

Plan

LISTE DES ABREVIATIONS

RESUME

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

1. Généralités sur le pseudoxanthome élastique
2. Etat de la recherche sur le pseudoxanthome élastique dans le service de Dermatologie du CHU d'Angers
3. Place de cette étude et collaborateurs

DEUXIEME PARTIE : ELABORATION DU PROTOCOLE D'ETUDE

1. Contexte et justification scientifique de la recherche
 - 1.1. Etat actuel des connaissances
 - 1.2. Hypothèses de la recherche
 - 1.3. Justification des choix méthodologiques
2. Objectifs de la recherche et critères d'évaluation
 - 2.1. Objectif et critère d'évaluation principal
 - 2.2. Objectifs et critères d'évaluation secondaires
3. Conception de la recherche
 - 3.1. Schéma de la recherche
 - 3.2. Justification du nombre d'échantillons à inclure dans la recherche
4. Sélection des échantillons de la recherche
 - 4.1. Critères d'inclusion des échantillons étudiés
5. Déroulement de la recherche
 - 5.1. Pré-sélection / Recrutement
6. Statistiques
7. Gestion des données
 - 7.1. Modalités de recueil des données
 - 7.2. Circuit des données et confidentialité
 - 7.3. Droit d'accès aux données et documents sources
 - 7.4. Archivage
8. Considérations éthiques et réglementaires
 - 8.1. Qualification de la recherche
 - 8.2. Comité d'éthique et Autorité compétente
 - 8.3. Traitement des données à caractère personnel - CNIL
9. Règles relatives à la publication

TROISIEME PARTIE : ANTICIPATION DES RESULTATS ET PERSPECTIVES

1. Anticipation des résultats
2. Perspectives de recherche et perspectives thérapeutiques

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

ANNEXES

RESUME

Le PXE est une maladie génétique rare, autosomique récessive, caractérisée par un processus de calcification tissulaire ectopique cutanée, rétinienne et vasculaire. Le gène responsable de cette affection code pour un transporteur membranaire (*ABCC6*). Le phénotype clinique de PXE est très variable d'un sujet à l'autre, y compris au sein d'une même famille, ce qui sous-entend une implication « environnementale ».

L'objectif de cette thèse est d'élaborer le protocole de recherche de l'étude IMPROVE.

Résumé de la justification scientifique :

Il a été montré que le déficit fonctionnel de *ABCC6* était associé à une baisse du taux plasmatique de pyrophosphate inorganique (PPI) qui participerait à hauteur de 60% dans la calcification. Ce chiffre implique donc l'existence d'autres mécanismes responsables des calcifications ectopiques. Un des facteurs influençant la sévérité du PXE pourrait être un déficit en vitamine K (VK).

On différencie deux grandes formes de VK (VK1 et VK2) par leur composition biochimique et leur provenance. La VK1 (phylloquinone) est caractérisée par une chaîne latérale phytyle. Elle a une origine exclusivement végétale exogène. Les VK2 (ménaquinones) contiennent une chaîne latérale terpénoïde de longueur variable (4 à 13 unités de prenyl). On distingue ainsi plusieurs sous-types de ménaquinones : de MK4 à MK13. Les VK2 sont retrouvées dans les aliments fermentés (environ 25% des apports chez l'homme), et produites directement par le microbiote intestinal (environ 75% des apports chez l'homme). Les bactéries intestinales synthétisant la VK2 sont principalement les *Bacteroides* et *Escherichia coli*.

Les réserves de VK1 sont très labiles en raison d'une demi-vie faible. Dans des conditions d'insuffisance alimentaire grave, elles peuvent être réduites à environ 25% des concentrations initiales en 3 jours seulement. Les mammifères disposent alors d'un système efficace de production endogène de VK2 via le microbiote intestinal.

Les VK2 d'origine microbienne jouent un rôle important chez l'homme en contribuant aux besoins en VK, notamment en prévenant une coagulopathie cliniquement significative lors d'une insuffisance ou réduction des apports alimentaires en VK.

La VK permet la maturation de protéines régulatrices de la calcification qui font partie du groupe des protéines vitamine K dépendantes (PVKD) : la VK est en effet un cofacteur essentiel de l'activation des Gla-protéines.

Les Gla-protéines sont impliquées dans la coagulation sanguine (facteurs II, VII, IX, X), dans le métabolisme osseux (ostéocalcine), dans l'apoptose (Gas6), ainsi que dans l'inhibition de la calcification tissulaire et vasculaire (via la protéine Matrix Gla-Protein - MGP).

La MGP semble être la PVKD clé dans l'inhibition de la calcification vasculaire : sa concentration sérique diminue fortement lors d'un traitement anticoagulant par antivitamine-K, provoquant des calcifications artérielles majeures. La supplémentation en VK (VK1 ou VK2) du modèle murin et chez l'homme coronaropathe permet une réduction significative des

calcifications artérielles, notamment coronariennes, et une réduction de la mortalité par événement cardio-vasculaire.

Enfin, il est établi que la concentration sérique de VK est diminuée chez les patients PXE, et que le taux sérique de MGP activée est diminué chez les patients PXE-like présentant des mutations sur le gène GG CX.

L'ensemble de ces données indique la responsabilité indirecte de la VK dans les calcifications pathologiques qui sont observées dans la population PXE.

Pourtant une étude rétrospective transversale effectuée dans le service de dermatologie du CHU d'Angers n'a pas montré de lien entre la concentration sérique en VK1 et la gravité clinique du PXE (données non publiées).

Une étude chez des patients PXE supplémentés en VK1 a montré une efficacité sur les concentrations de MGP activée, mais il n'existe pour l'instant aucune réponse clinique, chez l'homme ou sur modèle murin.

Chez le rat, les calcifications artérielles induites par la warfarine ne sont réversibles qu'avec des doses très élevées de VK1 (x 200) alors que des doses « physiologiques » de VK2 sont suffisantes pour diminuer la présence et l'impact de ces calcifications.

D'autres études semblent souligner la plus grande (voire l'exclusive) efficacité des VK2 par rapport à la VK1 dans la diminution des calcifications vasculaires et de leurs complications.

La majorité des apports des VK2 provient du microbiote digestif : l'analyse de celui-ci permettra donc possiblement d'éclairer le métabolisme des VK2 chez les patients PXE, et donc le mécanisme de l'apparition de calcifications ectopiques.

Schéma et déroulement de la recherche :

- Recherche sur données.
- Cession d'échantillons de selles et de sang collectés pour la bio-collection PXE du CHU d'Angers.
- Les échantillons de selles seront cédés à Biofortis pour l'analyse du microbiote digestif et les échantillons plasmatiques au Pr L. Schurgers pour les mesures des espèces moléculaires de vitamine K.
- Nombre d'échantillons étudiés : Échantillons de selles et de plasma provenant de 20 patients différents inclus.
- Durée de la recherche : Durée maximale de la période d'inclusion : 1 an.

Critères d'inclusion :

Les échantillons étudiés seront prélevés chez des patients répondant aux critères suivants : patient atteint d'un PXE certain, diagnostiqué sur des critères cliniques, histologiques et moléculaires.

En conclusion :

L'analyse du microbiote intestinal des patients PXE inclus dans l'étude IMPROVE permettra de rechercher un lien significatif éventuel entre sa composition, le taux plasmatique des espèces moléculaires de vitamine K et la sévérité du PXE.

A terme, cela permettra une meilleure compréhension des mécanismes d'apparition des calcifications ectopiques dans le PXE.

INTRODUCTION

L'objectif de cette thèse est d'élaborer un protocole de recherche concernant une maladie systémique rare, le pseudoxanthome élastique (PXE).

L'hypothèse de recherche, l'objectif final de l'étude et son intérêt scientifique ont été discutés et conceptualisés dans le service de Dermatologie-Vénérologie du CHU d'Angers, au sein d'un staff mensuel dédié au PXE. Une recherche bibliographique exhaustive a par la suite été nécessaire, afin de s'assurer de l'exactitude et de la pertinence scientifique des objectifs et méthodes choisis pour ce protocole de recherche.

L'enjeu de ce travail a notamment été de rassembler et d'impliquer plusieurs acteurs scientifiques, aux domaines de compétences différents et aux situations géographiques éloignées.

Ainsi, le Pr MARTIN L. et le service de Dermatologie ont fait appel au Pr SCHURGERS L.J. de l'Université de Maastricht, NL, dont le domaine de compétence concerne la biochimie de la calcification vasculaire. Les collaborations entre ces deux services ont déjà amené à la publication de plusieurs articles scientifiques.

De plus, nous avons également fait appel aux équipes du laboratoire BIOFORTIS de Nantes, déjà impliquées dans de nombreuses études cliniques dans le domaine de la nutrition. Leur capacité de séquençage du microbiote intestinal a déjà été éprouvée dans plusieurs études de l'impact de probiotiques, et le laboratoire possède l'accréditation nécessaire à l'élaboration de « biobanques ».

Ce travail de thèse présente donc l'élaboration du protocole de recherche clinique IMPROVE, de sa justification scientifique à l'anticipation des futurs résultats collectés. L'inclusion des patients débutera dans le service de Dermatologie dès janvier 2019, le comité d'éthique de recherche clinique du CHU d'Angers ayant approuvé ce protocole.

PREMIERE PARTIE

1. Généralités sur le pseudoxanthome élastique

Le PXE est une maladie génétique métabolique, responsable d'une minéralisation (calcification) des fibres élastiques au niveau de la peau, des yeux et du système cardio-vasculaire. Sa transmission est de type autosomique récessif.

Les mutations responsables de la symptomatologie sont situées dans 90% des cas sur le gène *ABCC6*, codant pour une protéine transmembranaire de transport dont le substrat est encore imparfaitement identifié.

L'incidence du PXE est calculée entre 1/25000 et 1/50000, et communément établie à 1/40000.

Clinique :

- Atteintes dermatologiques :

Elles constituent une des manifestations principales de la pathologie et apparaissent progressivement dans les deux premières décennies de la vie. Cliniquement, on observe des papules couleur chair ou jaune pâle, à disposition variable, situées sur les faces latérales du cou et dans les plis (aisselles, plis inguinaux, plis du coude, ombilic parfois). La peau est de consistance anormale à ces endroits, manquant d'élasticité, et son étirement permet de repérer ces papules : le diagnostic est alors rapidement évoqué chez l'adolescent, mais plus difficile chez le sujet âgé.

Les signes cliniques dermatologiques ne sont pas systématiquement présents, et leur sévérité est extrêmement variable d'un sujet à l'autre.

- Atteintes ophtalmologiques :

La baisse de l'acuité visuelle s'aggrave généralement au cours de la vie et peut aller jusqu'à la cécité centrale bilatérale. Le fond d'œil permet de remarquer dans 85% des cas les stries angioïdes caractéristiques, qui correspondent à des ruptures de la membrane de Bruch anormalement calcifiée.

- Atteintes cardio-vasculaires et digestives :

Elles se manifestent par un tableau d'artériopathie oblitérante périphérique, de survenue précoce, et représentent en général le principal critère de gravité de la maladie. Des situations cliniques de claudication intermittente sur artériopathie oblitérante des membres inférieurs sont rapportées chez des adolescents. Une symptomatologie digestive à type de diarrhées chroniques, rectorragies, et douleurs abdominales sont parfois constatées en cas d'atteinte des artères digestives. Les atteintes coronariennes, ainsi que neurovasculaires, sont aussi rapportées, mais les complications cardiologiques graves sont rares.

Histologie :

La suspicion clinique de PXE rassemblant les signes dermatologiques, l'examen ophtalmologique et les signes fonctionnels neurovasculaires ou digestifs est confirmée par l'examen anatomopathologique. La biopsie cutanée est la plus communément réalisée car facile d'accès. L'association d'une élastorrhexie à une fixation de sels de calcium sur les fibres élastiques du derme réticulaire est pathognomonique de la maladie.

Diagnostic :

Il est posé sur l'association de trois critères majeurs :

- Atteinte cutanée typique
- Examen histologique associant élastorrhexie et calcifications des fibres élastiques.
- Examen ophtalmologique mettant en évidence des stries angioïdes.

Les tests génétiques ne sont pas utilisés en routine pour le diagnostic individuel, mais plutôt lors des enquêtes familiales.

Physiopathologie :

Elle est encore incomplètement élucidée. Le chapitre 1.1 de la Deuxième Partie résume l'état actuel des connaissances, amenant à l'élaboration de ce projet d'étude.

Thérapeutique :

Il n'existe à ce jour pas de traitement démontré efficace contre le PXE. L'absence de compréhension parfaite de la physiopathologie de la maladie ne permet pas pour l'instant d'enrayer l'apparition des calcifications ectopiques.

La prise en charge des malades est actuellement complexe et repose essentiellement sur le dépistage des complications ophtalmologiques et cardiovasculaires. Il importe de traiter les facteurs de risque cardiovasculaire efficacement, et d'éviter les situations ou activités physiques à risque de complications oculaires.

Les atteintes cutanées sévères peuvent parfois bénéficier d'une chirurgie plastique réparatrice, ou de traitement à visée esthétique par laser fractionné.

2. Etat de la recherche sur le pseudoxanthome élastique dans le service de Dermatologie du CHU d'Angers

La banque de données (BDD) de patients atteints de PXE du service de Dermatologie du CHU d'Angers compte (au 07/10/2018) 172 patients au diagnostic certain, et 12 patients au diagnostic encore incertain. La file active de patients, en additionnant les patients seulement vus en consultation et les patients mineurs, dépasse 200 cas.

Les patients de la BDD sont convoqués tous les 3 à 4 ans, en l'absence de complication, en hospitalisation de semaine dans le service. Cela représente un passage d'environ un patient par semaine ouvrable en hospitalisation. Le protocole d'examens cliniques et paracliniques est standardisé : consultation dermatologique, consultation ophtalmologique, consultation cardiologique, bilans biologiques sanguins et urinaires, biopsie cutanée si nécessaire, angio-scanner coronarien, échographie cardiaque trans-thoracique, échographie-doppler artériel des membres inférieurs et supérieurs.

La BDD de patients atteints de PXE ainsi constituée permet notamment de les classer simplement selon la sévérité de leur pathologie.

Ainsi, nous distinguons chez 105 patients distincts (recherche clinique non publiée, année 2017) des critères de gravité cardiovasculaire, ophtalmologique et hémorragique.

- Critères de gravité cardiovasculaires : accident vasculaire cérébral avec image scannographique ou clinique compatible, ou infarctus du myocarde ayant nécessité un geste de revascularisation. Le score d'Agatston (évaluation scannographique de la calcification coronarienne) est calculé également chez les patients PXE de la cohorte.
- Critères de gravité ophtalmologiques : cécité centrale mono ou binoculaire
- Critères de gravité hémorragiques : hémorragie digestive dont l'origine ne peut être attribuée à une autre pathologie.

Ces critères établis peuvent ainsi permettre de rechercher une corrélation entre différents paramètres étudiés dans les recherches cliniques du service et la gravité clinique du PXE.

3. Place de cette étude et collaborateurs

L'effectif de l'étude IMPROVE s'élèvera à 20 patients inclus au total. Cela représente 11.6% de l'effectif de patients de la BDD du service. A raison d'une inclusion d'un patient tous les 10 jours environ et en comptabilisant les jours de fermeture du service (vacances, fériés), nous avons anticipé une période d'un an d'inclusion.

Comme abordé ci-dessus dans l'introduction, le service de Dermatologie du CHU d'Angers a fait appel à deux collaborateurs scientifiques, impliqués dans les domaines abordés dans ce protocole de recherche.

Laboratoire BIOFORTIS :

BIOFORTIS a été créée en 2002 pour développer des produits « Nutrition santé ». Cette start-up avait pour objectif de permettre aux entreprises agro-alimentaires de réaliser des études cliniques chez l'homme selon les mêmes standards que ceux de l'industrie pharmaceutique. BIOFORTIS a réalisé au total plus de 300 Etudes cliniques depuis Chicago, Shanghai, São Paulo et Nantes.

En parallèle des études cliniques, BIOFORTIS assure le Séquençage Nouvelle Génération (NGS) du microbiote intestinal pour mesurer notamment l'impact de pré- et probiotiques.

Le NGS, également connu sous le nom de séquençage à haut débit, est un terme commun utilisé pour décrire différentes technologies de séquençage génétique moderne. Il permet la fragmentation, l'amplification, le séquençage et l'identification du matériel génétique de n'importe quel organisme vivant, et ce très rapidement.

Pr Schurgers L.J. :

Professeur de Biochimie à l'université de Maastricht, le Pr Schurgers est spécialisé dans la biochimie de la calcification vasculaire. Il est l'auteur principal ou co-auteur de 162 publications scientifiques, dont de nombreux articles traitant du rôle de la vitamine K dans la calcification artérielle. Certains de ces articles seront cités dans la suite de ce travail.

Le laboratoire de Biochimie de l'université de Maastricht a ainsi acquis une grande expérience dans le dosage des multiples formes de vitamine K.

Le Pr Schurgers a déjà collaboré avec le service de Dermatologie du CHU d'Angers et le Pr Martin L. pour la publication de deux articles concernant le pseudoxanthome élastique ^(40, 41).

DEUXIEME PARTIE : ELABORATION DU PROTOCOLE D'ETUDE

Le document suivant est le protocole d'étude finalisé, soumis et accepté par le comité d'éthique du CHU d'Angers.

L'étude IMPROVE se base sur ce document.

**Etude du microbiote intestinal et des taux des
différentes formes moléculaires de vitamine K
circulante chez les patients PXE
(Intestinal microbiota and vitamin K levels in PXE
patients – the IMPROVE Study)**

Investigateur coordonnateur :

Professeur Ludovic MARTIN

Service de Dermatologie, CHU d'Angers

Investigateurs associés :

- Laboratoire Biofortis, Nantes

- Pr L. Schurgers, Université de Maastricht, NL

<p>Qualification de la recherche</p> <p>Recherche sur données</p>
<p>Contexte et justification de la recherche</p> <p>Le déficit en vitamine K participe au phénomène de calcification pathologique qui est à la base de l'atteinte clinique des patients présentant un pseudoxanthome élastique (PXE). Il est également établi qu'une partie importante de la vitamine K utilisée par l'organisme est produite par le microbiote intestinal.</p>
<p>Objectifs et critères d'évaluation</p> <p>L'objectif principal de notre projet est de rechercher une corrélation entre la composition du microbiote intestinal, la concentration plasmatique des différentes espèces moléculaires de vitamine K et la sévérité du phénotype PXE.</p>
<p>Schéma et déroulement de la recherche</p> <ul style="list-style-type: none"> - Recherche sur données. - Cession d'échantillons de selles et de sang collectés pour la bio-collection PXE du CHU d'Angers déclarée sous le n° DC 20116-14-67 avec l'autorisation de cession n°2016-27-99. - Bio-collection conservée au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU d'Angers sous la responsabilité scientifique du Pr L. MARTIN. - Les échantillons de selles seront cédés à Biofortis pour l'analyse du microbiote digestif et les échantillons plasmatiques au Pr L. Schurgers pour les mesures des espèces moléculaires de vitamine K.
<p>Critères de non-inclusion</p> <ul style="list-style-type: none"> - Patient mineur - Patient ayant refusé de participer à l'étude, ou n'étant pas apte à signer le consentement de bio-collection.
<p>Recueil et mode de circulation des données</p> <p>Les échantillons seront stockés et anonymisés par les initiales des patients et le numéro d'inclusion dans l'étude au CRB. Ils intégreront la biocollection PXE du CHU d'Angers déclarée sous le n° DC 20116-14-67, avec l'autorisation de cession : n°2016-27-99.</p> <p>La bio-collection est conservée au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU d'Angers sous la responsabilité scientifique du Pr L. MARTIN.</p> <p>Les échantillons de selles stockés au CRB seront cédés au laboratoire Biofortis (Nantes) pour l'analyse du microbiote digestif. A cet effet un contrat de collaboration avec le laboratoire Biofortis a été signé.</p> <p>Les échantillons plasmatiques stockés au CRB seront cédés au Pr L. Schurgers, Université de Maastricht, NL. A cet effet un contrat de collaboration a été signé.</p>

Nombre d'échantillons étudiés

Échantillons de selles et de plasma provenant de 20 patients différents inclus.

Durée de la recherche

Durée maximale de la période d'inclusion : 1 an.

Retombées attendues et perspectives

L'analyse du microbiote intestinal des patients PXE inclus permettra de rechercher un lien significatif éventuel entre sa composition, le taux plasmatique des espèces moléculaires de vitamine K et la sévérité du pseudoxanthome élastique.

1. Contexte et justification scientifique de la recherche

1.1. Etat actuel des connaissances

1.1.1. Le PXE est une maladie métabolique calcifiante :

Le PXE est une maladie génétique rare (incidence : 1/40000 naissances), autosomique récessive, caractérisée par un processus de calcification tissulaire ectopique cutanée, rétinienne et vasculaire. Le gène responsable de cette affection code pour un transporteur membranaire (*ABCC6*) principalement localisé aux niveaux hépatique et rénal. Le PXE est donc considéré comme une pathologie métabolique systémique.

Le phénotype clinique de PXE est extrêmement variable d'un sujet à l'autre, y compris au sein d'une même famille, ce qui sous-entend une implication « environnementale ».

1.1.2. Place du pyrophosphate inorganique :

Le substrat transporté par *ABCC6* et les mécanismes de calcification ectopique restent encore mal connus à ce jour. Il a été récemment montré que le déficit fonctionnel de *ABCC6* était associé à une baisse du taux plasmatique de pyrophosphate inorganique (PPI) ^(1,2) et participerait à hauteur de 60% dans la calcification ⁽³⁾. La baisse du taux de pyrophosphate inorganique ne constitue donc pas le seul mécanisme responsable des calcifications ectopiques.

Un des facteurs influençant la sévérité du PXE pourrait être un déficit en vitamine K, par baisse de sa biodisponibilité ou de son recyclage interne. Il est en effet clairement établi que le taux sérique de vitamine K1 est plus faible dans la population PXE que dans les populations contrôles saines ^(4,5,6,7,8).

1.1.3. Différentes espèces moléculaires de Vitamine K :

Les vitamines K appartiennent à la famille biochimique des quinones. Elles se distinguent entre elles par la nature de la chaîne carbonée attachée au noyau quinone (dite « chaîne latérale »). On différencie trois grandes formes de vitamine K (K1, K2 et K3) par leur composition biochimique et leur provenance.

Vitamine K1 :

La vitamine K1 (phylloquinone, PK) est caractérisée par une chaîne latérale phytyle. Elle a une origine exclusivement végétale exogène.

Vitamine K2 :

Les vitamines K2 (ménaquinones, MK) contiennent une chaîne latérale terpénoïde de longueur variable (4 à 13 unités de prenyl) ⁽⁹⁾. On distingue ainsi plusieurs sous-types de ménaquinones : de MK4 à MK13 (Figure 1).

Les vitamines K2 sont synthétisées par de nombreuses bactéries ^(9,10,11,12,13,14) : elles sont retrouvées dans les aliments fermentés (environ 25% des ménaquinones retrouvées chez l'homme proviennent de l'alimentation), et produites directement par le microbiote intestinal ⁽¹⁵⁾. A titre d'exemple, les MK10 et MK11 sont produites par le genre *Bacterioides*, MK8 par *Enterobacteria*, MK7 par *Veillonella* et MK6 par *Eubacterium lentum* ⁽⁹⁾ (résumé des productions bactériennes de VK2 dans le Tableau 1). Le site d'absorption des ménaquinones d'origine microbienne pourrait être l'iléon terminal où l'absorption médiée par les sels biliaires est possible ⁽¹⁶⁾.

Il est à noter que la MK4 semble avoir une provenance partiellement endogène (transformation d'un précurseur inconnu au niveau de la paroi vasculaire, à partir de vitamines K1 ou K2), dont le mécanisme exact est encore mal compris.

Vitamine K3 :

La vitamine K3 (ménadione), une forme exclusivement synthétique de précurseur de la vitamine K, n'est plus utilisée dans l'alimentation humaine. Elle ne dispose pas de chaîne latérale ^(15,17,18).

Réserves disponibles :

Les réserves en vitamine K sont relativement faibles, et sont exclusivement hépatiques. Elles sont constituées de 90% de ménaquinones pour 10% de phylloquinone et prédominent sur les MK7 à 13 ^(9,19).

Les réserves de vitamine K sont très labiles en raison d'une demie-vie faible. Dans des conditions d'insuffisance alimentaire grave, elles peuvent être réduites à environ 25% des concentrations initiales en 3 jours seulement ⁽⁹⁾. Les mammifères disposent alors d'un système efficace de production endogène de vitamine K2 via le microbiote intestinal.

Formes circulantes et biodisponibilité :

La principale forme circulante de vitamine K est la phylloquinone. Les MK-7 et MK-8 sont également présentes, mais les formes hépatiques courantes MK9 à 13 ne sont pas détectables en routine dans le plasma ^(9,12).

La biodisponibilité des vitamines K1 et K2 est faible, estimé à 30 à 40% ⁽⁹⁾.

1.1.4. Vitamine K et calcifications vasculaires ; notion de gamma-carboxylation et protéines vitamine K-dépendantes (VKD)

Les ménaquinones d'origine microbienne jouent un rôle important chez l'homme en contribuant aux besoins en vitamine K, notamment en prévenant une coagulopathie cliniquement significative lors d'une insuffisance épisodique ou de réduction des apports alimentaires en vitamine K ⁽¹⁴⁾.

Fonctions de la Vitamine K : au delà de la coagulation :

La vitamine K permet la maturation de protéines régulatrices de la calcification qui font partie du groupe des protéines vitamine K dépendantes (VKD) ⁽²⁰⁾. La vitamine K est en effet un cofacteur essentiel d'une carboxylase (GGCX) dans la γ -carboxylation de résidus de glutamate des Glu-protéines. L'oxydation de la vitamine K-hydroquinone (KH₂) en vitamine K-époxyde (KO) fournit l'énergie requise pour la formation de γ -carboxyglutamate au sein des Gla-protéines (forme active de ces protéines) ^(17,20) (Figure 2).

L'enzyme GGCX est présente dans le foie ainsi que dans une grande variété de tissus dont l'os et la peau ⁽²¹⁾. Les Gla-protéines sont impliquées dans la coagulation sanguine (facteurs II, VII, IX, X d'origine hépatique), dans le métabolisme osseux (ostéocalcine), dans la croissance cellulaire et l'apoptose (Gas6), ainsi que dans l'inhibition de la calcification tissulaire et vasculaire (via la protéine Matrix Gla-Protéine - MGP) ^(11,20,22,39).

La MGP semble être la protéine vitamine K-dépendante clé dans l'inhibition de la calcification vasculaire ^(21,23) : sa concentration sérique diminue fortement lors d'un traitement anticoagulant par antivitamine-K, provoquant des calcifications artérielles majeures ^(24,25,26). De plus, chez les souris dépourvues de MGP, on observe la présence significative de

calcifications artérielles, provoquant la mort des animaux ⁽²⁷⁾. La supplémentation en vitamine K (K1 ou K2) du modèle murin et chez l'homme permet une réduction significative des calcifications artérielles, notamment coronariennes, et une réduction de la mortalité par événement cardio-vasculaire ^(28,29). Enfin, il est établi que la concentration sérique de MGP activée est diminuée chez les patients PXE, en association avec un taux sérique de vitamine K bas ^(5,7). L'ensemble de ces données indique la responsabilité indirecte de la vitamine K dans les calcifications pathologiques qui sont observées dans la population PXE.

Biodisponibilité et prépondérance de la vitamine K2 :

Toutes les formes de vitamine K sont cofacteurs pour cette γ -carboxylation : la phylloquinone et les ménaquinones sont ainsi utilisées pour la gamma-carboxylation hépatique, bien qu'il y ait des différences d'affinité aux différents substrats ⁽¹²⁾.

Chez le rat, les calcifications artérielles induites par la warfarine ne sont réversibles qu'avec des doses très élevées de vitamine K1 (x 200) alors que des doses « physiologiques » de vitamine K2 sont suffisantes pour diminuer la présence et l'impact de ces calcifications ⁽²⁵⁾.

D'autres études semblent souligner la plus grande (voir l'exclusive) efficacité des ménaquinones (vitamines K2) par rapport à la phylloquinone (vitamine K1) dans la diminution des calcifications vasculaires et de leurs complications ^(30,31,32,33,34,35).

1.1.5. Microbiote intestinal et Vitamine K2 :

Généralités sur le microbiote intestinal :

La biologie moléculaire a permis d'élaborer un arbre phylogénétique chez les procaryotes. Ainsi les procaryotes sont divisés en deux domaines : le domaine Archaeobacteria et le domaine Bacteria. C'est ce dernier que l'on retrouve dans la flore intestinale. Le domaine Bacteria est divisé en phyla, eux-mêmes divisés en classes puis en ordres, familles, genres et enfin espèces.

On compte 10^{14} bactéries hébergées par un être humain, pour 10^{13} cellules eucaryotes le composant. Dans la flore intestinale on retrouve majoritairement quatre phyla du domaine Bacteria. Elles sont importantes en nombre mais aussi en tant qu'acteur du métabolisme du contenu intestinal. On retrouve donc :

Le phylum des Firmicutes qui représente environ 60 voire 75% du microbiote. Dans ce phylum on retiendra les classes les plus représentées, à savoir :

- la classe Clostridia et surtout les genres Clostridium et Eubacterium, très présents.
- la classe Bacilli avec le genre Bacillus qui prédomine.

Vient ensuite le phylum des Bacteroidetes soit 30 à 40 % des phyla. Dans ce phylum on retiendra le genre Bacteroides qui est prépondérant avec le genre Prevotella ;

Les deux derniers phyla sont : Actinobacteria et Proteobacteria.

Dans le phylum Actinobacteria, c'est le genre Bifidobacterium qui est majoritaire.

Dans le phylum Proteobacteria, on retiendra les genres Helicobacter et Escherichia.

La composition définitive du microbiote digestif compte plus de 35000 espèces différentes à l'acquisition du microbiote digestif final à l'âge de 3 ans ⁽³⁶⁾ (Figure 3).

Les chercheurs du projet européen MetaHIT, coordonné par le centre de recherche de l'INRA, ont publié en mars 2010 le premier séquençage de l'ensemble des gènes des bactéries hébergées par le tube digestif humain, ou métagénome. Les individus se répartissent en trois groupes distincts, et cette classification, comme celle des groupes sanguins, est spécifique des individus, ce qui a amené les chercheurs à utiliser la notion d' «entérotypes».

Synthèse de vitamine K par le microbiote intestinal :

Les bactéries intestinales synthétisant la vitamine K2 sont principalement les Bacteroides (surtout Bacteroides fragilis (MK 9-12), Bacteroides disiens et Bacteroides bivius) et Escherichia coli (qui compose environ 80% de la flore intestinale aérobie). On peut citer également et dans une moindre mesure Klebsiella pneumoniae, Propionibacterium, Eubacterium, Arachnia propionica, Veillonella parvula en tant que producteurs de ménaquinones ⁽¹⁰⁾. Les principaux producteurs de ménaquinones, Escherichia coli et Bacteroides, se trouvent dans les selles dans les quantités physiologiques respectives de 5 et 9 log10 CFU/g de poids sec ⁽¹⁶⁾.

Le Tableau 1 résume les différentes productions de ménaquinones selon les genre et espèces bactériennes, à partir des données citées plus haut.

On estime que 75% des apports de vitamine K2 totaux ont une origine bactérienne intestinale ⁽¹⁵⁾. De plus, un dosage des ménaquinones sur tissu hépatique (modèle animal) a montré que l'administration d'antibiotiques diminue brutalement la quantité tissulaire de ménaquinones (70 vs. 423 pmol/g), appuyant ainsi le rôle du microbiote intestinal dans la production de Vitamine K2 ⁽¹⁶⁾.

1.1.6. Étude préliminaire : absence de corrélation du taux de Vitamine K1 et la gravité clinique du PXE.

Il est établi que le taux sérique de vitamine K1 est plus faible dans la population PXE que dans les populations contrôles saines ^(4,5,6,7,26). Pourtant une étude rétrospective transversale effectuée dans le service de dermatologie du CHU d'Angers n'a pas montré de lien entre la concentration sérique en vitamine K1 et la gravité clinique du PXE cardio-vasculaire, ophtalmologique, cutanée ou « hémorragique » (données non publiées).

De plus, malgré qu'une étude sur des patients PXE supplémentés en vitamine K1 ait montré une efficacité de la supplémentation sur les concentrations de MGP activée, il n'existe pour l'instant aucune réponse clinique, chez l'homme ou sur modèle murin ^(8,37,38).

Il apparaît donc que la vitamine K1 sérique n'est pas un bon marqueur pronostique pour le PXE.

1.1.7. Objectifs de l'étude :

En résumé :

- Les vitamines K2 ont un rôle dans la gamma-carboxylation, et donc un effet protecteur contre les calcifications, plus important que celui de la vitamine K1.
- La majorité des apports des vitamines K2 provient du microbiote digestif : l'analyse de celui-ci permettra donc possiblement d'éclairer le métabolisme des ménaquinones chez les patients PXE.

L'objectif principal de l'étude est de rechercher une corrélation entre la composition du microbiote intestinal, la concentration plasmatique des différentes espèces moléculaires de vitamine K dosables, et la sévérité du phénotype PXE.

1.2. Hypothèses de la recherche

La composition de la flore intestinale détermine majoritairement la quantité de vitamine K2 disponible, et peut donc participer au phénotype calcifiant et influencer le phénotype clinique pathologique du PXE.

1.3. Justification des choix méthodologiques

Le laboratoire Biofortis de Nantes est reconnu pour sa grande expérience de l'étude du microbiote intestinal, et pour sa capacité à séquencer le microbiome digestif en utilisant une méthode de méta-séquençage. Il pourra ainsi classer les patients prélevés dans les groupes d'entérotypes connus et comparer ces prélèvements au séquençage de microbiote de patients sains.

Le laboratoire d'analyses biologiques du Pr Schurgers (Maastricht) est rompu aux dosages des concentrations sériques de vitamine K circulantes.

2. Objectifs de la recherche et critères d'évaluation

2.1. Objectif et critère d'évaluation principal

L'objectif principal de l'étude est de rechercher une corrélation entre la composition du microbiote intestinal, la concentration plasmatique des différentes espèces moléculaires de vitamine K dosables , et la sévérité du phénotype PXE.

2.2. Objectifs et critères d'évaluation secondaires

Il n'existe pas de critère d'évaluation secondaire.

3. Conception de la recherche

3.1. Schéma de la recherche

Le CHU d'Angers a constitué une collection d'échantillons biologiques intitulée « Exploration clinico-biologique d'une cohorte de patients atteints de Pseudoxanthome Elastique (PXE) » déclarée sous le n°DC 20116-14-67 avec une autorisation de cession : n°2016-27-99. Cette biocollection conservée au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU d'Angers sous la responsabilité scientifique du Pr MARTIN.

Le CHU d'Angers s'appuie sur cette biocollection pour mener un projet de recherche non interventionnelle intitulé : « IMProVE » dont l'objectif principal est de rechercher une corrélation entre la composition du microbiote intestinal, les taux des différentes espèces moléculaires de vitamines K, et la sévérité du phénotype pseudoxanthome élastique (PXE). Le responsable scientifique du Projet est le Professeur Ludovic MARTIN, du service de dermatologie du CHU, inscrit au tableau du conseil départemental de l'Ordre des médecins

du Maine-et-Loire, identifié au Répertoire Partagé des Professionnels de Santé sous le numéro 10002083698.

Le Projet comprend l'analyse de microbiote digestif dans les selles de plusieurs patients atteints du PXE et l'analyse de prélèvements plasmatiques pour la mesure de la concentration des vitamines K. Les échantillons de selles collectés seront cédés à Biofortis pour analyse du microbiote digestif ; les échantillons plasmatiques seront cédés au Pr L. Schurgers pour la mesure des vitamines K.

Pour cette cession, un contrat de transfert de matériel biologique et de données a été signé par le représentant du Directeur du CHU d'Angers, le CRB, le Pr MARTIN et Biofortis.

3.2. Justification du nombre d'échantillons à inclure dans la recherche

Les échantillons étudiés pour cette étude proviendront de 20 patients différents.

S'agissant d'une maladie rare et de données inexistantes au préalable, il est impossible de définir la distribution qualitative des populations bactériennes. Un effectif de 20 patients est prévu en accord avec notre capacité de recrutement actuel (2 ou 3 patients hospitalisés pour bilan par mois).

La population sera comparée à une population de référence (volontaires sains de la base existante du Biofortis) appariée en âge et en sexe.

4. Sélection des échantillons de la recherche

4.1. Critères d'inclusion des échantillons étudiés

Les échantillons étudiés seront sélectionnés à partir d'échantillons de patients répondant aux critères suivants :

- Patient atteint d'un PXE diagnostiqué sur des critères cliniques et histologiques, selon les recommandations en vigueur
- Patient âgé de 18 ans et plus
- Patient informé ayant signé le consentement pour la biocollection PXE du CHU d'ANGERS déclarée sous le n°DC 20116-14-67 avec une autorisation de cession : n°2016-27-99.

5. Déroulement de la recherche

Après cession par le CRB, les échantillons seront étudiés par le laboratoire Biofortis et le service du Pr Shurgers, les données recueillies seront transmises au Pr Martin selon les modalités du contrat de collaboration.

5.1. Pré-sélection / Recrutement

Les échantillons proviennent de patients atteints de PXE et recrutés lors de leur bilan clinique et paraclinique multidisciplinaire qui se déroule en hospitalisation dans le service de dermatologie du CHU d'ANGERS.

6. Statistiques

L'analyse statistique sera réalisée par le laboratoire Biofortis : comparaison du groupe PXE et du groupe contrôle contenu dans la base de données du laboratoire Biofortis.

7. Gestion des données

7.1. Modalités de recueil des données

La saisie des données sera réalisée par l'investigateur et le TEC en simple saisie sur la base de données EPIDATA-PXE-dermatologie déjà existante.

7.2. Circuit des données et confidentialité

Les personnes ayant un accès direct aux données prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus. Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel (selon les conditions définies par les articles 226-13 et 226-14 du code pénal).

Les données sont recueillies de manières codées, elles ne doivent en aucun cas faire apparaître en clair les noms des personnes concernées ni leur adresse. Seule la première lettre du nom du participant et la première lettre de son prénom sont recueillies. Les participants seront identifiés par un numéro composé du numéro d'ordre d'inclusion dans le centre.

Une liste de correspondance sera conservée dans chaque centre sous la responsabilité de l'investigateur principal du centre. Cette liste sera conservée pendant la durée réglementaire prévue pour ce type de recherche.

7.3. Droit d'accès aux données et documents sources

Conformément aux Bonnes Pratiques Cliniques :

- le promoteur de la recherche est chargé d'obtenir l'accord de l'ensemble des parties impliquées dans la recherche afin de garantir l'accès direct à tous les lieux de déroulement de la recherche, aux données source, aux documents source et aux rapports dans un but de contrôle de la qualité et d'audit par le promoteur de la recherche.
- les investigateurs mettent à disposition des personnes chargées du suivi, du contrôle de la qualité, de l'audit de la recherche ou, le cas échéant, d'inspections par les autorités compétentes, les documents et données individuelles strictement nécessaires à ce contrôle, conformément aux dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

7.4. Archivage

L'investigateur et le promoteur s'assurent de la conservation des documents et des données relatives à la recherche selon la réglementation en vigueur. Les moyens employés pour conserver ces documents essentiels doivent permettre que ces documents restent complets et lisibles tout au long de la période de conservation requise.

8. Considérations éthiques et réglementaires

8.1. Qualification de la recherche

Recherche sur données.

8.2. Comité d'éthique et Autorité compétente

Comité d'éthique du CHU d'Angers.

8.3. Traitement des données à caractère personnel - CNIL

Les données associées à ce projet sont celles utilisées dans le cadre des projets PXE et de la bio-collection associée gérée au CRB du CHU d'ANGERS.

9. Règles relatives à la publication

Les communications et rapports scientifiques correspondant à cette étude seront réalisés sous la responsabilité de l'investigateur coordonnateur de l'étude en collaboration avec les co-investigateurs principaux et les scientifiques associés. Les coauteurs du rapport et des publications seront les investigateurs et les cliniciens impliqués, au prorata de leur contribution à l'étude, ainsi que le méthodologiste et/ou le biostatisticien et les chercheurs associés.

L'étude fait l'objet d'une publication et/ou d'une présentation scientifique spécifique. Sauf accord spécifique, aucun des volets de l'étude ne doit faire l'objet d'une présentation orale ou d'un poster avant acceptation du manuscrit correspondant dans une revue référencée.

LE CHU D'ANGERS EST MENTIONNE DANS TOUTES LES PUBLICATIONS CONCERNANT L'ETUDE.

TROISIEME PARTIE :

ANTICIPATION DES RESULTATS ET PERSPECTIVES

1. Anticipation des résultats

Chaque situation possible est décryptée, en fonction de la présence ou de l'absence de différences significatives sur les paramètres mesurés.

Ce paragraphe est résumé par un organigramme (Figure 4).

En cas de différence significative du microbiote chez patients sains et PXE :

Cette différence significative peut être qualitative ou quantitative.

Une différence qualitative du microbiote digestif signifierait l'absence ou la présence inhabituelle d'une bactérie donnée, productrice ou non de vitamine K. Une différence qualitative des taux plasmatiques de vitamine K signifierait l'absence ou la présence inhabituelle d'une certaine forme moléculaire de vitamine K. Ces deux résultats sont peu probables, mais constitueraient une avancée importante dans la compréhension de la physiopathologie du PXE.

Une différence quantitative des deux paramètres mesurés est plus probable : un taux plasmatique faible en une forme moléculaire de vitamine K, ou un nombre moins important d'une ou plusieurs bactéries productrices de vitamine K dans le microbiote digestif permettrait d'appuyer une hypothèse de physiopathologie du PXE centrée sur le rôle des ménaquinones.

Dans les deux cas, les résultats obtenus pourront alors être croisés avec les critères de sévérité de la maladie utilisés par le service de dermatologie du CHU d'Angers, pour trouver une éventuelle corrélation entre ces différences et la sévérité de la maladie.

En cas de résultats dissociés entre microbiote et taux de vitamine K :

Si seuls les microbiotes diffèrent significativement entre patients PXE et sujets contrôles de la base Biofortis, il importera de vérifier par la suite que la ou les bactéries différentes sont

bien productrices de vitamine K : si non, l'hypothèse d'un autre rôle du microbiote devra être recherchée.

Si seuls les taux de vitamine K diffèrent significativement, l'hypothèse d'une mauvaise absorption digestive des vitamines K sécrétées par le microbiote digestif devra être explorée.

En cas d'absence de différence significative entre patients sains et PXE, sur le microbiote et les taux plasmatiques de vitamine K :

L'hypothèse avancée du rôle du microbiote digestif dans la physiopathologie du PXE ne sera alors pas vérifiée. A noter que la taille de l'échantillon réduit de 20 patients pourrait alors être incriminée.

Il faut aussi souligner la différence entre microbiote fécal et microbiote caecal : le premier est retrouvé dans les selles, et le deuxième est constitué de bactéries retrouvées sur biopsie colique en endoscopie. Certaines bactéries adhèrent effectivement à la paroi colique, expliquant la différence entre ces deux microbiotes qui pourrait être la cause d'un éventuel résultat négatif de l'étude. L'étude du microbiote caecal fait en revanche appel à un geste invasif non dénué de risque, et semble bien plus complexe à mettre en œuvre.

2. Perspectives de recherche et perspectives thérapeutiques

En cas de différence significative entre les microbiotes des patients PXE et le microbiote « normal », il sera par la suite important de confirmer ce résultat avec une étude de plus grande puissance, sur la cohorte européenne des patients PXE incluse dans le programme EuroSoftCalcNet (COST 16-115).

Des pistes thérapeutiques pourraient être alors explorées, afin de modifier le microbiote intestinal de ces patients : apports de probiotiques, essais de cure d'antibiothérapie, tests de transplantation de microbiote fécal (dont la seule indication reconnue à ce jour en pratique clinique est l'infection à *Clostridium difficile* récidivante)...

Un essai de surcharge exogène en vitamines K2 sur modèle murin de PXE pourrait être également envisagé en fonction des résultats de l'étude IMPROVE.

L'étude de la physiopathologie du PXE comporte plusieurs volets, et certains prendront encore plus d'importance en cas de résultat négatif de l'étude IMPROVE. Ainsi d'autres perspectives de recherche sont actuellement en cours d'étude dans le service de Dermatologie du CHU d'Angers :

- Etude PIPAL : étude du rôle des phosphatases alcalines non tissu-spécifiques dans la régulation de l'équilibre entre phosphate et PPI (collaboration CHU de Nice).
- Etude CRHiPS : Collection biologique de cellules rénales pour l'étude fonctionnelle du transporteur ABCC6.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Jansen RS, Duijst S, Mahakena S, Sommer D, Szeri F, Váradi A, et al. ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* sept 2014;34(9):1985-9.
- [2] Jansen RS, Küçükosmanoglu A, de Haas M, Sapthu S, Otero JA, Hegman IEM, et al. ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. *Proc Natl Acad Sci USA.* 10 déc 2013;110(50):20206-11.
- [3] Pomozi V, Brampton C, van de Wetering K, Zoll J, Calio B, Pham K, et al. Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice. *Am J Pathol.* juin 2017;187(6):1258-72.
- [4] Gheduzzi D, Boraldi F, Annovi G, DeVincenzi CP, Schurgers LJ, Vermeer C, et al. Matrix Gla protein is involved in elastic fiber calcification in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab Invest.* oct 2007;87(10):998-1008.
- [5] Hendig D, Zarbock R, Szliska C, Kleesiek K, Götting C. The local calcification inhibitor matrix Gla protein in pseudoxanthoma elasticum. *Clin Biochem.* avr 2008;41(6):407-12.
- [6] Li Q, Jiang Q, Schurgers LJ, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum: reduced gamma-glutamyl carboxylation of matrix gla protein in a mouse model (Abcc6-/-). *Biochem Biophys Res Commun.* 14 déc 2007;364(2):208-13.
- [7] Vanakker OM, Martin L, Schurgers LJ, Quaglino D, Costrop L, Vermeer C, et al. Low serum vitamin K in PXE results in defective carboxylation of mineralization inhibitors similar to the GGCX mutations in the PXE-like syndrome. *Lab Invest.* juin 2010;90(6):895-905.
- [8] Gorgels TGMF, Waarsing JH, Herfs M, Versteeg D, Schoensiegel F, Sato T, et al. Vitamin K supplementation increases vitamin K tissue levels but fails to counteract ectopic calcification in a mouse model for pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med.* nov 2011;89(11):1125-35.
- [9] Shearer MJ, Bach A, Kohlmeier M. Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *J Nutr.* 1996;126(4 Suppl):1181S-6S.
- [10] Ramotar K, Conly JM, Chubb H, Louie TJ. Production of menaquinones by intestinal anaerobes. *J Infect Dis.* août 1984;150(2):213-8.
- [11] Shearer MJ. Vitamin K. *Lancet.* 28 janv 1995;345(8944):229-34.

- [12] Walther B, Karl JP, Booth SL, Boyaval P. Menaquinones, bacteria, and the food supply: the relevance of dairy and fermented food products to vitamin K requirements. *Adv Nutr.* 1 juill 2013;4(4):463-73.
- [13] Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol Rev.* sept 1982;46(3):241-80.
- [14] Conly JM, Stein K. The production of menaquinones (vitamin K₂) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Prog Food Nutr Sci.* déc 1992;16(4):307-43.
- [15] Beulens JWJ, Booth SL, van den Heuvel EGHM, Stoecklin E, Baka A, Vermeer C. The role of menaquinones (vitamin K₂) in human health. *Br J Nutr.* oct 2013;110(8):1357-68.
- [16] Conly JM, Stein K. Quantitative and qualitative measurements of K vitamins in human intestinal contents. *Am J Gastroenterol.* mars 1992;87(3):311-6.
- [17] Schurgers LJ, Teunissen KJF, Hamulyák K, Knapen MHJ, Vik H, Vermeer C. Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K₁ and natto-derived menaquinone-7. *Blood.* 15 avr 2007;109(8):3279-83.
- [18] Suttie JW. The importance of menaquinones in human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:399-417.
- [19] Usui Y, Tanimura H, Nishimura N, Kobayashi N, Okanoue T, Ozawa K. Vitamin K concentrations in the plasma and liver of surgical patients. *Am J Clin Nutr.* mai 1990;51(5):846-52.
- [20] Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* déc 2004;2(12):2118-32.
- [21] Cranenburg ECM, Schurgers LJ, Vermeer C. Vitamin K: the coagulation vitamin that became omnipotent. *Thromb Haemost.* juill 2007;98(1):120-5.
- [22] McCann JC, Ames BN. Vitamin K, an example of triage theory: is micronutrient inadequacy linked to diseases of aging? *Am J Clin Nutr.* oct 2009;90(4):889-907.
- [23] Shearer MJ. Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* nov 2000;3(6):433-8.
- [24] Shanahan CM, Proudfoot D, Farzaneh-Far A, Weissberg PL. The role of Gla proteins in vascular calcification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1998;8(3-4):357-75.

- [25] Schurgers LJ, Spronk HMH, Soute BAM, Schiffers PM, DeMey JGR, Vermeer C. Regression of warfarin-induced medial elastocalcinosis by high intake of vitamin K in rats. *Blood*. 1 avr 2007;109(7):2823-31.
- [26] Li Q, Guo H, Chou DW, Harrington DJ, Schurgers LJ, Terry SF, et al. Warfarin accelerates ectopic mineralization in *Abcc6(-/-)* mice: clinical relevance to pseudoxanthoma elasticum. *Am J Pathol*. avr 2013;182(4):1139-50.
- [27] Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 6 mars 1997;386(6620):78-81.
- [28] Theuwissen E, Smit E, Vermeer C. The role of vitamin K in soft-tissue calcification. *Adv Nutr*. 1 mars 2012;3(2):166-73.
- [29] Shea MK, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Dallal GE, Dawson-Hughes B, Ordovas JM, et al. Vitamin K supplementation and progression of coronary artery calcium in older men and women. *Am J Clin Nutr*. juin 2009;89(6):1799-807.
- [30] Vermeer C, Shearer MJ, Zittermann A, Bolton-Smith C, Szulc P, Hodges S, et al. Beyond deficiency: potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health. *Eur J Nutr*. déc 2004;43(6):325-35.
- [31] Geleijnse JM, Vermeer C, Grobbee DE, Schurgers LJ, Knapen MHJ, van der Meer IM, et al. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *J Nutr*. nov 2004;134(11):3100-5.
- [32] Gast GCM, de Roos NM, Sluijs I, Bots ML, Beulens JWJ, Geleijnse JM, et al. A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. sept 2009;19(7):504-10.
- [33] Beulens JWJ, Bots ML, Atsma F, Bartelink M-LEL, Prokop M, Geleijnse JM, et al. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis*. avr 2009;203(2):489-93.
- [34] Brandenburg VM, Schurgers LJ, Kaesler N, Püsche K, van Gorp RH, Leftheriotis G, et al. Prevention of vasculopathy by vitamin K supplementation: can we turn fiction into fact? *Atherosclerosis*. mai 2015;240(1):10-6.
- [35] Caluwé R, Pyfferoen L, De Boeck K, De Vriese AS. The effects of vitamin K supplementation and vitamin K antagonists on progression of vascular calcification: ongoing randomized controlled trials. *Clin Kidney J*. avr 2016;9(2):273-9.

[36] Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 7 août 2015;21(29):8787-803.

[37] Carrillo-Linares JL, García-Fernández MI, Morillo MJ, Sánchez P, Rioja J, Barón FJ, et al. The Effects of Parenteral K1 Administration in Pseudoxanthoma Elasticum Patients Versus Controls. A Pilot Study. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:86.

[38] Brampton C, Yamaguchi Y, Vanakker O, Van Laer L, Chen L-H, Thakore M, et al. Vitamin K does not prevent soft tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum. *Cell Cycle*. 1 juin 2011;10(11):1810-20.

[39] Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun*. 2012;3:1245.

[40] Vanakker OM, Martin L, Schurgers LJ, Quaglino D, Costrop L, Vermeer C, Pasquali-Ronchetti I, Coucke PJ, De Paepe A. Low serum vitamin K in PXE results in defective carboxylation of mineralization inhibitors similar to the GG CX mutations in the PXE-like syndrome. *Lab Invest*. 2010;90(6):895-905

[41] Le Boulanger G, Labrèze C, Croué A, Schurgers LJ, Chassaing N, Wittkamp T, Rutsch F, Martin L. An unusual severe vascular case of pseudoxanthoma elasticum presenting as generalized arterial calcification of infancy. *Am J Med Genet A*. 2010;152A(1):118-23

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formes biochimiques des sous-types de vitamine K : menadione (A), phylloquinone (B), menaquinone 4 (C) et menaquinone-N+1 (D)

Figure 2 : Carboxylation des Glu-protéines en Gla-protéines activées, via les protéines vitamines K dépendantes

Figure 3 : Composition du microbiote intestinal en fonction de la localisation.

Figure 4 : Anticipation des résultats : organigramme de synthèse

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Résumé des synthèses de ménaquinones par les principales bactéries du microbiote intestinal.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	
RESUME	
INTRODUCTION	
PREMIERE PARTIE	
1. Généralités sur le pseudoxanthome élastique	
2. Etat de la recherche sur le pseudoxanthome élastique dans le service de Dermatologie du CHU d'Angers	
3. Place de cette étude et collaborateurs	
DEUXIEME PARTIE : ELABORATION DU PROTOCOLE D'ETUDE	
1. Contexte et justification scientifique de la recherche	
1.1. Etat actuel des connaissances	
1.2. Hypothèses de la recherche	
1.3. Justification des choix méthodologiques	
2. Objectifs de la recherche et critères d'évaluation	
2.1. Objectif et critère d'évaluation principal	
2.2. Objectifs et critères d'évaluation secondaires	
3. Conception de la recherche	
3.1. Schéma de la recherche	
3.2. Justification du nombre d'échantillons à inclure dans la recherche	
4. Sélection des échantillons de la recherche	
4.1. Critères d'inclusion des échantillons étudiés	
5. Déroulement de la recherche	
5.1. Pré-sélection / Recrutement	
6. Statistiques	
7. Gestion des données	
7.1. Modalités de recueil des données	
7.2. Circuit des données et confidentialité	
7.3. Droit d'accès aux données et documents sources	
7.4. Archivage	
8. Considérations éthiques et réglementaires	
8.1. Qualification de la recherche	
8.2. Comité d'éthique et Autorité compétente	
8.3. Traitement des données à caractère personnel - CNIL	
9. Règles relatives à la publication	
TROISIEME PARTIE : ANTICIPATION DES RESULTATS ET PERSPECTIVES	
1. Anticipation des résultats	
2. Perspectives de recherche et perspectives thérapeutiques	
BIBLIOGRAPHIE	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
TABLE DES MATIERES	
ANNEXES	

ANNEXES

Figure 1 :

Formes biochimiques des sous types de vitamine K : menadione (A), phyloquinone (B), menaquinone 4 (C) et menaquinone-N+1 (D).

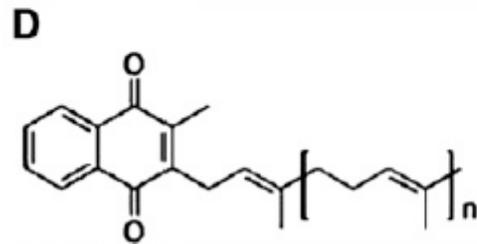
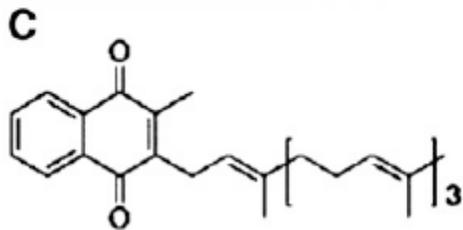
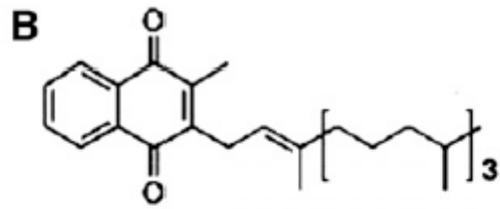
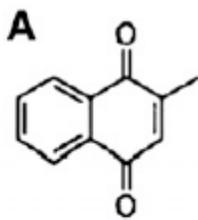


Figure 2 :

Carboxylation des Glu-protéines en Gla-protéines (forme active), via les protéines vitamines K dépendantes

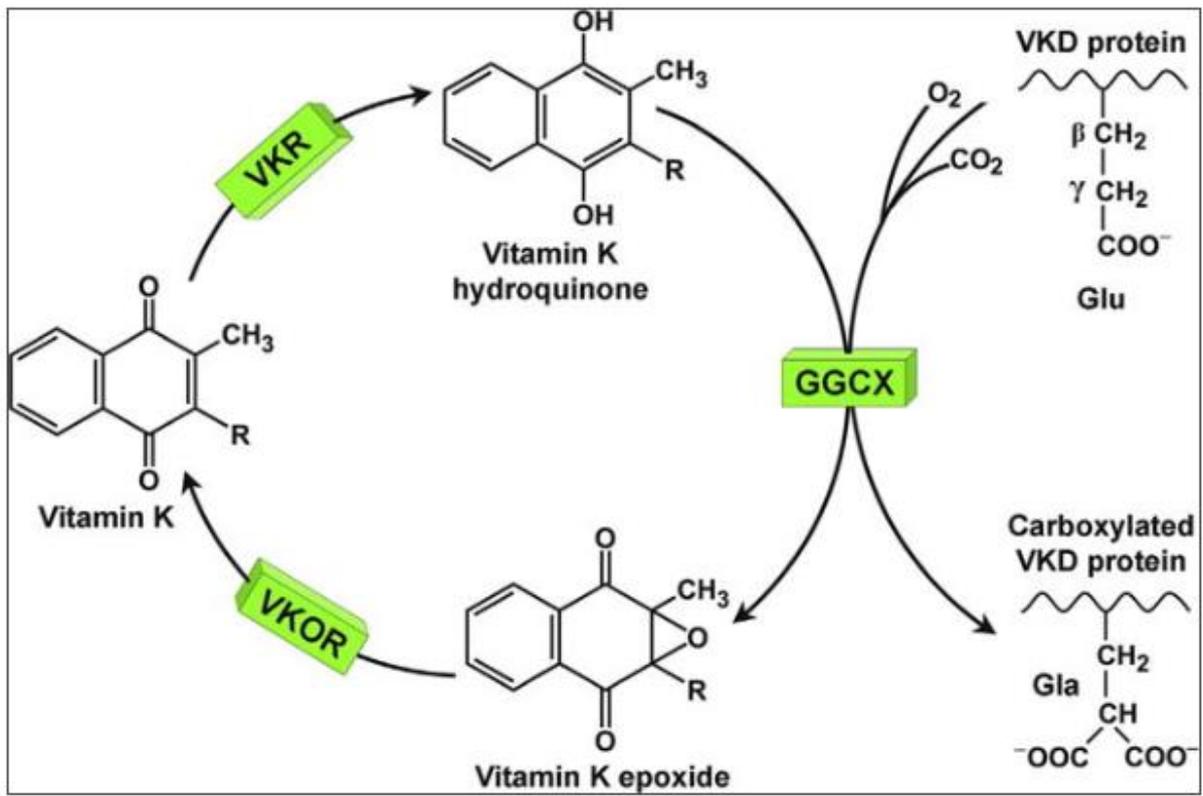


Figure 3 :

Composition du microbiote intestinal en fonction de la localisation.

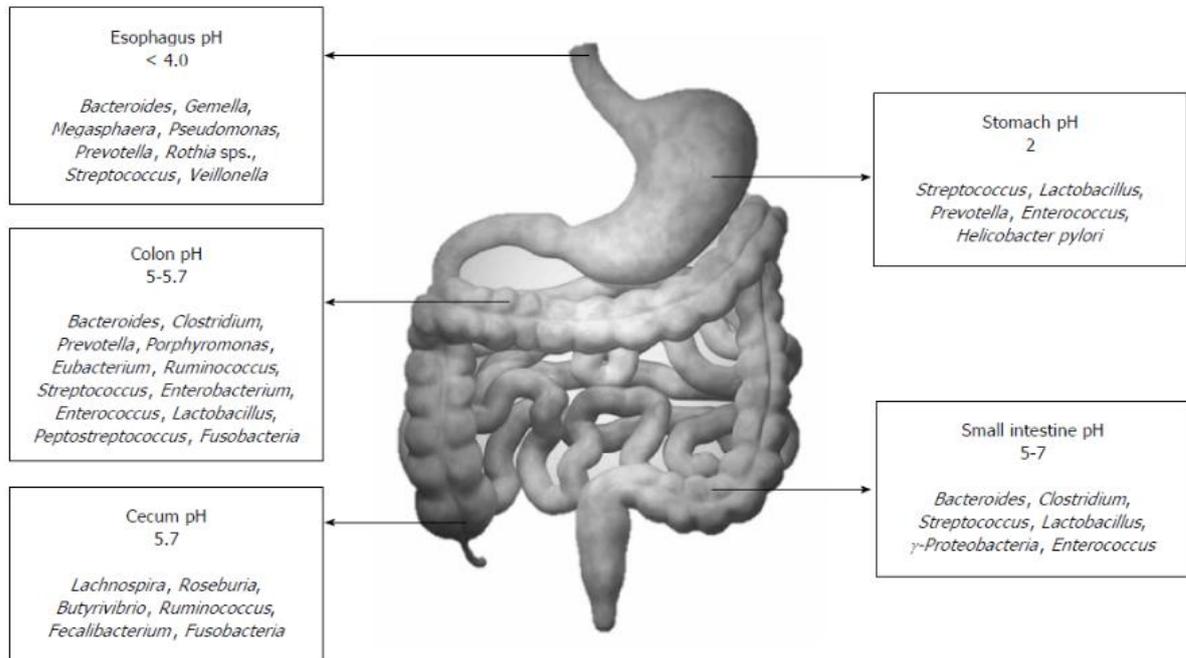


Figure 4 :

Anticipation des résultats : organigramme de synthèse

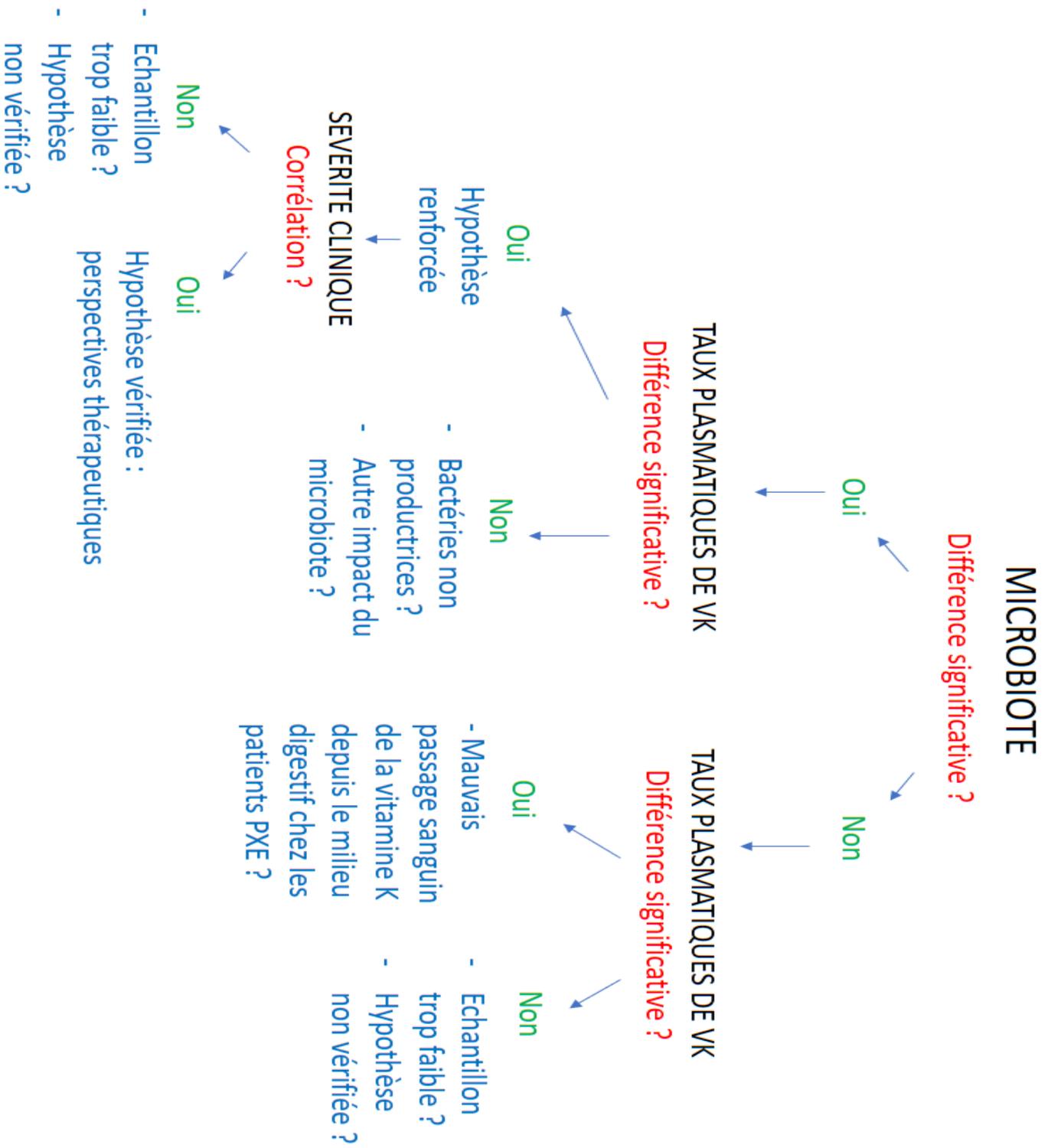


Tableau 1 : Résumé des synthèses de ménaquinones par les principales bactéries du microbiote intestinal.

Genre	Espèce	Vitamine K synthétisée
<i>Bacteroides</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Bacteroides fragilis</i> - <i>Bacteroides disiens</i> - <i>Bacteroides bivius</i> 	MK 9 à MK 12
<i>Klebsiella</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Klebsiella pneumoniae</i> 	MK 8
<i>Escherichia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Escherichia Coli</i> 	MK 8
<i>Propionibacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Propionibacterium acnes</i> - <i>Propionibacterium jensenii</i> - <i>Propionibacterium arabinosum</i> - <i>Propionibacterium shermani</i> 	MK 9
<i>Pseudopropionibacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Arachnia Propionica</i> 	MK 7
<i>Veillonella</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Veillonella Parvula</i> - <i>Veillonella criceti</i> - <i>Veillonella dispare</i> - <i>Veillonella rodentium</i> 	MK 7 à 9 ou MK 7 à 12 selon les sources
<i>Eubacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Eubacterium Lentum</i> 	Non détaillé
<i>Actinomyces</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Actinomyces bovis</i> - <i>Actinomyces israelii</i> - <i>Actinomyces odontolyticus</i> - <i>Actinomyces naeslundii</i> - <i>Actinomyces viscosus</i> 	MK 10
<i>Wolinella</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Wolinella curva</i> - <i>Wolinella recta</i> - <i>Wolinella succinogenes</i> 	MK 6

CHASSAIN Kevin

Elaboration du protocole de recherche IMPROVE

Etude du microbiote intestinal et des taux des différentes formes moléculaires de vitamine K circulante chez les patients présentant un pseudoxanthome élastique.

RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse est d'élaborer le protocole de recherche de l'étude IMPROVE.

L'étude IMPROVE vise à analyser le microbiote intestinal et les taux des différentes formes moléculaires de vitamine K circulante chez les patients présentant un pseudoxanthome élastique (PXE).

Le PXE est une maladie génétique rare, autosomique récessive, caractérisée par un processus de calcification tissulaire ectopique cutanée, rétinienne et vasculaire. Le phénotype clinique de PXE est très variable d'un sujet à l'autre, y compris au sein d'une même famille, ce qui sous-entend une implication « environnementale ».

Il a été montré qu'un des facteurs influençant la sévérité du PXE pourrait être un déficit en vitamine K (VK), notamment par sa responsabilité indirecte dans les calcifications pathologiques qui sont observées dans la population PXE.

On distingue plusieurs sous-types de VK, dont certains sont produits directement par le microbiote intestinal.

La VK d'origine microbienne joue un rôle important chez l'homme, notamment en prévenant une coagulopathie cliniquement significative lors d'une insuffisance ou réduction des apports alimentaires en VK.

L'analyse du microbiote intestinal des patients PXE inclus dans l'étude IMPROVE permettra de rechercher un lien significatif entre sa composition, le taux plasmatique des formes moléculaires de vitamine K circulante et la sévérité du PXE.

A terme, cela permettra une meilleure compréhension des mécanismes d'apparition des calcifications ectopiques dans le PXE.

Mots-clés : pseudoxanthome élastique ; microbiote intestinal ; vitamine K ; calcification vasculaire

Development of the IMPROVE research protocol

Study of the intestinal microbiota and the levels of the different molecular forms of circulating vitamin K in patients with a pseudoxanthoma elasticum.

ABSTRACT

The objective of this thesis is to develop the research protocol of the IMPROVE study.

The IMPROVE study aims to analyze the intestinal microbiota and the levels of the different molecular forms of circulating vitamin K in patients with a pseudoxanthoma elasticum (PXE).

PXE is a rare genetic disease, autosomal recessive, characterized by a process of ectopic tissue calcification cutaneous, retinal and vascular. The clinical phenotype of PXE is very variable from one subject to another, even within the same family, which implies an "environmental" implication.

It has been shown that one of the factors influencing the severity of PXE could be vitamin K deficiency (VK), including its indirect responsibility for pathological calcifications observed in the PXE population.

There are several subtypes of VK, some of which are produced directly by the gut microbiota.

VK of microbial origin plays an important role in humans, in particular by preventing clinically significant coagulopathy during a deficiency or reduction of food intake in VK.

The analysis of the intestinal microbiota of PXE patients included in the IMPROVE study will make it possible to find a significant link between its composition, the plasma level of circulating vitamin K molecular forms and the severity of PXE.

Ultimately, this will allow a better understanding of the mechanisms of appearance of ectopic calcifications in PXE.

Keywords : **pseudoxanthoma elasticum ; intestinal microbiota ; vitamin K ; vascular calcification**