 >a*
- *question 3 >a*
- *question 4 >a et/ou 5 >a*
- *question 6 >a et/ou 7 >a*

Sous-type :

C-SII si : Question 9 >a et question 10 <b

D-SII si : Question 10 >a et question 9 <b

M-SII si : Question 10 >a et question 9 >a

U-SII si : Pas les critères suffisants pour rentrer dans C-SII, D ou M

Le syndrome de l'intestin irritable, une pathologie de la glie entérique ?

Lucille Quénéhervé^{a,b}, Nicoletta Libera Lilli^{a,c}, Philippe Aubert^a, Malvyne Rolli-Derkinderen^a, Tony Durand^a, Elise Kerdreux^b, Giovanni Barbara^c, Roberto De Giorgio^c, Stanislas Bruley Des Varannes^{a,b}, Michel Neunlist^a, Emmanuel Coron^{a,b}

^aInserm, UMR913, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes F-44093, France

^b Institut des Maladies de l'Appareil Digestif; Service d'Hépatogastroentérologie, Nantes, France

^c Department of Clinical Medicine, Digestive Diseases and Internal Medicine, 40138 Bologna, Italy

RESUME

Introduction : Les mécanismes physiopathologiques du syndrome de l'intestin irritable (SII) ne sont pas totalement élucidés. Le rôle d'une dysfonction de la barrière épithéliale intestinale (BEI), et en particulier d'une augmentation de la perméabilité a été mis en évidence. De plus le rôle des neurones entériques a récemment été suggéré dans le SII. Or les cellules gliales entériques (CGE) jouent un rôle central à la fois dans le maintien de la BEI et dans la neuroprotection, nous avons donc fait l'hypothèse d'une altération des CGE dans le SII. **Objectif :** Le but de cette étude était de caractériser les lésions des CGE chez les patients SII ainsi que le rôle potentiel de facteurs solubles produits par le microenvironnement de la BEI colique dans ces lésions. **Méthodes :** Vingt-cinq patients (7 ayant un SII à prédominance de constipation (C-SII), 8 à prédominance de diarrhée (D-SII) et 10 à transit mixte (M-SII) et 14 témoins ont été inclus. Pour chaque patient les symptômes gastro-intestinaux étaient évalués selon le questionnaire de Rome III et une coloscopie était réalisée avec biopsies coliques gauches. Les perméabilités paracellulaire et transcellulaire étaient mesurées sur 3 biopsies en Chambre d'Ussing. Le surnageant était obtenu par incubation de 4 biopsies. Les biopsies étaient également conditionnées pour analyse en western blot. Les expressions des protéines gliales GFAP (glial fibrillary acidic protein) et S100 β ont été analysées. Le flux intracellulaire de calcium en réponse à la stimulation par l'adénosine triphosphate (ATP) a été mesurée en utilisant la sonde Fluo-4 dans des cultures de CGE de rat après 48h d'incubation avec les surnageants de patients SII et de témoins ou avec un agoniste des récepteurs activés par les protéases (SLIGRL), de la sérotonine ou de l'histamine. **Résultats :** Les perméabilités paracellulaire et transcellulaire des biopsies de tous les sous-types de SII n'étaient pas différentes de celles des biopsies de témoins. Aucune différence dans les expressions de GFAP et de S100 β n'a été observée pour aucun sous-type. La réponse intracellulaire de calcium à l'ATP était significativement diminuée dans les cultures de CGE de rat incubées avec les surnageants de tous les sous-types de SII par rapport à celles incubées avec du surnageant de témoin. La réponse calcique à l'ATP était significativement diminuée dans les cultures de CGE après incubation avec de la sérotonine ou de l'histamine. **Conclusion:** Notre étude démontre que les fonctions des CGE sont altérées dans le SII. Les médiateurs responsables de ces modifications ainsi que leurs conséquences restent à être identifiées.