



HAL
open science

Développement d'une application oropharyngée de lactobacilles pour lutter contre les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*

Youenn Alexandre

► **To cite this version:**

Youenn Alexandre. Développement d'une application oropharyngée de lactobacilles pour lutter contre les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*. Bactériologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2014. Français. NNT : 2014BRES0046 . tel-02110713

HAL Id: tel-02110713

<https://theses.hal.science/tel-02110713>

Submitted on 25 Apr 2019

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

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

UBO

université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie-Santé

École Doctorale SICMA

présentée par

Youenn Alexandre

Préparée à Brest

Développement d'une
application oropharyngée
de lactobacilles pour lutter
contre les infections
respiratoires à
Pseudomonas aeruginosa

Thèse soutenue le 17 mars 2014

devant le jury composé de :

Karine Faure

Professeur Universitaire - Praticien Hospitalier,
CHRU de Lille - Université de Lille / *Rapporteur*

Hervé Blottière

Directeur de Recherche, INRA Jouy-en-Josas / *Rapporteur*

Muriel Derrien

Chercheur, Danone Research, Palaiseau / *Examineur*

Jérôme Mounier

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Examineur*

Gwénaëlle Le Blay

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Directrice de thèse*

Rozenn Le Berre

Maître de Conférences Universitaire - Praticien Hospitalier,
CHRU de Brest - Université de Bretagne Occidentale / *Co-directrice de thèse*



Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Karine Faure, Muriel Derrien, Hervé Blottière et Jérôme Mounier. Merci à vous d'avoir accepté de consacrer du temps et de l'énergie à l'évaluation de ce travail.

Ce travail ayant été réalisé au sein du LUBEM, je tiens donc à remercier Georges Barbier qui en était le directeur au moment de mon arrivée.

Merci à vous, Gwénaëlle et Rozenn, mes directrices de thèse. Vous m'avez permis de réaliser cette thèse et de la mener à terme. Travailler à vos côtés m'a été bénéfique en terme de connaissances tant théoriques que pratiques. Vos expériences professionnelles et vos expertises différentes ont été des atouts importants lors de la conduite de ce travail et également, à titre personnel, source d'un enrichissement extraordinaire. Merci également pour le temps et l'énergie que vous avez investis afin de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Merci Stéphanie de m'avoir accompagné dès mes débuts au sein du LUBEM qui remontent à... loin ! Merci pour ta gentillesse, ton aide, ton soutien dans les moments les plus difficiles. Tu es un vrai pilier au sein de l'équipe de bactérioviro et sans toi, beaucoup de résultats ne figureraient pas dans ce manuscrit. Merci pour tout !

Je tiens également à remercier Nolwenn qui nous a permis de mener à bien les expérimentations de culture cellulaire, malgré tous les obstacles que nous avons pu rencontrer. Je te dois beaucoup. Cela a été un vrai plaisir d'apprendre

et de travailler à tes côtés.

Merci Danielle pour tes nombreux coups de main tout au long de cette thèse. J'ai aimé travailler avec toi et profiter de ta faculté à contourner les obstacles du quotidien.

Merci Marie-Sarah pour ton aide lors des expérimentations animales. Tu as joué ton rôle d'anesthésiste à la perfection ! Je te souhaite le meilleur pour ta thèse, que les lactobacilles soient avec toi !

Merci Karim pour avoir si gentiment proposé de relire ce manuscrit et de m'avoir fait profiter de ta biblio-expertise.

Merci également Giny, Sylvie et Sophie pour votre gentillesse, pour avoir participé à ma formation au cours de ces quelques années passées ensemble. Merci pour toutes les discussions que nous avons pu avoir. C'était un plaisir de travailler avec vous.

Merci à Camille et à Rocio pour votre joie de vivre si communicative et pour votre participation à la vie du laboratoire.

Que serait le LUBEM sans Marie-Hélène ? Je te remercie du fond du cœur pour ta bonne humeur (quasi-) permanente. Je suis heureux de te connaître et de t'avoir côtoyée ces quelques années. J'espère que tu prendras soin de tes petits herbivores comme tu as pris soin de moi, ils seront les plus heureux du monde !

Merci Julien, le seul, l'unique, mon ami, mon témoin. On a traversé de sacrés moments pendant ces trois années de thèse. Nos longues discussions, si rares ces derniers temps, mais tellement enrichissantes, ont été un réel plaisir ! Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci également à Vanessa, Céline (je ne dévoilerai pas votre surnom ici) et Kévin, dont j'ai partagé le bureau et qui m'ont accueilli à Plouzané avec toute leur bonne humeur ! Je vous souhaite un maximum de réussite pour la suite de vos thèses respectives.

Merci Sandy, même si j'aurais aimé partager plus longtemps ton bureau. Tes conseils experts m'ont été d'un grand secours au début de cette thèse. Merci également à Émilie et Antoine pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Sylvie T., merci pour les hectolitres de milieu que tu as pu me préparer ainsi que pour ta gentillesse et ton humour. Merci également Stella de m'avoir permis de disposer du matériel dont j'ai pu avoir besoin au cours de ces travaux ou encore pour avoir permis la réalisation de certaines expérimentations. Merci Franck pour ton aide logistique. Merci Christophe de m'avoir bien dépanné à l'occasion. Merci Marielle pour ton aide lors des sempiternelles tracasseries administratives.

Merci Valérie de ne pas m'avoir mis à la porte les nombreuses fois où je cherchais Nolwenn. Merci également Anne-Cécile, Audrey, Florian, Gaëtan B., Gaëtan, Guillaume, Jean-Luc, Marion, Rachelle, Sophie.

Merci également à Emmanuel Coton et Christopher Payan de m'avoir accueilli au sein de leurs équipes respectives.

À tous les membres de l'équipe de Plouzané : Merci !

Merci à Séverine, Marie-Françoise et Emmanuel, de l'animalerie, de nous avoir permis de réaliser nos expérimentations dans les meilleures conditions possibles ainsi que pour leur aide technique. Merci au CHRU de la Cavale-Blanche, à Didier Tandé et Marie-Christine Legrand-Quillien du pôle de biologie, pour leur support tant matériel que technique. Merci au centre d'investigation clinique de la Cavale-Blanche et particulièrement à Emmanuel Nowak et Maelenn Guillou pour leur aide lors de l'analyse de nos résultats. Merci au LEMAR et en particulier à Adeline Bidault qui nous ont permis d'utiliser leur matériel. Merci à Olivier Mignen, Tristan Montier, Réginald et Mattias pour leur aide lors des expérimentations de culture cellulaire.

Les plus grands mercis à ma famille ! À mes parents tout d'abord, qui ne sont probablement pas étrangers à mon goût pour la biologie en général

et pour la microbiologie en particulier. Vous avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui, je vous en serai éternellement reconnaissant ! Merci Briec ! Ton accueil lors de mes montées à la capitale m'a fait très plaisir et m'a bien rendu service. Disposer d'un expert ès-métrie est un atout précieux pour ne pas rater l'ouverture d'un congès ! Merci Mad, ma Grand-Mère qui m'a permis d'obtenir ce fameux baccalauréat, sans lequel rien de tout cela n'aurait été possible. Merci également à ma belle-famille, qui l'est devenue officiellement pendant cette thèse. Jean, Marie-Françoise, Paul-Édouard, Marc-Étienne : vous êtes des gens formidables, merci de votre soutien.

Enfin, je dédie cette thèse à celle qui est devenue ma femme le 18 août 2012. Claire-Alice, tu m'as soutenu (et supporté) durant toute cette thèse. Vivre à tes côtés est une chance formidable et tu es largement impliquée dans l'aboutissement de ce travail. Je ne pourrai jamais te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi.

Valorisation des travaux

Articles :

Alexandre, Y., Le Blay, G., Boisramé-Gastrin, S., Héry-Arnaud, G., Gouriou, S., Vallet, S. et Le Berre, R. (2014). "Probiotics : A new way to fight bacterial pulmonary infections?." *Médecine et maladies infectieuses*. 44 (1), p. 9-17.

Alexandre, Y., Le Berre, R., Barbier, G. et Le Blay, G. (2014) "Screening of *Lactobacillus* spp. for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections." *BMC Microbiology*. 14 (1).

Communication orale nationale :

Colloque des jeunes chercheurs de l'association Vaincre La Mucoviscidose, Paris, 26 février 2013. "Les lactobacilles, une nouvelle arme contre *Pseudomonas aeruginosa*?"

Autre communication orale :

Journée des doctorants de l'école doctorale SICMA, Lorient, 13 septembre 2012. "Développement d'une flore de barrière oropharyngée à activité dirigée contre *Pseudomonas aeruginosa*."

Poster :

31ème Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuses, Paris, 1 et 2 décembre 2011. "Les bactéries lactiques, une nouvelle arme contre *Pseudomonas aeruginosa*?"

Abréviations

- ADN** Acide Désoxyribonucléique
- AHL** Acyl Homosérine Lactone
- ARN** Acide Ribonucléique
- ATCC** *American Type Culture Collection*
- BHI** Brain Heart Infusion
- BPCO** Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
- CAP** *Community-Acquired Pneumonia*
- CFTR** *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*
- DMEM** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- ECEH** *Escherichia coli* Entérohémorragique
- ECEP** *Escherichia coli* Entéropathogène
- ECR** *Elastin-Congo Red*
- EDTA** *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- ELISA** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- GALT / MALT** *Gut* ou *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*
- G-CSF / GM-CSF** *Granulocyte* ou *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*
- IAS** Infections Associées aux Soins
- IFN** Interféron
- IL** Interleukine
- LAMVAB** *Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin And Bromo-*

cresol green

LBA Lavage Broncho-Alvéolaire

LPS Lipolysaccharide

LTA Acide Lipotéichoïque

MALDI-ToF *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*

MAPK *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MCP *Monocyte Chemoattractant Protein*

MDR PA *Multi-Drug Resistant Pseudomonas aeruginosa*

MRS de Man, Rogosa et Sharpe

MRSA *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*

NF- κ B *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NK *Natural Killer*

OMS / WHO *Organisation Mondiale de la Santé / World Health Orga-*

nization

OTU *Operational Taxonomic Unit*

PBS *Phosphate Buffered Saline*

PFGE *Pulsed Field Gel Electrophoresis*

PNN *Polynucléaire Neutrophile*

TER *Transepithelial Resistance*

TLR *Toll-Like Receptor*

TNF *Tumor Necrosis Factor*

VAI *Voies Aériennes Inférieures*

VAP *Ventilator-Acquired Pneumonia*

VAS *Voies Aériennes Supérieures*

Table des matières

1	Introduction	10
1.1	Contexte	12
1.2	L'appareil respiratoire	14
1.2.1	Le microbiote des voies aériennes supérieures	18
1.2.2	Le microbiote des voies aériennes inférieures	20
1.3	Les infections respiratoires	21
1.3.1	Les infections associées aux soins	22
1.3.2	Les infections communautaires	22
1.3.3	Les infections sur terrains particuliers	23
1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
1.4.1	Généralités	24
1.4.2	Infections respiratoires à <i>P. aeruginosa</i>	25
1.4.3	Facteurs de virulence	26
1.5	Les antibiotiques : une faillite programmée?	33
1.6	Les probiotiques	34
1.6.1	Mécanismes d'action	36
1.6.2	Probiotiques et risques éventuels	48
1.6.3	Probiotiques et voies respiratoires	49
1.7	Le modèle cellulaire	57
1.8	Le modèle animal	58
1.9	Hypothèses et objectifs	61

2	Matériels et méthodes	63
2.1	Bactéries	65
2.2	Isolement et identification de lactobacilles oraux	67
2.2.1	Isolement de lactobacilles	67
2.2.2	Identification préliminaire des isolats	68
2.3	Sensibilité de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 aux acides organiques et aux pH acides	69
2.4	Effets des lactobacilles sur <i>P. aeruginosa</i> PAO1	69
2.4.1	Effets sur la croissance	69
2.4.2	Effets sur la production de biofilm	72
2.4.3	Effets sur l'activité élastolytique	75
2.5	Caractérisation des isolats actifs contre <i>P. aeruginosa</i> PAO1	76
2.5.1	Clonalité	76
2.5.2	Identification	77
2.5.3	Croissance	80
2.5.4	Antibiorésistances	81
2.6	Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	82
2.6.1	Mise au point du modèle cellulaire	82
2.6.2	Culture des cellules A549	83
2.6.3	Préparation des inoculums bactériens	83
2.6.4	Mesure des effets des bactéries sur les cellules A549	85
2.7	Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	86
2.7.1	Préparation des inoculums bactériens	87
2.7.2	Modalités d'administration des bactéries	87
2.8	Statistiques	92

Table des matières

3	Résultats	93
3.1	Isolement et identification de lactobacilles oraux	95
3.2	Sensibilité de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 aux acides organiques et aux pH acides	97
3.3	Effets des lactobacilles sur <i>P. aeruginosa</i> PAO1	99
3.3.1	Effets sur la croissance	99
3.3.2	Effets sur la production de biofilm	102
3.3.3	Effets sur l'activité élastolytique	102
3.4	Caractérisation des isolats actifs contre <i>P. aeruginosa</i> PAO1 . .	104
3.4.1	Clonalité	104
3.4.2	Identification	104
3.4.3	Croissance	105
3.4.4	Antibiorésistances	109
3.5	Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	109
3.5.1	Effets des bactéries sur la viabilité des cellules A549 . . .	109
3.5.2	Effets des bactéries sur la sécrétion de cytokines	111
3.6	Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	115
3.6.1	Prophylaxie avec une administration de lactobacilles . .	115
3.6.2	Prophylaxie avec deux administrations de lactobacilles .	118
4	Discussion	123
4.1	Isolement de lactobacilles oraux	124
4.2	Criblage <i>in vitro</i>	125
4.3	Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	129
4.3.1	Modèle cellulaire d'infection à <i>P. aeruginosa</i> PAO1 . . .	129

4.3.2	Effets des lactobacilles et de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sur la viabilité des cellules A549	132
4.3.3	Effets des lactobacilles et de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sur la sécrétion de cytokines par les cellules A549	134
4.4	Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	136
4.4.1	Modèle murin de pneumonie à <i>P. aeruginosa</i> PAO1 . . .	136
4.4.2	Effet des lactobacilles sur la charge pulmonaire en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	139
4.4.3	Effets des lactobacilles sur la production pulmonaire de cytokines	141
4.4.4	Clairance des lactobacilles dans les poumons	146
5	Conclusions et perspectives	148
	Bibliographie	152

Liste des tableaux

1.1	Définition de la résistance de <i>P. aeruginosa</i>	32
1.2	Animaux utilisés lors des études sur les pneumonies bactériennes.	58
1.3	Voies d'administration des bactéries dans les modèles murins de pneumonies.	60
2.1	Lactobacilles isolés de laits crus.	66
2.2	Composition du milieu LAMVAB.	67
2.3	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 et acides.	70
2.4	Lactobacilles étudiés lors des tests d'inhibition en double couche et en puits.	73
2.5	Programme de l'électrophorèse en champ pulsé.	77
2.6	Amorces utilisées lors de l'identification par PCR-séquençage.	79
2.7	Cycles d'amplification utilisés lors de l'identification des lactobacilles par PCR-séquençage du gène de l' <i>ARNr 16S</i>	79
2.8	Cycles d'amplification utilisés lors de l'identification des lactobacilles par PCR-séquençage des gènes <i>rpoA</i> et <i>pheS</i>	79
2.9	Composition de la salive artificielle.	81
2.10	Quantités de bactéries administrées aux souris et exprimées en ufc.	91
3.1	Scores MALDI-ToF.	95
3.2	Espèces des lactobacilles isolés chez les volontaires sains.	96

3.3	Résultats des essais d'inhibition en double couche de la croissance de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 par des lactobacilles.	100
3.4	Résultats des essais d'inhibition en double couche de la croissance de <i>S. aureus</i> SA1 par des lactobacilles.	101
3.5	Identification des 8 souches sélectionnées par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF et par galeries API 50 CHL.	106
3.6	Identification des 8 souches sélectionnées par séquençage des gènes <i>ARNr 16s</i> , <i>rpoA</i> et <i>pheS</i>	106
3.7	Numéros d'accession Genbank des séquences <i>ARNr 16S</i> , <i>rpoA</i> et <i>pheS</i>	106

Table des figures

1.1	Le système respiratoire humain.	16
1.2	Bactériologie pulmonaire chez les patients français atteints de la mucoviscidose.	24
1.3	Pourquoi le biofilm ?	29
1.4	Mécanismes d'action des différentes classes d'antibiotiques.	32
1.5	Nouveaux antibactériens à usage systémique approuvés par la FDA par période de 5 ans depuis 1983.	35
1.6	Chronologie des mises sur le marché de nouveaux antibiotiques et d'apparition des premières résistances microbiennes.	35
1.7	Activités antibactériennes des probiotiques.	37
1.8	Renforcement de la barrière épithéliale par les probiotiques.	42
1.9	Activités immunomodulatrices des probiotiques.	44
2.1	Principe du test en double couche.	72
2.2	Principe du test d'inhibition en puits.	74
2.3	Déroulement des expérimentations animales.	90
3.1	Croissance de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 à différents pH et différentes concentrations en acide lactique.	98
3.2	Croissance de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 à différents pH et différentes concentrations en acide acétique.	98

3.3	Effets des lactobacilles sur la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	103
3.4	Effets des lactobacilles sur l'activité élastolytique de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	103
3.5	Croissance des lactobacilles en bouillon MRS.	108
3.6	Croissance des lactobacilles dans une salive artificielle.	110
3.7	Variations de pH lors de la croissance des lactobacilles dans une salive artificielle.	110
3.8	Effets des lactobacilles sur la viabilité des cellules A549 infectées par <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	112
3.9	Effets des bactéries sur la sécrétion d'IL-6 par les cellules A549.	113
3.10	Effets des bactéries sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules A549.	113
3.11	Effets des bactéries sur la sécrétion d'IL-10 par les cellules A549.	114
3.12	Effets des bactéries sur la sécrétion de TNF- α par les cellules A549.	114
3.13	Charges pulmonaires de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 lors de la prophylaxie à une dose de lactobacilles.	116
3.14	Charges pulmonaires en lactobacilles lors de la prophylaxie à une dose de lactobacilles.	116
3.15	Concentrations en IL-6 dans les LBA lors d'une prophylaxie à une dose de lactobacilles.	117
3.16	Concentrations en TNF- α dans les LBA lors d'une prophylaxie à une dose de lactobacilles.	117
3.17	Charges pulmonaires de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 lors de la prophylaxie à deux doses de lactobacilles.	119
3.18	Charges pulmonaires en lactobacilles lors de la prophylaxie à deux doses de lactobacilles.	119

Table des figures

3.19 Concentrations en IL-6 dans les LBA lors d'une prophylaxie à deux administrations de lactobacilles.	121
3.20 Concentrations en TNF- α dans les LBA lors d'une prophylaxie à deux administrations de lactobacilles.	121

CHAPITRE 1

Introduction

1.1	Contexte	12
1.2	L'appareil respiratoire	14
1.2.1	Le microbiote des voies aériennes supérieures	18
1.2.2	Le microbiote des voies aériennes inférieures	20
1.3	Les infections respiratoires	21
1.3.1	Les infections associées aux soins	22
1.3.2	Les infections communautaires	22
1.3.3	Les infections sur terrains particuliers	23
1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
1.4.1	Généralités	24
1.4.2	Infections respiratoires à <i>P. aeruginosa</i>	25
1.4.3	Facteurs de virulence	26
1.5	Les antibiotiques : une faillite programmée ?	33
1.6	Les probiotiques	34
1.6.1	Mécanismes d'action	36
1.6.2	Probiotiques et risques éventuels	48
1.6.3	Probiotiques et voies respiratoires	49
1.7	Le modèle cellulaire	57

1.8	Le modèle animal	58
1.9	Hypothèses et objectifs	61

1.1 Contexte

Les bactéries sont des cellules de taille microscopique qui peuplent l'ensemble des environnements terrestres (aquatiques, telluriques, aériens, végétaux, animaux). Étant données leur répartition, leur diversité, leur biomasse, ce sont probablement les êtres vivants présentant les métabolismes les plus diversifiés sur Terre (WHITMAN et coll. 1998). Le plus souvent, nous ne remarquons leur présence que lorsqu'ils nous rendent malades. C'est l'une des raisons pour lesquelles la microbiologie a d'abord été abordée sous un angle clinique, les bactéries ne pouvant qu'être source de maladie. Suite à l'établissement du postulat de Koch, l'étiologie des maladies infectieuses a longtemps été abordée sous l'angle restrictif d'une interaction hôte-pathogène, sans tenir compte de l'ensemble de l'écosystème dans lequel évolue le pathogène. Or nous savons maintenant que comme la plupart des êtres vivants, les bactéries évoluent dans des écosystèmes, c'est-à-dire l'association d'une biocénose (êtres vivants) et d'un biotope (environnement). Ces écosystèmes impliquent l'existence d'interactions complexes au sein de la biocénose mais également entre la biocénose et le biotope. Ces approches plus globales de la microbiologie, à l'origine du concept d'écologie microbienne, nous ont amenés à revoir notre approche des pathologies humaines. Ces dernières pourraient alors survenir suite à des dysbioses au sein d'un écosystème particulier. Grâce notamment aux avancées technologiques, nous savons aujourd'hui que le corps humain renferme des milliards de bactéries regroupées en microbiotes au sein des différents sites colonisés : microbiotes urogénital, digestif, oral, respiratoire, cutané. Les bactéries associées au corps humain (notamment présentes dans le tube digestif) sont ainsi au moins dix fois plus nombreuses que les cellules humaines (MULLARD 2008), certaines remplissant des fonctions qui nous sont vitales (COSTELLO et coll. 2009 ; NOVERRI et coll. 2004). Les microbiotes associés aux humains sont des mélanges caractéristiques et complexes de micro-organismes

1.1. Contexte

ayant co-évolué avec leurs hôtes. Les espèces qui composent ces communautés varient en fonction des hôtes et sont le résultat de migrations restreintes entre hôtes ainsi que d'interactions écologiques fortes au sein de l'hôte. La diversité de ces communautés est également fonction du régime alimentaire, du génotype ou de l'histoire microbiologique de l'hôte (DETHLEFSEN et coll. 2007). En 2009, Sansonetti décrit ainsi l'Homme comme un hybride « primate-microbes » (SANSONETTI 2013). Le rôle et l'abondance de ces microbiotes associés aux humains sont les raisons pour lesquelles on les compare parfois à des organes virtuels. Ces bactéries qui s'intègrent dans une relation mutualiste avec l'hôte humain et qui participent au maintien de l'homéostasie de son organisme constituent la flore commensale - du latin *cum*, avec, et *mensa*, table - signifiant littéralement « compagnon de table ». Notre microbiote présente une diversité très importante puisqu'il compte 22 phylums différents. Les *Actinobacteria* (36,6 %), les *Firmicutes* (34,3 %), les *Proteobacteria* (11,9 %) et les *Bacteroidetes* (9,5 %) comptent pour 92,3 % de cette diversité (COSTELLO et coll. 2009). Il n'en reste pas moins vrai que certaines bactéries sont capables de provoquer des infections chez l'hôte sain. Une infection est une multiplication d'un micro-organisme dans les tissus de l'hôte qui cause une maladie : on parle alors de bactéries pathogènes. Ces maladies peuvent être plus ou moins graves. Certains pathogènes sont dits opportunistes car ils ne provoquent une maladie que dans des catégories particulières de la population (personnes immunodéprimées, âges extrêmes de la vie, patients hospitalisés...). Traditionnellement, les infections sont soit nosocomiales, c'est-à-dire acquises à l'hôpital (pas d'incubation lors de l'admission et infection déclarée 48 heures après cette admission), soit communautaires, c'est-à-dire acquises à l'extérieur de l'hôpital. Toutefois, une nouvelle catégorie d'infections est apparue récemment, ce sont les infections liées aux soins. Une infection est dite associée aux soins si elle survient « au cours ou à la suite d'une prise en

charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient, et si elle n'était ni présente, ni en incubation au début de la prise en charge » (COMITÉ TECHNIQUE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES ET DES INFECTIONS LIÉES AUX SOINS 2007). Le système respiratoire héberge également un microbiote particulier et peut-être le siège d'infections graves voire fatales. L'un des principaux pathogènes responsables d'infections respiratoires est *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène opportuniste particulièrement problématique chez les patients atteints de la mucoviscidose ou sous ventilation mécanique. Dans leurs écosystèmes respectifs, les micro-organismes entrent en compétition les uns avec les autres afin de survivre et se multiplier. C'est de cette compétition que découle l'une des plus grandes découvertes médicales du début du 20ème siècle, celle des antibiotiques. Ainsi, en découvrant la pénicilline en 1928, Alexandre Fleming a permis de sensiblement améliorer le confort et l'espérance de vie de l'Homme. Les antibiotiques sont des molécules antimicrobiennes le plus souvent produites par des micro-organismes. Cependant, les bactéries se caractérisent également par leurs facultés d'adaptations et certaines d'entre-elles, dont *P. aeruginosa*, peuvent développer des mécanismes de résistance à de nombreux antibiotiques. Il est ainsi devenu indispensable de développer des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques afin de continuer à lutter efficacement contre les infections bactériennes. Les connaissances acquises concernant la diversité, l'importance et le fonctionnement des écosystèmes microbiens chez l'Homme permettent notamment d'envisager la modification du microbiote comme une de ces alternatives.

1.2 L'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire regroupe les différentes structures impliquées dans la respiration (fig. 1.1). Anatomiquement, l'appareil respiratoire est divisé en trois parties : i) les voies aériennes supérieures (nez, bouche, pharynx, larynx),

1.2. L'appareil respiratoire

ii) les voies aériennes inférieures (trachée, bronches) et iii) les poumons (sacs alvéolaires, alvéoles pulmonaires). Microbiologiquement, il est plus simple de considérer l'appareil respiratoire comme constitué des voies aériennes supérieures (VAS), de la bouche et du nez à l'oropharynx, et des voies aériennes inférieures (VAI), de l'oropharynx aux sacs alvéolaires. Les poumons ont pendant longtemps été considérés comme un organe stérile chez l'individu sain. Ce postulat était la conséquence de deux limites principales. La première d'entre elles était la difficulté d'accès aux poumons. La bronchoscopie permet maintenant d'y effectuer des prélèvements, mais cette technique est néanmoins invasive et difficile à justifier d'un point de vue éthique en l'absence de nécessité clinique. De plus, les échantillons prélevés peuvent être contaminés lors du trajet de la sonde, notamment au niveau des voies aériennes supérieures qui possèdent leurs propres écosystèmes microbiens (CHARLSON et coll. 2011). En raison des faibles biomasses concernées, les écosystèmes respiratoires sont d'autant plus menacés par ces contaminations lors des prélèvements. D'autre part, le seul outil disponible jusqu'à l'avènement des techniques de biologie moléculaire était la culture. Or on estime que seul 1 % de la totalité des micro-organismes terrestres peut être cultivé (DEWHIRST et coll. 2010 ; PASTER et coll. 2001) ; on estime que 20 à 30 % des micro-organismes sont cultivables lorsque l'on s'intéresse à l'écosystème humain (HAN et coll. 2012).

La connaissance du microbiote, c'est-à-dire l'ensemble des micro-organismes vivant dans un environnement spécifique, installé dans les voies respiratoires est essentielle pour appréhender la complexité des interactions entre les micro-organismes qui le composent ainsi qu'entre ces micro-organismes et l'hôte. L'avènement des nouveaux outils de biologie moléculaire, en permettant de s'affranchir de la culture des micro-organismes, a profondément modifié notre connaissance du microbiote respiratoire. Ainsi, le poumon était encore très récemment considéré comme stérile chez l'individu sain. Il a été montré, à par-

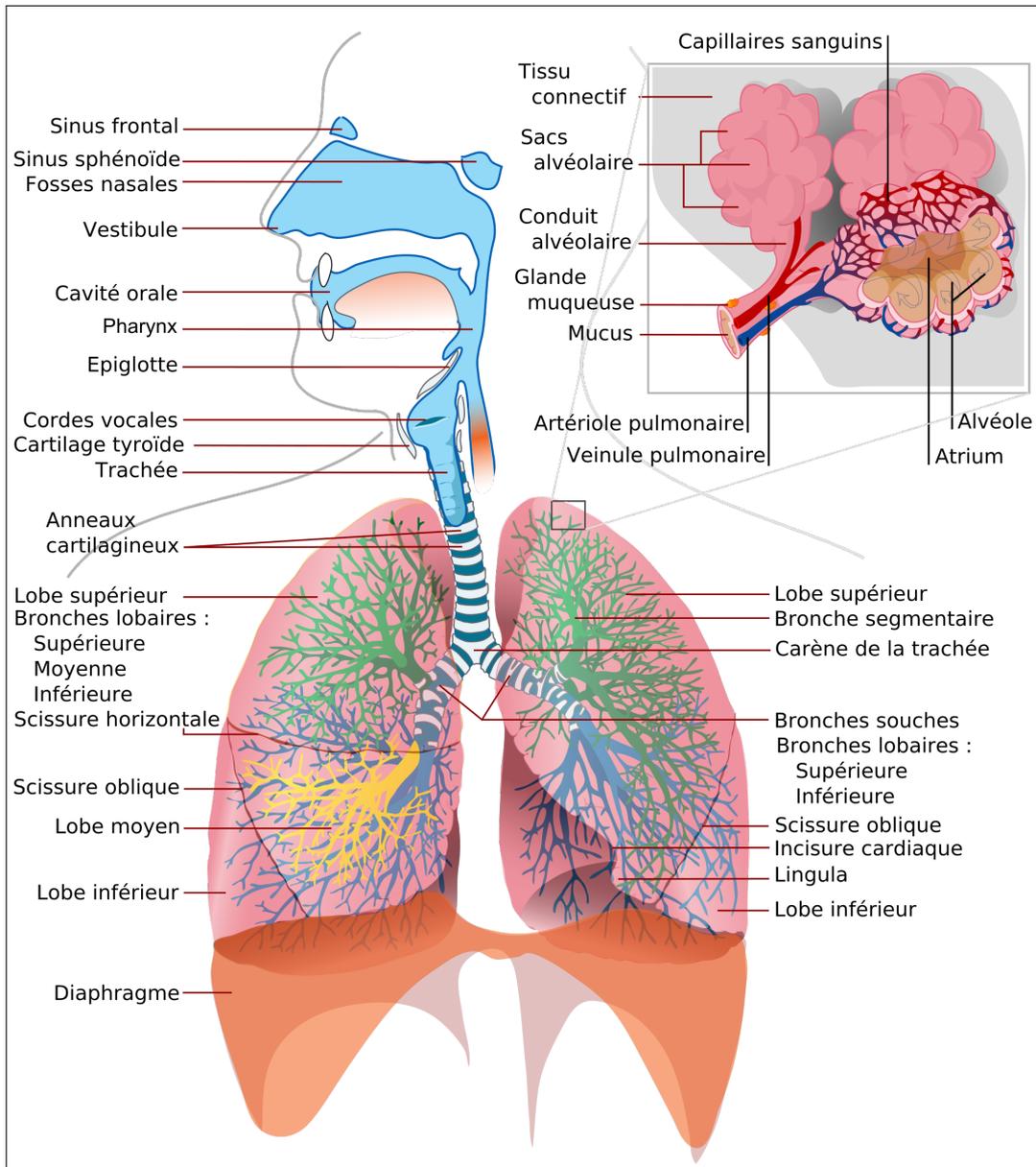


FIGURE 1.1 – Le système respiratoire humain. (Source : wikipedia.org, 2014).

1.2. L'appareil respiratoire

tir de l'analyse de prélèvements respiratoires étagés chez six individus sains par PCR quantitative et pyroséquençage du gène codant l'ARNr 16S, que des bactéries étaient présentes au niveau des alvéoles et des bronchioles. Les communautés bactériennes étaient identiques à celles retrouvées au niveau des voies respiratoires supérieures mais en quantités très inférieures (diminution des concentrations de 2 à 4 logarithmes) (CHARLSON et coll. 2011). Cette continuité des populations bactériennes laisse à penser que l'origine des bactéries alvéolaires se trouverait au niveau des voies respiratoires supérieures, et que la colonisation des voies inférieures pourrait se faire par un mécanisme de micro-inhalation. Dans une autre publication, l'étude du microbiote oral de 3 sujets sains par pyroséquençage du gène codant l'ARNr 16S a permis de mettre en évidence un noyau phylogénétique commun entre individus, alors que d'autres phylotypes étaient spécifiques à chaque individu (ZAURA et coll. 2009).

Parallèlement, et grâce aux mêmes outils, le microbiote pulmonaire a été décrit chez des personnes atteintes de différentes maladies : pneumonie (BOUSBIA et coll. 2012), mucoviscidose (COX et coll. 2010 ; WILLNER et coll. 2009), bronchite chronique obstructive (SZE et coll. 2012), mettant en évidence une complexité microbienne jusqu'à présent très peu explorée. Cette connaissance des différents phylotypes bactériens prédominants chez les sujets sains et chez les malades va notamment permettre d'étudier les modifications induites dans un microbiote lors de pathologies pulmonaires et de mieux appréhender d'éventuels effets de l'administration de probiotiques pour lutter contre des pathogènes pulmonaires.

1.2.1 Le microbiote des voies aériennes supérieures

1.2.1.1 La cavité orale

Le microbiote des voies aériennes supérieures est principalement situé dans la cavité orale qui comprend des habitats microbiens très différents les uns des autres (dents, sulcus gingival, gencive attachée, langue, joues, lèvres, palais mou et dur). Les travaux les plus récents ont permis de détecter 500 à 700 espèces présentes dans la cavité orale (DEWHIRST et coll. 2010; PASTER et coll. 2001; ZAURA et coll. 2009). Le phylum des *Firmicutes*, auquel appartiennent les lactobacilles, domine assez largement cet écosystème. Les lactobacilles semblent en revanche assez peu représentés, largement dominés par les streptocoques. Cette grande diversité s'explique notamment par le fait que la cavité orale est une porte d'entrée importante du corps humain, à la fois pour la respiration et l'alimentation. La diversité des habitats disponibles permet à des bactéries très différentes de s'y installer. Le microbiote oral peut être divisé en deux grandes catégories : d'abord un microbiote autochtone bien établi, connaissant peu de variations au cours du temps, sur lequel viendrait se greffer le microbiote allochtone, susceptible de varier dans le temps. Certains travaux mettent en évidence l'existence d'un noyau phylogénétique commun à l'Homme. Ce noyau est constitué majoritairement de *Firmicutes*, d'*Actinobacteria*, de *Proteobacteria* et de *Bacteroidetes*, ces phylums comptant pour plus de 80 % de la diversité microbienne orale (BIK et coll. 2010; DEWHIRST et coll. 2010; ZAURA et coll. 2009). Le genre qui domine cette niche écologique est *Streptococcus*, à la fois en terme d'abondance et d'étendue. Les genres *Veillonella*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Rothia* et *Haemophilus* sont également relativement abondants et communs chez l'individu sain (AAS et coll. 2005; BIK et coll. 2010; DEWHIRST et coll. 2010; DIAZ et coll. 2012). Segata et coll. ont obtenu des résultats semblables en 2012 mais ont détecté la présence

1.2. L'appareil respiratoire

en quantité plus importante de bactéries appartenant au genre *Fusobacteria* (SEGATA et coll. 2012).

1.2.1.2 La cavité nasale

Les narines sont également un point d'entrée important pour les micro-organismes, au même titre que la cavité orale. L'aspect microbiologique de cet écosystème a été moins étudié que celui de la cavité orale, la plupart des données existantes concernant uniquement la détection de pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* par des méthodes culturales. Le microbiote nasal est dominé par les *Firmicutes* (familles *Staphylococcaceae* et *Lachnospiraceae*) et les *Actinobacteria* (famille *Corynebacteriaceae*) (LEMON et coll. 2010). Le travail de Lemon et coll. en 2010 a mis en évidence une corrélation négative entre les portages de bactéries appartenant aux familles *Staphylococcaceae* d'une part et *Corynebacteriaceae* et *Propionibacteriaceae* d'autre part, ce qui pourrait impliquer un effet protecteur de ces dernières. En effet, le portage nasal de *Staphylococcus aureus* est un facteur de complication pouvant entraîner des infections dans différentes conditions comme les interventions cardio-thoraciques, les hémodialyses ou les séjours en soins intensifs (KLUYTMANS et coll. 2005; WERTHEIM et coll. 2005).

1.2.1.3 L'oropharynx

L'oropharynx est un carrefour qui permet à la fois la circulation de l'air et des aliments et est donc exposé aux micro-organismes inhalés ou ingérés. Le microbiote oropharyngé est également dominé par les *Firmicutes* et les *Proteobacteria*. À la différence des narines, la famille des *Streptococcaceae* est la plus représentée au sein des *Firmicutes*. Une corrélation négative entre les prévalences des phylums *Firmicutes* et *Proteobacteria* a également été mise en évidence (LEMON et coll. 2010). Cardenas et coll. ont montré que le microbiote oropharyngé chez des enfants sains était constitué des phylums *Firmi-*

cutes, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes* qui représentaient respectivement 72 %, 12 %, 8 % et 7 % des OTU (*Operational Taxonomic Unit*) recueillis (CARDENAS et coll. 2012). La diversité, estimée grâce au nombre d'OTU par phylum, était la plus élevée chez les *Firmicutes* (51 % du nombre total d'OTU) contre respectivement 16 %, 11 % et 10 % pour les *Actinobacteria*, les *Proteobacteria* et les *Bacteroidetes*.

En comparant les caractéristiques des microbiotes présents dans les différents sites, on peut constater l'existence d'une évolution de la diversité lorsque l'on se déplace des narines vers l'oropharynx : les *Firmicutes* dominent le microbiote nasal avec les *Actinobacteria*. Les *Proteobacteria* apparaissent dans le nasopharynx et semblent co-dominer avec les *Firmicutes* le microbiote oropharyngé (HILTY et coll. 2010 ; LEMON et coll. 2010).

1.2.2 Le microbiote des voies aériennes inférieures

Il est établi que non seulement les voies aériennes inférieures ne sont pas stériles mais également que leur colonisation revêt une importance particulière dans la maturation du système immunitaire pulmonaire (HERBST et coll. 2011). Quelques études portant sur le microbiote pulmonaire de patients sains mettent en évidence une domination de l'écosystème par des bactéries appartenant aux *Firmicutes*, dont les *Veillonellaceae*, et aux *Bacteroidetes*, dont les *Prevotellaceae* (BECK et coll. 2012 ; CHARLSON et coll. 2011 ; HILTY et coll. 2010). Aucun de ces travaux n'a mis en évidence de différence significative entre les microbiotes des VAS et des VAI. Une des principales difficultés rencontrées lors de ces travaux est de parvenir à distinguer les micro-organismes qui sont réellement installés dans les poumons des micro-organismes issus des VAS. L'hypothèse qui prévaut actuellement est que le microbiote des VAI serait proche de celui des VAS en terme de diversité, avec une biomasse moins importante (CHARLSON et coll. 2011).

1.3. Les infections respiratoires

1.3 Les infections respiratoires

En 2008, les infections des voies respiratoires inférieures et la tuberculose ont été responsables de 4,8 millions de morts (8,5 % de la mortalité mondiale). Ces données sont une moyenne à l'échelle mondiale, sachant que les pays faiblement développés sont plus durement touchés par les infections respiratoires, notamment à cause des infections chez les nouveau-nés et de la malaria (données de l'OMS, 2008). Une infection est le résultat de l'agression d'un organisme par un micro-organisme. La gravité de l'infection est fonction du rapport de force entre la virulence de l'agent pathogène et la réaction immunitaire de l'hôte. On distingue généralement deux catégories d'agents pathogènes : les pathogènes obligatoires qui sont incapables de survivre hors de leur hôte, et les pathogènes opportunistes qui ne provoquent une infection que dans des cas particuliers tels qu'une immunodépression. Les infections respiratoires basses regroupent les bronchites, les bronchiolites et les pneumonies qui sont respectivement des infections des bronches, des bronchioles et des sacs alvéolaires. Les bronchiolites concernent les jeunes enfants de 1 mois à 2 ans et sont surtout causées par le virus respiratoire syncytial (COLLÈGE DES UNIVERSITAIRES DE MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES 2008a). Les bronchites sont divisées en deux catégories selon les patients concernés : chez le sujet sain, elles sont d'origine virale. Chez le patient souffrant de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), elles peuvent être causées par *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou *Moraxella catharralis*. Les pathogènes à l'origine de ces infections peuvent évoluer selon la sévérité de la BPCO ou selon le parcours du patient, avec en particulier une apparition de *P. aeruginosa* lors des BPCO les plus sévères.

1.3.1 Les infections associées aux soins

Les infections associées aux soins ou IAS regroupent toutes les infections survenues au cours ou à la suite d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique ou préventive) d'un patient et qui n'étaient ni présentes ni en incubation lors de cette prise en charge. Les IAS regroupent les infections nosocomiales - du grec *nosocomios*, hôpital - et les infections contractées lors de soins délivrés hors des établissements de santé (COLLÈGE DES UNIVERSITAIRES DE MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES 2008b). Ces deux catégories ont été regroupées au sein des infections associées aux soins en raison des similarités entre les pathologies, notamment en ce qui concerne les micro-organismes responsables, principalement *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (ATTRIDGE et coll. 2011 ; COLLÈGE DES UNIVERSITAIRES DE MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES 2008b). En 2008, la prévalence en France des infections nosocomiales était de 9 % et ces infections se rencontraient le plus souvent dans les services de réanimation, de chirurgie, de brûlés et d'hématologie, de gériatrie et de soins de suite et de réadaptation. Les infections nosocomiales les plus fréquentes sont les infections urinaires (30 %), les pneumonies (20 %), les infections du site opératoire (20 %), les infections sur cathéter (15 %) et les bactériémies primaires (5 %) (COLLÈGE DES UNIVERSITAIRES DE MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES 2008b). Ces infections sont principalement causées par des bacilles à Gram négatif (60 %) et des coques à Gram positif (30 %). Les trois bactéries les plus impliquées dans ces infections sont *Escherichia coli* (25 %), *Staphylococcus aureus* (15 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (15 %).

1.3.2 Les infections communautaires

Les infections communautaires sont contractées en dehors de tout parcours de soin. Les principaux micro-organismes impliqués sont *Streptococcus pneu-*

1.3. Les infections respiratoires

moniae, *Haemophilus influenzae* et des pathogènes atypiques (*Chlamydia* sp., *Legionella pneumophila*...) (ATTRIDGE et coll. 2011).

1.3.3 Les infections sur terrains particuliers

1.3.3.1 La mucoviscidose

La mucoviscidose (ou fibrose kystique du pancréas) est la maladie héréditaire à transmission autosomique récessive la plus fréquente chez les individus caucasiens avec 7 cas pour 100000 individus en Europe (FARRELL 2008). En France, la prévalence de la maladie à la naissance est estimée à 1 cas pour 4700 naissances et s'élève à 1 cas pour 2700 naissances en Bretagne (O'SULLIVAN et coll. 2009). La maladie est causée par une mutation du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). Ce gène code la protéine CFTR, exprimée par de nombreuses cellules épithéliales et sanguines. Cette protéine canalaire est impliquée dans la circulation des ions chlorures et de l'eau entre les milieux intra- et extracellulaires. Elle possède également de nombreuses fonctions régulatrices telles que l'inhibition des canaux sodium ou l'acidification des organelles intracellulaires. Dans les poumons, la maladie entraîne une augmentation de la viscosité du mucus qui tapisse les épithéliums respiratoires, diminuant ainsi la clairance mucociliaire et favorisant leur colonisation par des bactéries. Les insuffisances respiratoires causées par des infections bronchiques chroniques sont ainsi responsables du décès de 80 % des patients atteints de la mucoviscidose (O'SULLIVAN et coll. 2009).

Le statut bactériologique pulmonaire d'un patient évolue au cours de sa vie, avec une diversité microbienne qui diminue au cours du vieillissement ; dans leur plus jeune âge, les poumons des patients atteints de la mucoviscidose sont colonisés principalement par *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus*. Au cours du temps, *S. aureus* supplante progressivement *H. influenzae* avant de laisser place à *P. aeruginosa*. Cela ne signifie pas la disparition de *S. aureus*

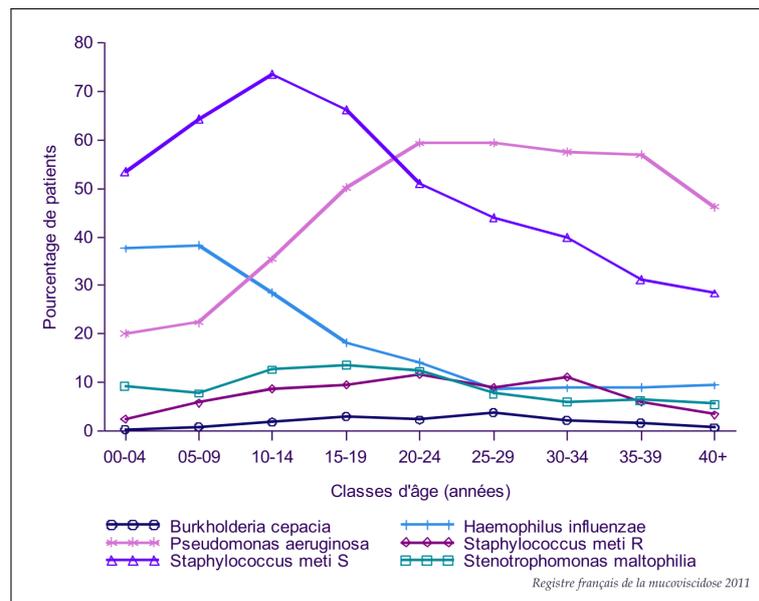


FIGURE 1.2 – Fréquence de colonisation des poumons par les pathogènes les plus fréquents chez les patients atteints de la mucoviscidose selon leur âge. (Source : registre français de la mucoviscidose, 2011).

mais que *P. aeruginosa* devient le pathogène dominant à l'âge adulte, colonisant de 50 à 60 % des patients (fig. 1.2). Une surreprésentation de bactéries phylogénétiquement proches telles que les *Pseudomonadaceae* a ainsi été mise en évidence chez ces patients (COX et coll. 2010 ; GUSS et coll. 2011). Parallèlement à ces évolutions apparaissent des espèces multirésistantes tels que les MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*) ou MDRPA (*Multi-Drug Resistant Pseudomonas Aeruginosa*).

1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

1.4.1 Généralités

P. aeruginosa est une *Pseudomonadaceae*, de l'ordre des *Pseudomonadales* de la classe des gamma-protéobactéries. Les *Pseudomonadaceae* sont généralement décrites comme possédant un métabolisme essentiellement respiratoire aérobie strict, ne produisant pas de gaz et possédant une oxydase. Cependant, de nombreuses *Pseudomonadaceae* sont capables de se développer en

1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

conditions anoxiques en utilisant d'autres accepteurs d'électrons que le dioxygène. Les pseudomonades ont des besoins nutritifs réduits et présentent une versatilité métabolique importante (FRIMMERSDORF et coll. 2010 ; SILBY et coll. 2011). Leurs fortes capacités métaboliques sont notamment très étudiées dans le cadre des bioremédiations (2152 résultats en utilisant les termes MeSH « *Pseudomonas* » et « biodegradation, environmental »). *P. aeruginosa* est ainsi un micro-organisme ubiquiste et versatile : il est capable de coloniser des environnements aussi divers que les eaux usées, les sols, les animaux, les végétaux ou l'Homme.

1.4.2 Infections respiratoires à *P. aeruginosa*

Relativement inoffensif chez les individus immunocompétents, *P. aeruginosa* est responsable de pathologies graves chez les individus immunodéficients ou particulièrement vulnérables. *P. aeruginosa* a émergé au cours du siècle passé en tant que responsable d'infections nosocomiales. Il est impliqué dans un grand nombre de pathologies telles que les infections du tractus urinaire, les kératites, les pneumonies acquises sous ventilation mécanique ou encore les infections pulmonaires chez les patients atteints de la mucoviscidose (CHASTRE et coll. 2002 ; SADIKOT et coll. 2005). Entre 1975 et 2003, la fréquence des pneumonies acquises sous ventilation mécanique causées par *P. aeruginosa* aux États-Unis est passée de 9,6 % à 18,1 %, faisant ainsi de ce pathogène le principal micro-organisme à Gram négatif isolé lors de pneumonies nosocomiales (GAYNES et coll. 2005). *P. aeruginosa* est également la bactérie à Gram négatif la plus fréquemment isolée dans les infections post-chirurgicales (9,5 % des cas). Parmi les sites au niveau desquels on retrouve *P. aeruginosa*, les poumons sont associés aux taux de mortalité les plus importants. Cliniquement, les infections à *P. aeruginosa* sont à l'origine de différents syndromes : les pneumonies communautaires (CAP pour *community-acquired pneumonia*) concernent

plutôt les enfants atteints de la mucoviscidose et les patients souffrant de pathologies pulmonaires chroniques. *P. aeruginosa* est également fréquemment impliqué dans les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (VAP pour *ventilation-associated pneumonia*). Le taux de mortalité dans les pneumonies à *P. aeruginosa* acquises sous ventilation mécanique est compris entre 42,1 et 87 % (FUJITANI et coll. 2011). La fréquence des VAP à *P. aeruginosa* et les taux de mortalité associés peuvent varier d'une étude à l'autre en raison de la difficulté à définir exactement les critères correspondant à l'établissement d'une VAP (KOENIG et coll. 2006). *P. aeruginosa* est également le pathogène le plus fréquemment isolé dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et les sputums des patients atteints de la mucoviscidose (DÖRING et coll. 2000). *P. aeruginosa* pose de tels problèmes notamment parce qu'il possède de nombreux facteurs de virulence. Le pouvoir pathogène d'un micro-organisme repose sur l'ensemble des propriétés biologiques qui lui permettent de provoquer une maladie chez l'hôte. La virulence d'une bactérie est définie par sa capacité à coloniser, à se multiplier puis à provoquer une infection locale ou systémique. Différents facteurs de virulence permettent à *P. aeruginosa* de mettre en place ces trois phases chez un hôte. Parmi les facteurs de virulence importants de *P. aeruginosa* figurent la formation de biofilm et la production d'élastase.

1.4.3 Facteurs de virulence

1.4.3.1 Quorum-sensing

Le quorum-sensing est un système bactérien de signalisation cellulaire impliquant la production, la diffusion et la détection de petites molécules appelées auto-inducteurs. Ce système permet aux bactéries de percevoir leur environnement et de synchroniser leur comportement, notamment au moment où la densité bactérienne atteint un certain seuil (quorum) (LAZDUNSKI et coll. 2004). Les bactéries sont ainsi capables d'utiliser une grande variété d'auto-

1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

inducteurs : chez les bactéries à Gram négatif, ces molécules sont souvent des acyl homosérines lactones (AHL). Ce système permet principalement une communication entre des bactéries appartenant à une même espèce, bien que des cas de communication interspécifiques aient été décrits (WINANS 2002). On connaît notamment chez *P. aeruginosa* deux systèmes complets de quorum-sensing. Ces systèmes sont LasR/I et RhlR/I, les AHL associées étant respectivement une 3-oxo-C12-HSL (N-(3-oxododecanlyl)-L-homosérine lactone) et une C4-HSL (N-butyrylhomosérine lactone) (LAZDUNSKI et coll. 2004 ; MILLER et coll. 2001). La production de facteurs de virulence par *P. aeruginosa* n'est pas permanente. Elle répond notamment à des stimulations et des régulations diverses, et permet à la bactérie de s'adapter à différentes situations environnementales. Le quorum-sensing possède ainsi un rôle central dans la virulence de *P. aeruginosa* : les couples « protéine R/AHL » sont des régulateurs pouvant agir comme facteurs de transcription de certains facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. Trois études menées entre 2002 et 2003 ont démontré que l'expression de 6 à 10 % des gènes de *P. aeruginosa* était contrôlée par le quorum-sensing (HENTZER et coll. 2003 ; SCHUSTER et coll. 2003 ; WAGNER et coll. 2003).

1.4.3.2 Le biofilm

Les bactéries vivent sous forme libre (ou planctonique) ou regroupées au sein de biofilms. La microbiologie s'est longtemps focalisée sur l'étude des bactéries sous forme planctonique mais leur mode de vie principal est en fait le biofilm (COSTERTON et coll. 1999 ; DAVEY et coll. 2000 ; HALL-STOODLEY et coll. 2009 ; JEFFERSON 2004 ; KURAMITSU et coll. 2007 ; MA et coll. 2009 ; NJOROGE et coll. 2009). Un biofilm bactérien est une structure sessile fixée à un substrat et regroupant des bactéries ainsi que des protéines et de l'ADN extracellulaire au sein d'une matrice polysaccharidique elle-même structurée

autour de canaux permettant la circulation de l'eau et des nutriments (DAVIES 2003; HØIBY et coll. 2011; MA et coll. 2009). Le biofilm permet tout d'abord aux bactéries de résister aux forces physiques engendrées par de nombreux environnements, comme les forces de cisaillement dans un fluide en circulation. Ces forces de cisaillement existent aussi bien dans une canalisation industrielle que dans un vaisseau sanguin. En se regroupant sous forme de biofilm, les bactéries peuvent coloniser durablement ces environnements. Au sein de cette matrice, les micro-organismes sont également protégés des antibiotiques ou des désinfectants qui ne pourront que difficilement atteindre les cellules bactériennes (COSTERTON et coll. 1999; MA et coll. 2009; RÖMLING et coll. 2012). Le biofilm permet également aux bactéries d'échapper au système immunitaire de l'hôte en réduisant notamment l'efficacité de la phagocytose. La complexité de la structure et du métabolisme du biofilm poussent certains à le comparer aux tissus des organismes supérieurs (COSTERTON et coll. 1999). L'établissement d'un biofilm se fait en plusieurs étapes : (i) fixation initiale et réversible d'une bactérie à une surface, (ii) constitution et maturation d'une structure complexe et dynamique regroupant tous les éléments du biofilm, (iii) maturation et (iv) dissolution du biofilm (BJARNSHOLT 2013; KLAUSEN et coll. 2003; O'TOOLE et coll. 2000; RÖMLING et coll. 2012; WOZNIAK et coll. 2003).

Composition du biofilm de *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* produit trois exopolysaccharides impliqués dans la construction du biofilm : i) l'alginate, un polysaccharide constitué d'acide mannuronique et d'acide guluronique, ii) un exopolysaccharide riche en glucose et produit par des enzymes encodées par le cluster de gènes *pel* et iii) un exopolysaccharide riche en mannose, rhamnose et glucose produit par des protéines encodées par le cluster de gène *psl* (GHAFOOR et coll. 2011; SCHURR 2013). L'alginate a longtemps été considéré comme l'exopolysaccharide majoritaire de la matrice extracellulaire de *P. aeruginosa*, probablement en raison de l'importance des souches mu-

1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

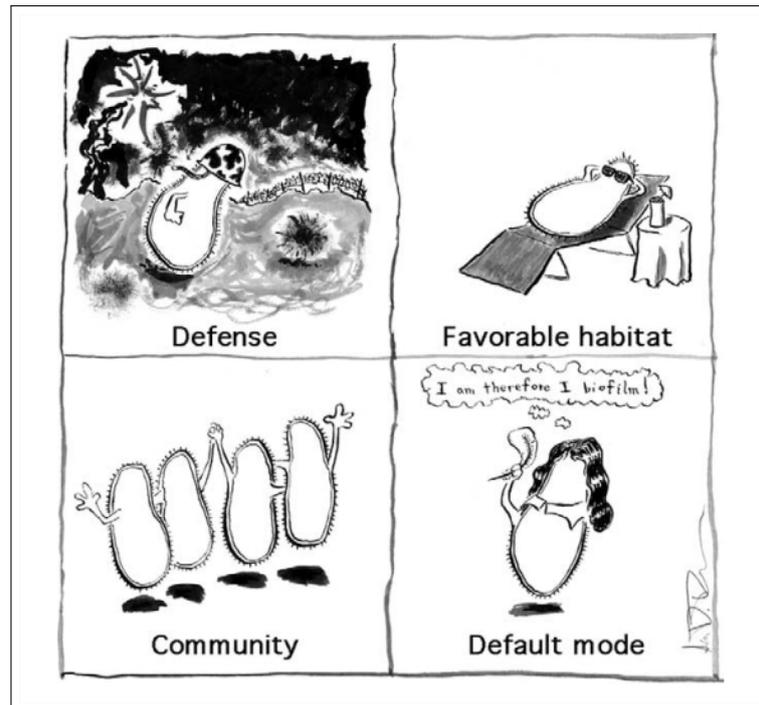


FIGURE 1.3 – Les quatre raisons qui poussent les bactéries à former du biofilm selon le Dr Sean D. Taverna. (Source : K.K. Jefferson, *FEMS microbiology letters*, 2004).

coïdes chez les patients atteints de la mucoviscidose ; ce caractère mucoïde est en effet dû à la surproduction d'alginate. Mais des travaux ultérieurs ont mis en évidence le fait que le biofilm formé par des souches non mucoïdes ne contenait que peu voire pas du tout d'alginate et que la répression de gènes responsables de la production d'alginate n'altérait ni la production ni la structure du biofilm produit par ces souches (BRANDA et coll. 2005 ; O'TOOLE et coll. 2000). **Rôle du biofilm dans l'infection.** Selon l'Institut National de la Santé des États-Unis (NIH), 80 % des infections humaines impliqueraient des bactéries formant du biofilm (RÖMLING et coll. 2012). Lors d'une infection chez l'Homme, cette formation de biofilm pose différents problèmes : la persistance de l'infection et la résistance de l'agent infectieux aux traitements antibiotiques. Ces résistances aux antibiotiques ont plusieurs origines. La première est que les antibiotiques atteignent difficilement leur cible en raison de l'épaisseur du biofilm et de sa

structure : ses constituants sont réputés ralentir la diffusion des antibiotiques (COSTERTON et coll. 1999). De plus, le biofilm est un amalgame de cellules hétérogènes d'un point de vue physiologique. Cette hétérogénéité représente un avantage non négligeable puisque les bactéries présenteront des sensibilités différentes aux antibiotiques. Ainsi certaines cellules bactériennes sont dans des phases de croissance très lente en raison de l'accès difficile à l'oxygène et aux nutriments. Les bactéries présentant des vitesses de multiplication faibles sont généralement moins sensibles à l'action des antibiotiques. Un autre problème posé par l'existence de biofilms au cours des infections est qu'ils peuvent héberger différents micro-organismes, ces infections étant alors polymicrobiennes. Enfin, la détection et l'identification de bactéries au sein d'un biofilm est difficile : les bactéries sont peu accessibles lors des prélèvements et lorsqu'elles sont dans un état de quiescence, leur culture est fastidieuse, nécessitant l'utilisation d'outils de biologie moléculaire.

1.4.3.3 L'élastase

Les protéases jouent un rôle majeur durant les infections à *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* produit différentes protéases dont deux élastases, l'élastase A (ou staphylolysine) et l'élastase B (ou pseudolysine). Ces deux métalloprotéases participent à la pathogénicité de *P. aeruginosa* (KIDA et coll. 2008). L'élastase A a pour principal substrat l'élastine, tandis que l'élastase B est capable de dégrader l'élastine, le collagène, la fibrine, les IgG et IgA, l'interféron γ et le TNF- α (CABALLERO et coll. 2001 ; DELDEN et coll. 1998). L'activité élastolytique de *P. aeruginosa* repose sur une synergie entre les deux élastases qui sont codées par les gènes *lasA* et *lasB*. Le rôle de l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* a été mis en évidence dans plusieurs travaux (AZGHANI et coll. 1990 ; BLACKWOOD et coll. 1983 ; WILSON et coll. 1996). L'élastase réduit notamment la clairance de *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire et est capable de

1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

dégrader les jonctions serrées épithéliales.

1.4.3.4 Antibiorésistances

Les antibiotiques exercent leurs activités grâce à cinq modes d'action : i) inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, ii) inhibition de la synthèse protéique, iii) inhibition de la synthèse des acides nucléiques, iv) inhibition de voies métaboliques et v) déstabilisation de la membrane plasmique des bactéries (CLATWORTHY et coll. 2007 ; TENOVER 2006). Outre ses résistances naturelles à certains antibiotiques, *P. aeruginosa* a la faculté de développer de nouvelles résistances à des antibiotiques normalement efficaces. Ces résistances reposent d'une part sur la faible perméabilité de la membrane plasmique de *P. aeruginosa* et d'autre part sur l'existence de nombreux mécanismes adaptatifs de résistance. La multiplicité des résistances pouvant être possédées par *P. aeruginosa* le fait entrer dans la catégorie des « superbugs », ces micro-organismes capables de résister à la majorité voire à la totalité des antibiotiques disponibles sur le marché (BREIDENSTEIN et coll. 2011). La multirésistance chez *P. aeruginosa* est caractérisée par la résistance à au moins un antibiotique au sein de trois classes d'antibiotiques parmi celles figurant dans la table 1.1 (MAGIORAKOS et coll. 2012). Les trois classes d'antibiotiques principalement utilisées contre *P. aeruginosa* sont les β -lactamines, les fluoroquinolones et les aminoglycosides (BREIDENSTEIN et coll. 2011). Les résistances aux antibiotiques sont communes chez *P. aeruginosa*, à tel point qu'en 2012, 13,8 % des isolats étaient résistants à trois classes d'antibiotiques, et que 5,8 % étaient résistants aux cinq classes d'antibiotiques sous surveillance (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL et coll. 2012).

Il existe quatre grands mécanismes permettant à une bactérie de résister à l'action d'antibiotiques : l'imperméabilité membranaire, les systèmes d'efflux actifs, les changements de cible ou les enzymes sont retrouvés chez *P. aerugi-*

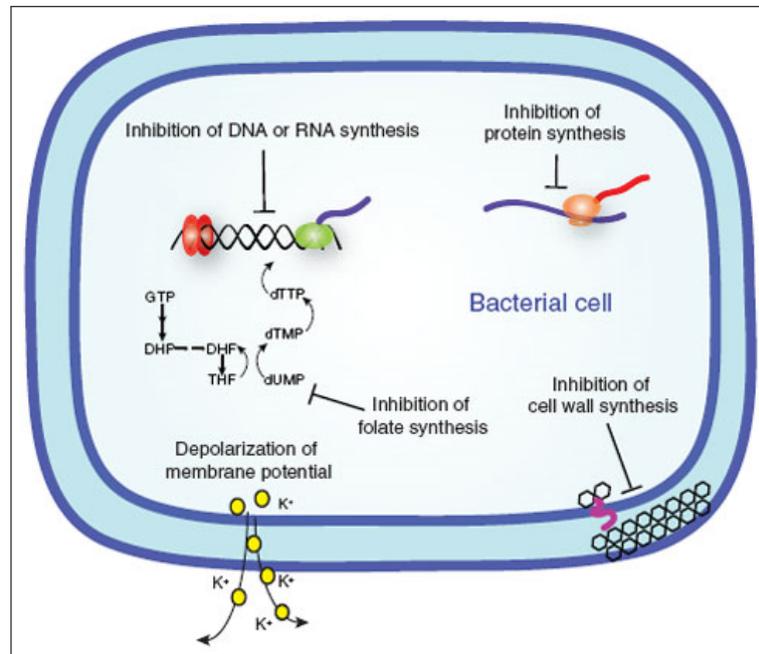


FIGURE 1.4 – Mécanismes d'action des différentes classes d'antibiotiques. (Source : Clatworthy, *Nature chemical biology*, 2007).

TABLE 1.1 – Catégories des antimicrobiens et antimicrobiens utilisés afin de déterminer le statut de résistance de *P. aeruginosa*. (Source : adapté de A. Magiorakos, *Clinical microbiology and infection*, 2012).

Catégories des antimicrobiens	Antimicrobiens
Aminoglycosides	Gentamicine
	Tobramicine
	Amikacine
	Nétilmicine
Carbapénèmes	Imipénème
	Méropénème
	Doripénème
Céphalosporines	Ceftazidime
	Céfépime
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine
	Lévofloxacine
Pénicillines + inhibiteurs de β -lactamases	Ticarcilline-acide clavulanique
	Pipéracilline-tazobactame
Monobactames	Aztréonam
Acides phosphoniques	Fosfomycine
Polymyxines	Colistine
	Polymyxine B

1.5. Les antibiotiques : une faillite programmée ?

nosa. **Résistances intrinsèques** La première résistance naturelle de *P. aeruginosa* face aux antibiotiques est la faible perméabilité de sa membrane ; cette dernière est en effet 10 à 100 fois moins perméable que celle de *Escherichia coli* (HANCOCK et coll. 2000). Cette perméabilité plutôt faible ne suffit pas à elle seule à rendre *P. aeruginosa* résistant, mais permet en revanche aux systèmes d'efflux d'être plus efficaces. Cette perméabilité membranaire repose sur la présence de porines plus ou moins larges qui permettent à différents éléments de pénétrer dans la cellule (saccharides, acides aminés, peptides . . .). Les systèmes d'efflux interviennent également de façon importante dans la résistance naturelle de *P. aeruginosa* à certains antibiotiques. Enfin, *P. aeruginosa* possède une β -lactamase inductible, ce qui signifie qu'elle peut être activée en présence de β -lactamines, entraînant une résistance à la β -lactamine en question mais également potentiellement aux autres β -lactamines (HANCOCK et coll. 2000).

1.5 Les antibiotiques : une faillite programmée ?

Le cas de *P. aeruginosa* est caractéristique des micro-organismes appartenant au groupe « ESKAPE » (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter* sp.) et d'une manière plus générale des bactéries résistantes aux antibiotiques. De nombreuses alertes ont été émises ces dernières années concernant l'augmentation de la fréquence des infections causées par ces micro-organismes multirésistants (BOUCHER et coll. 2009 ; FINLEY et coll. 2013 ; KNAPP et coll. 2010). Fatalement, la difficulté voire l'impossibilité de traiter les infections causées par ces micro-organismes ont pour conséquence l'augmentation de la morbidité et la mortalité chez les patients infectés. De plus en plus de phénomènes de résistances sont décrits, tandis que dans le même temps, le nombre de nouvelles molécules mises sur le marché diminue

(BOUCHER et coll. 2009). Entre 2009 et 2013, seules 2 nouvelles molécules antibiotiques ont été approuvées par la Federal Drug Administration (FDA) et mises sur le marché aux États-Unis (fig. 1.5). La réduction du nombre de nouvelles molécules mises sur le marché s'explique principalement par la difficulté à déterminer de nouvelles cibles mais également par la diminution du nombre de sociétés impliquées dans ces recherches (BOUCHER et coll. 2009 ; WENZEL 2004). Ce ralentissement dans le développement de nouvelles molécules s'explique également en partie par le fait que la perception du monde bactérien a évolué : plutôt que de chercher à éliminer la bactérie, certains cherchent à agir directement sur ses facteurs de virulence (CLATWORTHY et coll. 2007). Malgré tout, la recherche de nouveaux antibiotiques ressemble à une course en avant éternelle entre mise sur le marché d'une molécule (fig. 1.6), apparition des premiers cas de résistances, puis dissémination de ces dernières à travers le monde : il est de plus en plus question d'ère post-antibiotiques. Il est ainsi devenu indispensable de développer des alternatives au « tout-antibiotique », l'une de ces alternatives étant l'utilisation de probiotiques qui pourraient être administrés de façon prophylactique ou thérapeutique pour lutter contre les infections bactériennes (OELSCHLAEGER 2010 ; REID et coll. 2003). Les avantages des probiotiques vis-à-vis des antibiotiques sont leur spécificité d'action et une diminution des pressions de sélection exercées sur les bactéries.

1.6 Les probiotiques

Le concept de probiotiques est né de l'hypothèse émise par Elie Metchnikoff, prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908, dans son livre « *The Prolongation of Life : Optimistic Studies* » publié en 1907, hypothèse selon laquelle l'ingestion de grandes quantités de bactéries lactiques par la consommation de laits fermentés augmenterait l'espérance de vie en protégeant l'organisme de différentes maladies. La définition des probiotiques, d'abord restreinte à

1.6. Les probiotiques

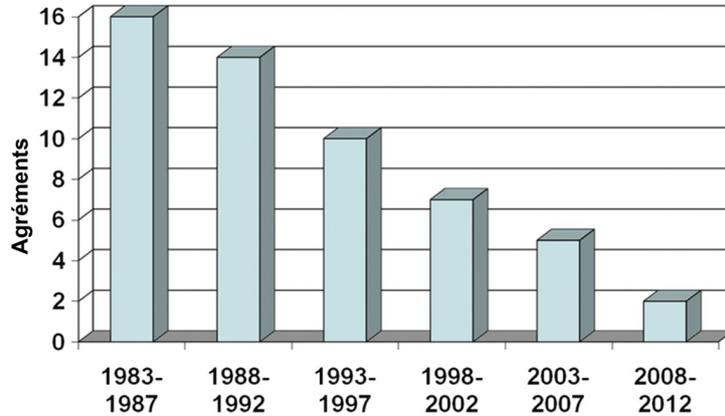


FIGURE 1.5 – Nouveaux antibactériens à usage systémique approuvés par la FDA par période de 5 ans depuis 1983. (Source : H. Boucher, *Clinical infectious diseases*, 2009).

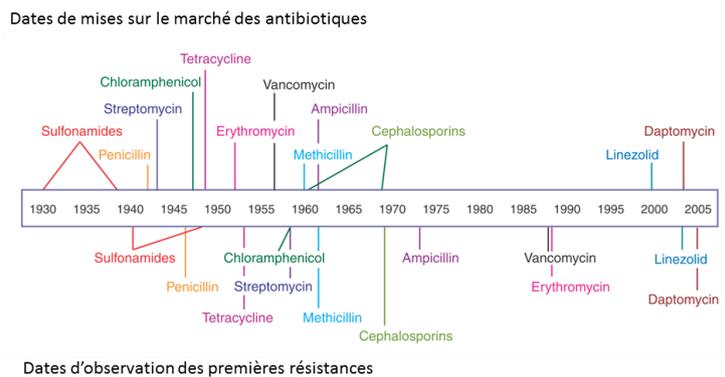


FIGURE 1.6 – Chronologie des mises sur le marché de nouveaux antibiotiques et d'apparition des premières résistances microbiennes. (Source : A. Clatworthy, *Nature chemical biology*, 2007).

l'ingestion de micro-organismes vivants ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte en améliorant l'équilibre et la stabilité de son microbiote intestinal, a évolué au cours du temps pour répondre à l'augmentation du nombre d'organes potentiellement ciblables ainsi qu'à la diversification des modes d'administration. Actuellement selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les probiotiques sont « des micro-organismes qui, administrés vivants et dans les quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte » (ARAYA et coll. 2002). L'usage des probiotiques s'est ainsi considérablement élargi et leur champ d'application potentiel en clinique humaine est extrêmement vaste, touchant les domaines de l'allergie, de la cancérologie, des maladies inflammatoires du tube digestif ou de l'infectiologie.

1.6.1 Mécanismes d'action

Les bactéries peuvent évoluer dans des écosystèmes variés associés à différentes parties du corps humain. Afin de s'y maintenir ou de s'y intégrer, elles font face à différentes contraintes de nature biotique (présence de compétiteurs) ou abiotique (conditions physico-chimiques). Au sein de ces écosystèmes, la compétition entre micro-organismes repose sur l'utilisation de diverses stratégies, comme la production de molécules antimicrobiennes, la compétition pour les substrats ou les sites d'adhésion, ou bien encore la modulation du système immunitaire de l'hôte. C'est l'exploitation de tout ou partie de ces stratégies qui conditionne les critères de sélection pour la recherche de probiotiques utilisés pour lutter contre les maladies infectieuses. L'objectif est ainsi de trouver le(s) meilleur(s) compétiteur(s) possible(s) à opposer à un pathogène afin de réduire ses possibilités de colonisation ou d'infection. Dans l'état actuel des connaissances, on estime que l'efficacité des probiotiques repose sur la mise en place de trois familles de processus biologiques : i) les activités antimicrobiennes directes ; ii) le renforcement de la fonction de barrière des épithéliums ;

1.6. Les probiotiques

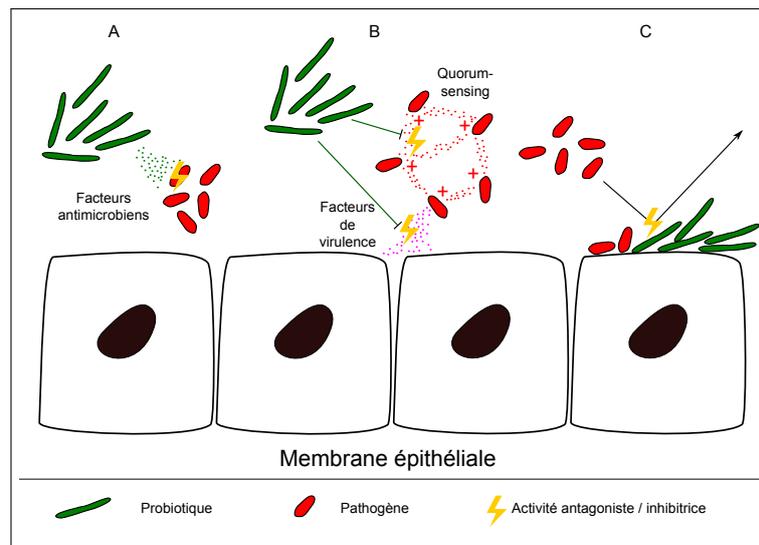


FIGURE 1.7 – Activités antibactériennes des probiotiques. A) Production de molécules antimicrobiennes. B) Inhibition du quorum-sensing et des facteurs de virulence. C) Compétition à l'adhésion cellulaire.

et iii) l'immunomodulation. Cette définition des effets des probiotiques découle en très grande partie des nombreux travaux portant sur leur activité au niveau digestif.

1.6.1.1 Activité antimicrobienne

Elle comprend la production de molécules antimicrobiennes telles que les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène et les acides organiques qui participent à l'acidification de l'écosystème, la compétition pour des substrats en quantités limitées, la compétition pour les sites d'adhésion cellulaire (fig. 1.7).

Les espèces appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* produisent des molécules antimicrobiennes telles que le peroxyde d'hydrogène, des bactériocines et des acides organiques (acide lactique, acide acétique...). Il a été démontré par Asahara et coll. que l'injection intrapéritonéale de *Bifidobacterium breve* souche Yakult chez une souris infectée par une injection intrapéritonéale de *Escherichia coli* O157 : H7 productrice de Shiga-toxines permettait de limiter les effets du pathogène. Les taux de survie des souris

infectées par *E. coli* O157 : H7 puis traitées par placebo ou par l'ingestion de *B. breve* Yakult (trois administrations quotidiennes d'une suspension à 10^9 ufc/ml) atteignaient respectivement 14 % et 100 % à 14 jours. Dans ce dernier groupe, les auteurs ont constaté une augmentation de la concentration en acide acétique associée à une baisse du pH intestinal qui permettaient d'inhiber la production de toxines par la souche pathogène, sans toutefois que cette inhibition repose exclusivement sur une inhibition de la croissance de la *E. coli* O157 : H7 (ASAHARA et coll. 2004).

L'activité anti-infectieuse des bactéries probiotiques peut également reposer sur une inhibition de l'expression de facteurs de virulence par des bactéries pathogènes. En effet, la virulence de certains micro-organismes pathogènes est en partie régulée par le quorum-sensing qui est un système de communication bactérienne reposant sur la production et la reconnaissance de petites molécules de signalisation. Ce système permet aux bactéries présentes dans un écosystème de présenter un même phénotype à un instant donné dès lors que leur concentration atteint un certain seuil (LAZDUNSKI et coll. 2004 ; LE BERRE et coll. 2008).

Valdéz et coll. ont montré en 2005 que *L. plantarum* ATCC 10241 était capable d'inhiber, *in vitro*, le quorum-sensing de *P. aeruginosa*, notamment grâce à une diminution du pH du milieu de culture. Cette souche était également capable d'inhiber la croissance de *P. aeruginosa* et de limiter la formation de biofilm ainsi que la production d'élastase *in vitro*. Dans un modèle murin de brûlures cutanées, les auteurs ont mis en évidence, 10 jours après l'infection, une phagocytose de *P. aeruginosa* facilitée par l'application locale du lactobacille (VALDÉZ et coll. 2005). Dans la continuité de ces résultats, Medellín-Peña et coll. ont montré en 2007 que *L. acidophilus* La-5 inhibait l'expression de gènes de virulence par *E. coli* O157 : H7 en interférant avec son quorum-sensing (MEDELLIN-PEÑA et coll. 2007).

1.6. Les probiotiques

Certaines bactéries synthétisent des molécules antibactériennes appelées bactériocines qui sont des peptides actifs contre des bactéries autres que la souche productrice. Le spectre d'activité des bactériocines est généralement étroit (ciblant des bactéries taxonomiquement très proches de la souche productrice) mais il est parfois plus large (ciblant des bactéries appartenant à des espèces éloignées de la souche productrice). Les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif produisent des bactériocines différentes. Le terme bactériocine est le plus souvent associé aux bactéries à Gram-positif tandis que l'on utilise plutôt les termes microcine et colicine dans le cas des bactéries à Gram-négatif (COTTER et coll. 2005). L'inhibition de souches cliniques appartenant au genre *Salmonella* par différentes souches de *E. coli* non pathogènes productrices de microcines ou de colicines a été testée *in vitro* par la technique du test en croix. Les auteurs ont montré que la souche productrice de microcine 24 était la plus efficace, inhibant toutes les souches de *Salmonella*, y compris celles multirésistantes aux antibiotiques, suggérant un mécanisme d'action différent de celui des antibiotiques (ZIHLENER et coll. 2009).

En 2011, Fukuda et coll. ont démontré que l'acétate permettait de protéger l'épithélium intestinal des infections à *E. coli* O157 : H7. Ils ont ainsi étudié les différences métaboliques entre deux espèces de *Bifidobacterium*, *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 et *B. adolescentis* JCM 1275, dans un modèle murin d'infection à *E. coli* O157 : H7. L'administration prophylactique, 7 jours avant l'administration de *E. coli* O157 : H7, de *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 permettait de préserver la viabilité des souris à 100 %. La souche *B. adolescentis* JCM 1275 ne permettait pas de protéger les souris de la mort causée par l'infection à *E. coli* O157 : H7. Au niveau digestif, les chercheurs n'ont pas détecté de différence entre les deux groupes concernant la concentration en Shiga-toxine de type 2 (Stx2, la toxine produite par la souche de *E. coli* étudiée ici), les quantités de *E. coli* O157 : H7 ou de bifidobactéries, l'expression

des gènes de virulence de *E. coli* O157 : H7, les taux d'immunoglobuline A ou le pH. La différence importante entre les deux groupes était la concentration sérique de Stx2 : elle était plus faible chez le groupe ayant reçu *B. longum* subsp *longum* JCM 1217 que chez le groupe ayant reçu *B. adolescentis* JCM 1275. L'hypothèse émise était l'existence d'une stimulation des fonctions de barrière de l'épithélium par *B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 et non par *B. adolescentis* JCM 1275. Les auteurs ont ensuite mis en évidence une corrélation positive entre la concentration en acide acétique dans les fèces et le taux de survie des souris. Les deux espèces de bifidobactéries étudiées étaient capables de produire de l'acétate en présence de glucose, ce qui avait probablement lieu dans le colon proximal. En revanche, dans le colon distal, le glucose est quasiment épuisé mais la concentration en fructose devient relativement élevée, or *B. longum* subsp *longum* JCM 1217 possédait, à la différence de *B. adolescentis* JCM 1275, un transporteur de carbohydrate. Les souches possédant un transporteur spécifique leur permettant d'assimiler le fructose peuvent ainsi continuer à produire de l'acétate en quantité suffisante pour exercer une activité contre *E. coli* (FUKUDA et coll. 2011).

Les probiotiques peuvent également prémunir l'hôte d'une colonisation par un pathogène en inhibant son adhésion aux cellules épithéliales. Il a ainsi été démontré que le taux de survie de souris infectées par *P. aeruginosa* était augmenté par l'ingestion soit de *Bifidobacterium longum* BB536, soit de *B. breve* ATCC 15700 (MATSUMOTO et coll. 2008)

. Le pathogène était administré aux souris par l'intermédiaire de leur eau de boisson puis les souris recevaient un immunosuppresseur (cyclophosphamide) afin de faciliter la translocation intestinale du pathogène. Les probiotiques étaient quant à eux administrés par gavage gastrique. Les souris recevaient d'abord les probiotiques, une fois par jour durant les jours 1 à 3, puis le pathogène durant les jours 4 à 7 puis de nouveau les probiotiques durant les jours 8 à

1.6. Les probiotiques

14. Les souris recevaient également deux injections intrapéritonéales de cyclophosphamide aux jours 9 et 12. Deux résultats obtenus au cours de ce travail ont été mis en relation : le taux de survie est passé de 0 % chez des souris non traitées par les probiotiques à 10 % chez les souris traitées par *B. breve* ATCC15700 et 70 % chez les souris traitées par *B. longum* BB536. Il a ensuite été démontré que la pré-incubation de lignée cellulaires Caco-2 en présence de l'un ou l'autre probiotique inhibait leur colonisation par *P. aeruginosa* (MATSUMOTO et coll. 2008). En 2007, Collado et coll. ont proposé trois mécanismes par lesquels un probiotique peut influencer l'adhésion d'un pathogène au mucus intestinal : le probiotique peut déplacer le pathogène, inhiber son adhésion ou entrer en compétition avec lui. Ces effets dépendent d'une part de la souche probiotique et d'autre part de l'espèce pathogène (COLLADO et coll. 2007).

1.6.1.2 Renforcement de la barrière épithéliale

Les probiotiques peuvent agir de façon indirecte contre les pathogènes. En interagissant avec la membrane épithéliale, ils peuvent favoriser son activité de barrière et de protection immunitaire grâce à trois mécanismes : i) la sécrétion de mucus, ii) la sécrétion de β -défensines et iii) l'augmentation de la stabilité des jonctions serrées (fig. 1.8).

La première étape, indispensable, du cycle infectieux d'un pathogène est la colonisation de l'épithélium. Au niveau intestinal, la sécrétion de mucines par les cellules caliciformes permet de protéger l'épithélium de la colonisation (DERRIEN et coll. 2010). Il a ainsi été démontré que la stimulation de la sécrétion de mucines par *L. plantarum* 299v permettait de limiter l'adhésion de deux souches appartenant à l'espèce *Escherichia coli* (*E. coli* entérohémorragique ECEH et *E. coli* entéro-pathogène ECEP) à des lignées d'entérocytes HT-29. Les auteurs ont montré que le probiotique stimulait la sécrétion de deux mucines MUC2 et MUC3 et que celles-ci inhibaient l'adhésion du patho-

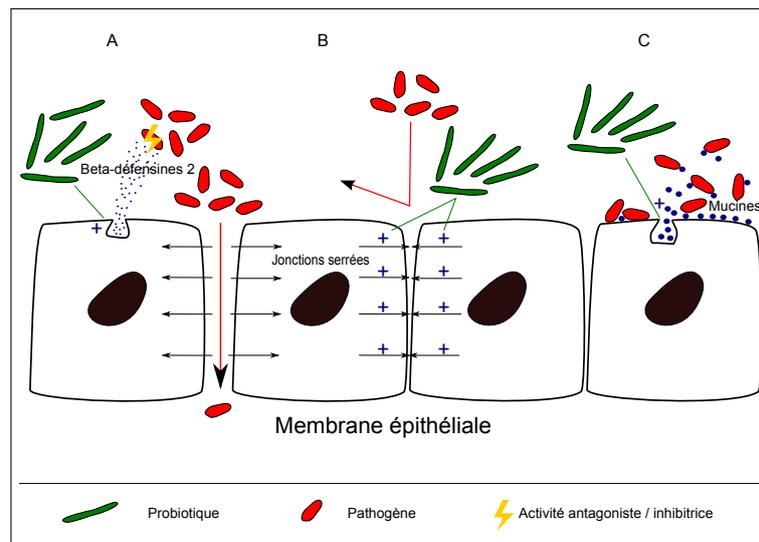


FIGURE 1.8 – Renforcement de la barrière épithéliale par les probiotiques. A) Stimulation de la production de β -défensines-2. B) Stimulation ou restauration des jonctions serrées. C) Stimulation de la production de la production de mucines.

gène aux cellules épithéliales *in vitro*. Ils suggèrent que l'augmentation de la quantité de mucines produites limite l'adhésion de *E. coli* aux cellules épithéliales d'une part par encombrement stérique et d'autre part en « forçant » le pathogène à se fixer préférentiellement aux mucines (MACK et coll. 1999).

La membrane épithéliale intestinale sécrète des β -défensines-2, actives contre les bactéries à Gram-négatif (SCHRÖDER et coll. 1999). En 2007, Schlee et coll. ont démontré que le probiotique *E. coli* Nissle 1917 stimulait la production de β -défensines-2 par les cellules de la lignée Caco-2. Les auteurs ont également démontré que le surnageant de culture du probiotique stimulait davantage cette production que le culot de la culture centrifugée. Schlee et coll. ont ensuite étudié les effets de bactéries mutées sur des gènes codant des protéines excrétées (microcines, adhésines, flagelline) et ont ainsi démontré que la flagelline était responsable de la stimulation de la production de β -défensines-2 par l'intermédiaire des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (SCHLEE et coll. 2008).

1.6. Les probiotiques

Les jonctions serrées sont situées entre les cellules constituant les épithéliums et contrôlent les flux paracellulaires. Certaines bactéries pathogènes sont capables de déstabiliser ces jonctions serrées (HODGES et coll. 2010). Ainsi, l'infection de cellules intestinales humaines appartenant à la lignée T84 par une souche d'*E. coli* E2348/69 entéropathogène entraîne une diminution de la résistance transépithéliale (TER). Cette dernière n'était pas affectée lors de l'incubation des cellules en présence de *E. coli* Nissle. En revanche, la co-incubation des cellules intestinales en présence des deux souches bactériennes (pathogène et probiotique) permettait de préserver la TER. De plus, l'adjonction de *E. coli* Nissle après une infection des cellules par une souche d'*E. coli* E2348/69 permettait de restaurer la TER (ZYREK et coll. 2007). De même, l'exposition de deux lignées d'entérocytes (HT-29 et Caco-2) à un mélange composé de deux probiotiques (*Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 et *L. acidophilus* ATCC 4356) réduisait les effets de *E. coli* O29 : NM sur la résistance transépithéliale. Lors de cette étude, l'incubation des cellules Caco-2 en présence des probiotiques seuls ou combinés entraînait d'augmenter la TER. De plus, l'exposition préalable des cellules à ce mélange de probiotiques permettait de réduire leur colonisation par le pathogène (RESTA-LENERT et coll. 2003). L'action des probiotiques sur la barrière épithéliale est intéressante puisqu'elle peut permettre de bloquer l'initiation du cycle infectieux. L'épithélium cellulaire est également un site important dans le déclenchement de la réponse immunitaire.

1.6.1.3 Immunomodulation

Les probiotiques peuvent moduler l'activité du système immunitaire au niveau local, mais également à distance de l'organe cible (fig. 1.9).

En 2011, dos Santos et coll. ont étudié l'influence de *L. delbrueckii* UFV-H2b20 sur la production d'IFN- γ , d'IL-10 et d'oxyde nitrique dans un modèle

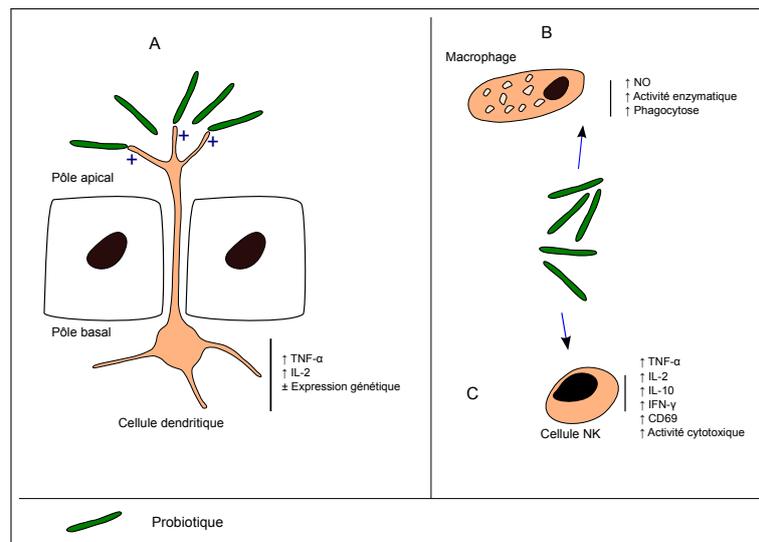


FIGURE 1.9 – Activités immunomodulatrices des probiotiques. A) Cellules dendritiques. B) Macrophage. C) Cellules *Natural Killer*.

murin d'infection intrapéritonéale à *Listeria monocytogenes*. Ainsi, l'administration par voie orale du probiotique permettait de réduire le taux de mortalité des souris infectées (80 % de survie vs. 30 % à 25 jours). À cinq jours, les clairances hépatiques et spléniques étaient complètes pour le groupe traité par *L. delbrueckii* UFV-H2b20, contrairement à ce qui se passait chez le groupe non traité. Les chercheurs ont constaté une augmentation de la production d'IFN- γ par les cellules spléniques, une augmentation de la production d'IL-10 et de TNF- α dans les tissus intestinaux ainsi qu'une augmentation de la production de TNF- α et de nitrites par les cellules péritonéales dans le groupe ayant reçu le probiotique (SANTOS et coll. 2011).

Evrard et coll. ont montré en 2011 que l'exposition de cellules dendritiques à *L. rhamnosus* 35 pendant trois heures modifiait l'expression de 1682 gènes : l'expression de 823 gènes était stimulée tandis que celle de 859 gènes était inhibée. Ces gènes étaient impliqués dans i) les réponses immunitaires et inflammatoires, ii) le traitement et la présentation de l'antigène via le complexe majeur d'histocompatibilité, iii) la signalisation intercellulaire et iv) la transduction du signal. Cette modification de l'expression génique chez la cellule

1.6. Les probiotiques

dendritique avait pour conséquence une augmentation globale de son activité pro-inflammatoire, cet effet étant dose-dépendant (EVRARD et coll. 2011). En 2010, Guglielmetti et coll. ont étudié les effets de différentes bactéries lactiques dont *L. helveticus* MIMLh5 sur *Streptococcus pyogenes* au niveau pharyngé. Ils ont d'abord démontré que *L. helveticus* MIMLh5 réduisait de 55 % l'adhésion du pathogène aux cellules FaDu (lignée de cellules pharyngées humaines) et de 32 % aux cellules HaCaT (lignée de kératinocytes humains). Le probiotique était également capable d'inhiber la production d'IL-6, d'IL-8, de G-CSF et de TNF- α par les cellules FaDu, tout en stimulant la production de GM-CSF. Les auteurs ont enfin montré que *L. helveticus* MIMLh5 stimulait la production de TNF- α et d'IL-2 par des cellules dendritiques issues de précurseurs prélevés dans la moelle osseuse de souris C57BL/6 (GUGLIELMETTI et coll. 2010).

Ainsi certains probiotiques, et en particulier ceux appartenant au genre *Lactobacillus*, ont la capacité d'orienter et de stimuler l'activité des cellules dendritiques. Il a également été démontré que certains probiotiques pouvaient influencer le fonctionnement des cellules de type *natural killer* (cellules NK).

Dans un modèle murin d'infection par le virus H1N1, Harata et coll. ont démontré en 2010 que l'administration intranasale de *L. rhamnosus* GG permettait de stimuler l'activité cytotoxique des cellules NK. Dans le même temps, la production d'IL-1 β et de TNF- α était augmentée. Ces effets biologiques étaient couplés à une survie plus importante des souris (60% de survie chez les souris traitées contre 20 % chez les souris contrôles à 15 jours) (HARATA et coll. 2010).

En 2010, Pérez-Cano et coll. ont étudié, *in vitro*, le potentiel immunomodulateur de deux probiotiques isolés du lait maternel, *L. fermentum* CECT5716 et *L. salivarius* CECT5713. Ils ont constaté *in vitro* que ces deux bactéries stimulaient l'expression des récepteurs CD69 des cellules NK (marqueurs de l'activité des NK). De plus, l'exposition des mononucléaires du sang périphé-

rique aux probiotiques augmentait significativement la production de certaines cytokines telles que IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-1 β en comparaison des résultats obtenus après une exposition de ces cellules au lipopolysaccharide (PÉREZ-CANO et coll. 2010).

En 2011, Shida et coll. ont démontré que des lactobacilles tels que *L. casei* Shirota pouvaient stimuler la production d'IL-12 par des macrophages péritonéaux de souris. Ils ont également émis l'hypothèse que cette induction serait directement liée à la rigidité de la paroi cellulaire du probiotique et donc à sa résistance à la phagocytose par les macrophages (SHIDA et coll. 2011).

L'intérêt porté aux probiotiques en tant que modulateurs de l'immunité réside non seulement dans leurs effets au niveau local, mais également dans leur capacité à agir sur l'immunité systémique. Un travail portant sur le rôle de *L. casei* CRL 431 dans un modèle d'infection pulmonaire à *Streptococcus pneumoniae* a permis de démontrer certaines de ces hypothèses. Le principe retenu a été celui de l'administration orale de *L. casei* CRL 431 pendant deux, cinq ou sept jours (respectivement les groupes Lc2d, Lc5d et Lc7d) avant l'instillation nasale de *S. pneumoniae*. Quinze jours après l'infection, les niveaux d'IgG anti-pneumococciques dans les lavages broncho-alvéolaires et dans le sang étaient supérieurs chez les souris Lc2d lorsque comparés au même paramètre chez les souris contrôles ne recevant pas de *L. casei* CRL 431. Les taux de TNF- α dans les poumons étaient supérieurs chez les souris appartenant au groupe traité huit heures après l'infection lorsque comparés à ceux des souris contrôles, cette stimulation anticipée de la production de TNF- α permettant une mise en place plus rapide d'une réponse antibactérienne locale. Les niveaux d'IL-10 étaient quant à eux supérieurs tant dans les poumons que dans le sérum chez les souris appartenant au groupe traité en comparaison des mêmes niveaux d'IL-10 chez les souris appartenant au groupe contrôle lorsque le dosage était effectué juste avant l'instillation nasale du pathogène. Les au-

1.6. Les probiotiques

teurs ont ainsi émis l'hypothèse que la stimulation de la production de cette molécule anti-inflammatoire permettrait de prévenir des dommages tissulaires liés à une réponse inflammatoire trop importante (RACEDO et coll. 2006). Ces travaux ont permis de mettre en évidence le potentiel immunomodulateur des probiotiques, sans nécessairement s'intéresser à la nature de l'interaction entre la bactérie et la cellule immunitaire. L'un des composants importants de cette relation est le toll-like receptor (TLR). En 2006, Grabig et coll. ont démontré le rôle des TLR-2 et des TLR-4 dans un modèle murin de colite induite par l'administration de dextran sodium sulfate. Le rôle des TLR a été étudié grâce à l'utilisation de souris C57BL/6 de type sauvage ou knock-out soit pour le TLR-2 soit pour le TLR-4. Le probiotique *E. coli* Nissle était administré par voie orale ou gastrique, à raison de 10^7 ufc deux fois par jour. Les auteurs ont constaté une diminution du score de Rachmilewitz chez les souris sauvages traitées par le probiotique par rapport au score obtenu chez les souris sauvages non traitées. Ils ont également constaté une absence d'effet de la bactérie chez les souris knock-out (TLR-2 ou-4). Les auteurs se sont ensuite intéressés à la sécrétion de TNF- α , d'IFN- γ , de MCP-1 et d'IL-10 par les lymphocytes T issus du sang périphérique des trois lignées murines. Ainsi la quantité de cytokines sécrétées par ces cellules était inférieure chez les souris knock-out, sauf pour l'IFN- γ chez les souris knock-out pour le TLR-2. Chez les souris appartenant à la lignée sauvage, l'administration de *E. coli* Nissle (quelle que soit la voie) a permis de réduire la sécrétion de ces quatre cytokines. En revanche, chez les souris knock-out pour le TLR-2, seule la production d'IFN- γ pouvait être modulée. Enfin, chez les souris knock-out pour le TLR-4, les sécrétions de cytokines étaient très abaissées mais l'administration de *E. coli* Nissle n'a eu aucune influence (GRABIG et coll. 2006). Tous les effets protecteurs des probiotiques contre des pathogènes présentés ici sont déduits d'expérimentations *in vitro* ou animales. Il est donc nécessaire de les confirmer dans le cadre d'études

cliniques.

1.6.2 Probiotiques et risques éventuels

La recherche d'alternatives aux antibiotiques a rendu le concept de probiotiques attrayant. L'utilisation des probiotiques au niveau respiratoire a de plus été rendue possible pour plusieurs raisons : i) une meilleure connaissance du microbiote des voies respiratoires ; ii) une meilleure compréhension des mécanismes d'action associés à l'inhibition des pathogènes par les probiotiques ; iii) l'innocuité de ces micro-organismes.

Bien que les inconvénients associés à l'utilisation des probiotiques soient considérés comme minimes, il est important de rappeler les trois effets secondaires potentiels de ces micro-organismes (SNYDMAN 2008). Premièrement, ils peuvent être responsables de bactériémies et/ou d'endocardites. Les cas de bactériémies et d'endocardites à *Lactobacillus* sont rares, la principale série (Cleveland, USA) dénombre 45 cas de bactériémies sur 15 ans, ce qui correspondrait à 0,085 % des hémocultures positives. Ces infections ont été rapportées en particulier chez les personnes immunodéprimées, les diabétiques ou les patients ayant subi une chirurgie récente (CANNON et coll. 2005 ; HUSNI et coll. 1997). L'origine de ces bactériémies peut être endogène (microbiotes intestinal et génital essentiellement) ou exogène via l'ingestion de probiotiques. La probabilité de développer une bactériémie suite à l'ingestion de probiotiques est extrêmement faible, seuls quelques cas ont aujourd'hui été répertoriés (CANNON et coll. 2005).

Le deuxième risque potentiel des probiotiques est le transfert de gènes conférant une résistance aux antibiotiques de bactéries commensales vers les probiotiques ou vice-versa. Plusieurs études ont démontré la possibilité de transferts de plasmides conférant des résistances aux antibiotiques, notamment de *Lactobacillus* sp. vers *Enterococcus faecalis* ou de *Enterococcus faecium* vers

1.6. Les probiotiques

L. monocytogenes (HAUG et coll. 2011 ; TANNOCK 1987). Les lactobacilles possèdent une résistance intrinsèque à la vancomycine mais il a été démontré que cette résistance n'est pas liée aux gènes vanA, vanB ou vanC (KLEIN et coll. 2000). Le troisième effet secondaire potentiel des probiotiques serait un effet immunomodulateur néfaste pour l'hôte, en particulier chez les femmes enceintes et les nouveau-nés. Cependant, aucune étude, même sur ces terrains particuliers, n'a rapporté de tels effets jusqu'à présent (HAO et coll. 2011). À ce jour, bien que les probiotiques et plus particulièrement ceux appartenant au genre *Lactobacillus* fassent partie des micro-organismes les plus sûrs, il faut considérer que chaque bactérie est un organisme vivant. Par conséquent, aucune souche bactérienne ne peut être considérée comme totalement sûre, puisque chacune fait l'objet d'interactions spécifiques avec l'hôte qui l'abrite. Il est donc nécessaire d'identifier les bactéries utilisées comme probiotiques au niveau infra-spécifique et de s'assurer de leur innocuité chez le type de patient ciblé et dans les conditions d'utilisation envisagées.

1.6.3 Probiotiques et voies respiratoires

Le premier champ d'application des probiotiques a concerné les maladies du tube digestif : les diarrhées infectieuses ou associées à la prise d'antibiotiques, les entérocrites nécrosantes ou bien encore les maladies inflammatoires du tube digestif (ALFALEH et coll. 2011 ; VRESE et coll. 2007 ; GOLDIN et coll. 2008 ; REID et coll. 2003). L'intérêt des probiotiques dans le traitement des infections urogénitales a également été largement étudié (FALAGAS et coll. 2007). Plus récemment, différentes hypothèses que nous exposerons ont conduit à rechercher l'impact des probiotiques sur les infections respiratoires. Compte tenu de l'augmentation incessante du nombre de résistances bactériennes aux antibiotiques et de la rareté de nouveaux antibiotiques mis sur le marché, l'intérêt de ces bactéries dans le traitement des infections respiratoires ne cesse de

grandir, comme en témoigne le nombre de publications sur cette thématique (FORSYTHE 2011). Ainsi, les bactéries lactiques administrées dans le cadre d'infections digestives pourraient également avoir un effet sur les infections respiratoires. Cet effet à distance de l'organe cible reposerait sur l'interaction entre probiotique et système immunitaire digestif (GALT, *gut-associated lymphatic tissue*).

1.6.3.1 Probiotiques et infections des voies respiratoires supérieures

Dans une revue récente intitulée « probiotiques et prévention des infections respiratoires hautes », Hao et coll. ont présenté une méta-analyse portant sur 14 études randomisées contrôlées, dont 9 étaient réalisées en double aveugle (HAO et coll. 2011). Les populations étudiées concernaient essentiellement des enfants et plus rarement des sujets âgés. Les infections respiratoires hautes comprenaient le « rhume », les sinusites aiguës, les pharyngites, les laryngo-trachéobronchites, les épiglottites, les rhinosinusites et les otites moyennes aiguës. Ces infections étaient confirmées par un médecin. Différents probiotiques (*L. plantarum* [souche non précisée], *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* HN001, *B. breve* 99, *L. casei* [souche non précisée], *L. gasseri* PA, *L. plantarum* HEAL 9, *L. paracasei* 8700 : 2, *B. longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS et OLL1073R-1, *Streptococcus thermophilus* OLS3059, *L. fermentum* VRI-003) étaient utilisés par voie orale, seuls ou en association pour lutter contre les différentes infections des voies respiratoires citées ci-dessus. Les critères de jugement principaux étaient le nombre d'épisodes aigus et la durée moyenne d'un épisode. Dans certaines études, l'utilisation d'antibiotiques était également rapportée. Les patients appartenant aux groupes traités par un ou plusieurs probiotiques avaient au moins un épisode aigu de moins que ceux appartenant aux groupes placebo, avec un *odds ratio* (OR) à 0,58 (intervalle de confiance ou IC à 95 % : 0,

1.6. Les probiotiques

36-0,92) et au moins 3 épisodes de moins avec un OR à 0,53 (IC à 95 % : 0,36-0,80). Il n'y avait pas de différence significative entre les 2 groupes concernant la durée des épisodes infectieux. Une réduction de la prescription des antibiotiques était montrée dans les groupes traités avec les probiotiques (OR : 0,67 ; IC à 95 % : 0,45-0,98). Les effets secondaires des probiotiques étaient mineurs. Les auteurs ont donc conclu à une supériorité des probiotiques par rapport aux groupes placebos vis-à-vis du nombre d'épisodes d'infections aiguës des voies respiratoires supérieures et de la réduction de l'utilisation des antibiotiques. Les principales limites de ces études étaient l'hétérogénéité des probiotiques utilisés et des populations étudiées, ainsi que l'existence de biais méthodologiques.

1.6.3.2 Probiotiques et pneumonies nosocomiales

La physiopathologie des pneumonies acquises sous ventilation mécanique est complexe. La colonisation des voies aériennes et digestives par des bactéries pathogènes, la formation de biofilm et les micro-aspirations des sécrétions contaminées par ces bactéries sont des étapes importantes de cette physiopathologie (KOLLEF 2004). Parmi les nombreuses mesures préventives des VAP, certaines visent à modifier le microbiote aéro-digestif par décontamination sélective orale, digestive ou orodigestive par des antibiotiques parfois associés à des antifongiques. Cependant, cette stratégie est controversée car les résultats sont discordants selon les études (SMET et coll. 2011 ; MORROW et coll. 2010). Une autre approche repose sur l'introduction de probiotiques au niveau oropharyngé et/ou par voie naso- ou orogastrique. Celle-ci repose principalement sur deux hypothèses : les bactéries probiotiques peuvent réduire la concentration des bactéries pathogènes grâce à des phénomènes de compétition aux niveaux oropharyngé et gastrique chez les patients sous ventilation mécanique (MORROW et coll. 2010) et moduler la réponse du système immunitaire com-

mun aux muqueuses MALT (*mucosa-associated lymphatic tissue*) comprenant en particulier le système lymphoïde des muqueuses respiratoires et digestives (BALT, *bronchus-associated lymphoid tissue*; GALT) (FORSYTHE 2011). Une méta-analyse récente (SIEMPOS et coll. 2010) portant sur 5 études contrôlées randomisées (FORESTIER et coll. 2008; KLARIN et coll. 2008; KNIGHT et coll. 2009; KOTZAMPASSI et coll. 2006; SPINDLER-VESEL et coll. 2007) conclut que l'administration de probiotiques est associée à une diminution de l'incidence des VAP (OR à 0,61 avec un IC à 95 % compris entre 0,41 et 0,91), à une diminution de la durée de séjour en unités de soins intensifs, et à une diminution de la colonisation respiratoire par *P. aeruginosa*. Les espèces probiotiques étaient utilisées seules (*L. plantarum*, *L. rhamnosus*) ou combinées entre elles (*Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, et *L. plantarum* dans le Synbiotic 2000 Forte®). Les probiotiques étaient administrés par application oropharyngée et/ou par voie naso-ou orogastrique. Les posologies employées variaient selon les études. Aucun effet secondaire et en particulier aucune bactériémie causée par les probiotiques n'ont été détectés. Les mécanismes d'action n'ont cependant pas été étudiés. Il faut souligner que pour certaines de ces études, l'incidence de la pneumonie n'était pas le critère de jugement principal. Ainsi, dans l'article de Forestier et coll. , le critère de jugement était le délai d'apparition de *P. aeruginosa* dans les prélèvements gastriques et respiratoires, et ceci qu'il soit responsable d'une colonisation ou d'une infection. Le délai d'acquisition de cette bactérie était significativement différent entre les deux groupes puisqu'il était de 11 jours en médiane dans le groupe recevant le placebo et de 50 jours dans le groupe recevant le probiotique (*L. rhamnosus*). Le pourcentage de pneumonies à *P. aeruginosa* n'était pas différent entre les 2 groupes : 2,9 % dans le groupe recevant le probiotique versus 7,5 % dans le groupe recevant le placebo (FORESTIER et coll. 2008). Dans l'étude de Klarin et coll. , l'objectif principal

1.6. Les probiotiques

était d'évaluer la possibilité d'utiliser un probiotique (*L. plantarum* 299) et de préciser sa tolérance (KLARIN et coll. 2008). Dans l'étude de Kotzampassi et coll. , le critère de jugement principal était le taux d'infection systémique, 63 % dans le groupe recevant les probiotiques (Synbiotic 2000 Forte®) versus 90 % dans le groupe recevant le placebo (KOTZAMPASSI et coll. 2006).

Depuis cette méta-analyse, deux études prospectives randomisées en double aveugle ont été publiées. L'une, réalisée chez 146 patients ventilés mécaniquement et à haut risque de VAP, a comparé l'effet de *L. rhamnosus* GG à un placebo administré localement au niveau oropharyngé et par voie nasogastrique. Le critère de jugement principal était une pneumonie confirmée microbiologiquement (cultures effectuées à partir du lavage broncho-alvéolaire = 10^4 ufc/ml). Les patients ayant reçu le probiotique (10^9 ufc/ml deux fois par jour) avaient un risque significativement moins élevé de développer une VAP (19,1 %) par rapport à ceux ayant reçu un placebo (40,0 %). Aucun effet indésirable secondaire à l'administration du probiotique n'a été rapporté (MORROW et coll. 2010). L'autre étude, française, portait sur 167 patients ventilés mécaniquement depuis 48 heures recevant soit des probiotiques dilués dans de l'eau et administrés quotidiennement par la sonde gastrique (*L. rhamnosus* GG, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) soit un placebo. La mortalité à 28 jours, qui était le critère de jugement principal, n'étaient pas statistiquement différente entre les 2 groupes (25,3 % dans le groupe recevant les probiotiques et 23,7 % dans le groupe recevant le placebo). Les proportions de patients atteints de pneumonies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique n'était pas différents entre les groupes recevant le probiotique ou le placebo. Cependant, l'analyse du sous-groupe des 101 patients victimes d'un sepsis a montré une réduction significative de la mortalité chez les patients recevant un probiotique (OR à 0,38 ; IC 95 % : 0,16-0,93). En revanche, dans le sous-groupe des patients n'ayant pas de sepsis sévère, la mortalité était plus élevée chez les

patients recevant le probiotique (OR à 3,09 ; IC 95 % : 0,87-11,01). Il n'y avait pas d'explication évidente pour ce dernier résultat, on notait seulement que le taux de mortalité dans le groupe placebo était plus bas que celui attendu (13 % à 90 jours) alors que 30 % étaient victimes d'un choc septique ou avait un score de SOFA élevé ($8,0 \pm 4,5$). Aucune bactériémie secondaire causée par des probiotiques n'a été retrouvée (BARRAUD et coll. 2010).

1.6.3.3 Probiotiques et infections respiratoires communautaires

Dans un modèle murin de pneumonie à pneumocoque, plusieurs probiotiques (*L. casei* CRL431, *Lactococcus lactis* NZ, *L. rhamnosus* CRL1505 et *L. bulgaricus* CRL423 associé au *Streptococcus thermophilus* CRL412) administrés par voie orale et à une dose donnée augmentaient la clairance du pneumocoque dans le sang et le poumon, et amélioraient la survie des souris (RACEDO et coll. 2006 ; SALVA et coll. 2010 ; VILLENA et coll. 2008). L'analyse de l'immunité innée montrait, chez les souris infectées ayant reçu le probiotique, une augmentation de la concentration du TNF- α dans le sérum et dans les poumons dès huit heures après l'infection et un accroissement du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le LBA deux jours après l'infection par rapport aux souris infectées n'ayant pas reçu de probiotiques (RACEDO et coll. 2006). Concernant l'immunité humorale, certaines bactéries lactiques augmentent significativement la quantité d'IgA et d'IgG anti-pneumococciques dans le LBA. L'hypothèse émise est que les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses nasales et bronchiques (NALT, *nasal-associated lymphoid tissue* ; BALT) participent à cette réponse immunitaire via les cellules dendritiques et l'activation des cellules CD4. L'étape suivante consiste à utiliser comme vaccin des bactéries probiotiques recombinantes, exprimant des gènes du pneumocoque pour combiner leurs propriétés immunomodulatrices et leur présentation d'antigènes pneumococciques. Plusieurs études utilisant des bactéries lactiques recombi-

1.6. Les probiotiques

nantes comme vaccin contre le pneumocoque ont montré une diminution de la mortalité chez la souris (HANNIFFY et coll. 2007 ; MEDINA et coll. 2008). Certains auteurs ont cherché à déterminer si les probiotiques pouvaient améliorer la réponse immunitaire lors d'une infection à virus influenza. Dans un modèle murin d'infection pulmonaire à influenza, les souris ayant reçu le probiotique par sonde gastrique (*L. plantarum* L-137) présentaient un taux de survie significativement plus élevé par rapport aux souris non traitées. Celui-ci était associé à une quantité sérique d'IFN- β plus importante chez les animaux traités par comparaison aux animaux non-traités (MAEDA et coll. 2009). L'instillation intranasale de *L. pentosus* S-PT84 à des souris durant les 3 jours précédant l'inoculation respiratoire de virus influenza améliorait leur survie (94,1 % à 14 jours) par rapport au groupe ayant reçu le placebo (survie à 58,8 %). Sept jours après l'instillation du virus, on notait une augmentation significative des quantités d'IFN- γ et d'IL-12 dans le liquide de lavage alvéolaire des souris traitées par rapport aux souris non traitées. De même, chez les souris traitées, l'activité des cellules NK dans le poumon était plus élevée (IZUMO et coll. 2010). Chez dix patients sains ayant reçu un probiotique (*Bacillus coagulans* GBI30, 6086) par voie orale pendant 30 jours, la production *in vitro* de TNF- α par leurs lymphocytes T exposés au virus influenza A (H3N2) ou à l'adénovirus était plus importante après les 30 jours de traitement qu'avant (BARON 2009).

1.6.3.4 Probiotiques et mucoviscidose

Les probiotiques ont également été utilisés pour moduler l'immunité dans les maladies inflammatoires du tube digestif. Par analogie, l'hypothèse a été formulée que les probiotiques pourraient réduire l'incidence et la sévérité des exacerbations pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose, l'une des conséquences de ces exacerbations étant une inflammation chronique pulmonaire. Une étude prospective, randomisée, placebo-contrôle, simple aveugle

en *cross-over* a été menée sur 2 groupes de patients atteints de mucoviscidose et infectés chroniquement par *P. aeruginosa* (BRUZZESE et coll. 2007). Dix-neuf enfants ont reçu la souche *L. rhamnosus* GG par voie orale (6.10^9 ufc/jour) pendant 6 mois puis une solution orale de réhydratation (placebo) pendant les 6 mois suivants. En parallèle, 19 enfants ont reçu le placebo pendant 6 mois puis le probiotique. Les patients traités par *L. rhamnosus* GG présentaient une diminution significative du nombre d'exacerbations pulmonaires et du nombre d'hospitalisations. La prise de ce probiotique était associée à une augmentation significative du volume expiratoire maximum en 1 seconde (VEMS) par rapport au placebo (respectivement $3,6 \% \pm 5,2$ et $0,9 \% \pm 5$, $p = 0,02$) ainsi qu'à une augmentation significative du poids ($1,5 \text{ kg} \pm 1,8$ versus $0,7 \text{ kg} \pm 1,8$, $p = 0,02$). Les résultats de cette étude pilote méritent d'être confirmés par une étude à plus grande échelle. Il était initialement prévu d'inclure 30 patients dans chaque groupe. Par ailleurs, on peut s'interroger sur la pertinence de l'accroissement du VEMS. Dans une étude pilote plus récente chez 10 patients atteints de mucoviscidose et colonisés chroniquement par *P. aeruginosa*, on notait une diminution significative du nombre d'exacerbations pulmonaires pendant les 6 mois de traitement par *L. rhamnosus* GG par rapport au nombre d'exacerbations 2 ans avant ce traitement et 6 mois après la fin du traitement. Il n'y avait pas de modification des espèces bactériennes dans les expectorations, ni du taux de polynucléaires neutrophiles, ni du taux d'IL-8 (WEISS et coll. 2010).

L'utilisation des probiotiques dans la prévention des infections respiratoires a ainsi fait l'objet d'un nombre non négligeable d'études. Bien que les conclusions de certains travaux soient contradictoires, leur potentiel semble prometteur, en particulier dans la prévention des pneumonies nosocomiales. Grâce aux nouveaux outils de biologie moléculaire, il est maintenant possible de décrire précisément la composition du microbiote des voies respiratoires et de

1.7. Le modèle cellulaire

mieux comprendre les interactions entre les espèces qui le composent. Une meilleure compréhension de ces interactions pourrait permettre d'améliorer l'implantation de bactéries probiotiques au sein de ces écosystèmes. L'un des avantages des probiotiques par rapport aux antibiotiques est de préserver les bactéries commensales et de ne pas sélectionner de bactéries résistantes. Une étude approfondie du microbiote respiratoire, des mécanismes d'action et de la sécurité d'utilisation des probiotiques est essentielle afin de construire des essais thérapeutiques. Ces nouvelles connaissances permettront de définir de façon rationnelle le(s) probiotique(s) à utiliser, les rythmes et voies d'administration.

1.7 Le modèle cellulaire

Lors de la préparation et de la mise en place du modèle cellulaire, il est apparu que la plupart des travaux concernant les effets des lactobacilles dans des modèles d'infection à *P. aeruginosa* de cellules épithéliales reposaient sur l'utilisation de cellules digestives (FORESTIER et coll. 2001 ; MESSAOUDI et coll. 2012 ; VARMA et coll. 2010). Ces travaux présentent un intérêt dans la recherche de mécanismes permettant aux lactobacilles de protéger un épithélium, notamment en diminuant l'adhésion de pathogènes ou en réduisant leurs effets cytotoxiques. Cependant, notre objectif étant la protection de l'appareil respiratoire, il nous a semblé plus pertinent d'utiliser des cellules respiratoires. Les effets de *P. aeruginosa* ont principalement été testés sur des lignées de cellules pulmonaires ou sur des cellules pulmonaires issues de cultures primaires. Les principaux paramètres étudiés étaient les effets du pathogène sur l'inflammation et les mécanismes permettant ces effets (FAURE et coll. 2004 ; RAMPHAL et coll. 2008 ; RAOUST et coll. 2009). Parmi les lignées cellulaires épithéliales respiratoires retenues figuraient les cellules 16HBE 14o- et les cellules A549. Les cellules 16HBE 14o- (*Human Bronchial Epithelial*) sont des cellules épithé-

TABLE 1.2 – Animaux utilisés lors des études sur les pneumonies bactériennes. Recherche NCBI MeSH 26.11.2013.

Termes MeSH	Nb. de résultats
<i>Animal model + pneumonia + bacterial infections</i>	846
<i>Animal model + pneumonia + bacterial infections + mice</i>	542
<i>Animal model + pneumonia + bacterial infections + rats</i>	139

liales bronchiques (FORBES et coll. 2003). Une lignée équivalente de la lignée 16HBE 14o- mais homozygote pour la mutation Δ F508 du CFTR, la lignée CFBE14o-, était disponible (JOHN et coll. 2010). La lignée A549 est une lignée de pneumocytes de type II obtenues à partir d'un adénocarcinome (NARDONE et coll. 1979).

1.8 Le modèle animal

Les modèles animaux sont un élément essentiel dans l'étude des pathologies en général, et infectieuses en particulier. Ils sont utilisés majoritairement à deux fins : comprendre des mécanismes physiopathologiques et tester des solutions thérapeutiques. Les modèles animaux sont souvent situés entre le modèle cellulaire et les essais cliniques dans la recherche de nouveaux traitements. Concernant les infections pulmonaires à *P. aeruginosa*, les modèles animaux reposent le plus souvent sur l'utilisation de petits rongeurs (souris et rats en majorité, table 1.2) (MIZGERD et coll. 2008).

Il existe différentes lignées murines chez lesquelles ont été testées des infections pulmonaires à *P. aeruginosa*. De rares études se sont attachées à comparer les effets de l'infection selon la lignée choisie (BRAGONZI 2010; MORISSETTE et coll. 1995; TAM et coll. 1999). Il apparaît que parmi les lignées testées (BALB/c, A/J, C57BL/6, DBA/2), les souris C57BL/6 et A/J réagissent de façon intermédiaire à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, les souris BALB/c étant les plus résistantes et les souris DBA/2 les plus sensibles. Dans un tel modèle, cette réponse intermédiaire est intéressante car elle per-

1.8. Le modèle animal

met la mise en place de l'infection, sans toutefois entraîner une mortalité trop élevée parmi les souris. Il existe des modèles d'infection aiguë et chronique, selon le mode d'administration des bactéries. Dans ces modèles de pneumonie, les bactéries peuvent être administrées par exposition à un aérosol, par instillation intratrachéale ou bien par instillation intranasale (MIZGERD et coll. 2008). L'administration oropharyngée peut elle-même être réalisée de deux manières : grâce à une canule de gavage insérée dans les poumons via la cavité buccale ou par insertion de la canule directement dans la trachée après incision (acte chirurgical réalisable chez les animaux les plus gros). L'un des avantages de l'administration intratrachéale est qu'elle permet un meilleur contrôle des quantités de bactéries délivrées au niveau pulmonaire.

L'utilisation de modèles animaux est soumise à deux contraintes principales. La première est d'ordre éthique et relève surtout de la réglementation. Par ailleurs, et bien que les modèles animaux aient permis des avancées significatives dans la compréhension de mécanismes physiopathologiques et dans la recherche de nouvelles thérapies, les différences existant entre animaux et humains rendent difficilement transposables les résultats ainsi obtenus à l'Homme.

TABLE 1.3 – Avantages et inconvénients des voies d’administration des bactéries dans la mise en place de pneumonies infectieuses chez la souris. (*Source : Mizgerd, American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 2008*).

Méthode	Avantages	Inconvénients
Exposition à un aérosol	<ol style="list-style-type: none"> 1. reproduit la transmission naturelle d’infections aéropoortées 2. infection simultanée de plusieurs animaux 3. infection répétable entre les animaux 4. infection bilatérale et symétrique des poumons 5. pas d’anesthésie requise 	<ol style="list-style-type: none"> 1. systèmes coûteux 2. infections oculaires ou cutanées possibles 3. difficulté à mettre en place des expositions nasales 4. certains pathogènes à la viabilité limitée en aérosols 5. peu de contrôle sur l’inoculum respiratoire exact
Instillation intratrachéale	<ol style="list-style-type: none"> 1. reproduit une aspiration oropharyngée 2. contrôle de l’inoculum respiratoire 3. possibilité de n’inoculer qu’un lobe pulmonaire 4. procédure simple à mettre en œuvre 	<ol style="list-style-type: none"> 1. nécessité d’une anesthésie générale de l’animal 2. nécessité de réaliser un geste chirurgical 3. inoculum réparti de façon non symétrique et non uniforme 4. difficulté à infecter simultanément tous les animaux
Instillation <i>per os</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. reproduit une aspiration oropharyngée 2. contrôle de l’inoculum respiratoire 3. possibilité de n’inoculer qu’un lobe pulmonaire 4. pas de geste chirurgical 	<ol style="list-style-type: none"> 1. nécessité d’une anesthésie générale de l’animal 2. technique difficile à mettre en œuvre 3. inoculum réparti de façon non symétrique et non uniforme 4. difficulté à infecter simultanément tous les animaux 5. risque de contamination par la flore orale
Instillation intranasale	<ol style="list-style-type: none"> 1. reproduit une aspiration oropharyngée 2. reproduit une infection des voies aériennes supérieures et inférieures 3. procédure simple à mettre en œuvre 	<ol style="list-style-type: none"> 1. nécessité d’une anesthésie générale de l’animal 2. inoculum très variable dans les poumons 3. inoculum réparti de façon non symétrique et non uniforme 4. risque de contamination par la flore orale

1.9 Hypothèses et objectifs

Il semble aujourd'hui évident que les antibiotiques ne peuvent plus être le seul traitement à apporter aux infections chez l'Homme, notamment au niveau respiratoire. Deux phénomènes ont abouti à cette situation : d'une part, de plus en plus de bactéries deviennent multirésistantes, certaines étant même résistantes à tous les antibiotiques actuellement sur le marché ; d'autre part, peu de nouveaux antibiotiques ont été mis sur le marché ces dernières années. Dans le même temps, l'étude des écosystèmes bactériens chez l'Homme nous a permis d'entrevoir leur importance dans l'établissement et le maintien de son homéostasie. De plus, les facteurs de risque d'acquisition de *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire sont bien connus, permettant alors d'envisager l'utilisation de traitements prophylactiques. L'utilisation des probiotiques dans ce contexte reviendrait à créer une barrière microbienne qui pourrait permettre de limiter voire d'empêcher la colonisation de l'arbre respiratoire par des microorganismes tels que *P. aeruginosa*. Le but de ce travail était d'isoler des lactobacilles actifs contre *P. aeruginosa* (inhibition de la formation de biofilm et de l'activité élastolytique) et compatibles avec les recommandations liées à l'usage des probiotiques, notamment dans le cadre d'une application oropharyngée. Ce travail a été réalisé en 5 étapes successives :

- Création d'une collection de lactobacilles isolés des cavités orales de volontaires sains. Identification préliminaire de ces isolats.
- Criblage de ces nouveaux isolats ainsi que d'isolats appartenant à une collection du LUBEM contre la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1.
- Caractérisation et identification complète des isolats retenus lors des phases de criblage.
- Étude des effets d'un mélange des trois souches les plus intéressantes dans un modèle cellulaire d'infection par *P. aeruginosa* PAO1.

- Étude des effets d'un mélange des trois souches les plus intéressantes dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1.

L'originalité de cette démarche reposait principalement sur le choix de sélectionner des souches humaines orales et spécifiquement actives contre *P. aeruginosa* ainsi que sur le mode d'administration des lactobacilles, en privilégiant l'instillation au niveau respiratoire plutôt que l'ingestion ou l'injection intrapéritonéale. Le fait d'isoler des souches orales devait nous permettre d'envisager une utilisation plus facile au niveau oropharyngé, ces souches étant déjà adaptées à cet écosystème.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

2.1	Bactéries	65
2.2	Isolement et identification de lactobacilles oraux	67
2.2.1	Isolement de lactobacilles	67
2.2.2	Identification préliminaire des isolats	68
2.3	Sensibilité de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 aux acides or-	
	ganiques et aux pH acides	69
2.4	Effets des lactobacilles sur <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .	69
2.4.1	Effets sur la croissance	69
2.4.2	Effets sur la production de biofilm	72
2.4.3	Effets sur l'activité élastolytique	75
2.5	Caractérisation des isolats actifs contre <i>P. aeru-</i>	
	<i>ginosa</i> PAO1	76
2.5.1	Clonalité	76
2.5.2	Identification	77
2.5.3	Croissance	80
2.5.4	Antibiorésistances	81
2.6	Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire	
	d'infection à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	82
2.6.1	Mise au point du modèle cellulaire	82

Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.6.2	Culture des cellules A549	83
2.6.3	Préparation des inoculums bactériens	83
2.6.4	Mesure des effets des bactéries sur les cellules A549 .	85
2.7	Effets des lactobacilles dans un modèle murin de	
	pneumonie à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	86
2.7.1	Préparation des inoculums bactériens	87
2.7.2	Modalités d'administration des bactéries	87
2.8	Statistiques	92

2.1. Bactéries

2.1 Bactéries

Lors de ces travaux, différentes souches bactériennes de référence ont été utilisées : *L. fermentum* ATCC 9338, *L. casei* LMG 6904 et *L. paracasei* LMG 13087 (AES-Chemunex, Bruz, France) ont servi de contrôles lors des identifications des lactobacilles par spectrométrie de masse, par séquençage et par PFGE. Les lactobacilles dont les effets sur la production de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 ont été mesurés appartenaient à deux collections : la première regroupait des lactobacilles isolés de cavités orales de volontaires sains (section 2.2, page 67), la seconde rassemblait des lactobacilles isolés de laits crus (DELAVERNE et coll. 2012). Les lactobacilles obtenus par écouvillonnages buccaux appartiennent à la collection DC-2008-214 du CHRU la Cavale-Blanche. Cette collection est reconnue par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. En accord avec la législation française, un accord écrit avait préalablement été obtenu de chacun des volontaires sains. Le comité de protection des personnes Ouest IV a approuvé ce protocole. La souche *P. aeruginosa* PAO1 a été utilisée tout au long des essais, depuis les premières étapes du criblage jusqu'au modèle animal. *Staphylococcus aureus* SA1 a été isolé au laboratoire de bactériologie du CHU de la Cavale-Blanche chez un patient atteint de la mucoviscidose. Cette souche a uniquement été utilisée lors des premières étapes de criblage, dans les essais en double couche et en puits. Sauf indication contraire, les milieux de culture ont été obtenus auprès de la société AES-Chemunex (Bruz, France).

Lors des différents essais, les bactéries ont été repiquées depuis un cryotube dans un milieu adapté. Après une incubation de 20 heures à 37 ° C, 100 µl de la culture ont été transférés dans 10 ml de milieu frais avant une nouvelle incubation durant 18 heures à 37 ° C.

TABLE 2.1 – Lactobacilles isolés de laits crus.

74 isolats	Espèces ¹
K.B6.3.1A, K.B6.3.1B	<i>L. brevis</i>
K.B4.7.3A, M.B1.6.4F	<i>L. casei</i>
K.C2.3.1D, K.C4'.3.1C, K.C5'.3.1B, K.C6.3.1A, K.C6.3.1D, K.C6.3.1E, K.C6.3.2G, K.V6.3.1A, K.V6.3.1C, K.V6.6.1C, K.V6.6.1D, K.V6.6.1E, K.V8.3.1L, K.V9.3.2A, K.V9.3.2B, K.V9.3.2C, M.V5.3.2C	<i>L. fermentum</i>
K.V9.3.1N	<i>L. harbinensis</i>
M.C5.3.1C (1)	<i>L. helveticus</i>
K.V5.3.1G, K.V6.3.1E, K.V6.3.1K, K.V8.6.1G, Pi.C1.3.1A	<i>L. parabuchneri</i>
M.B4.7.0	<i>L. pentosus</i>
K.C1.3.1C, K.C1.7.1A, K.C2.3.1B, K.C4.7.0A, K.C4.7.0C, K.C4.7.1A, K.V1.6.2, K.V2.3.1D (2), K.V2.3.2C, K.V2.7.1 (2), K.V5.4.0B, K.V5.4.1A, K.V5.4.1B, K.V5.6.1C, K.V6.3.1H, K.V6.3.1J, K.V6.6.1A, M.C3.7.0B, M.C4.3.1C, M.C4.3.1D, M.C5'.3.1C (1), M.C5'.3.1D, M.C5'.6.1B, M.C5'.7.1B, M.V4.3.1F, M.V4.3.1M, M.V5.5.1A, M.V6.3.1F, Pi.C4.7.1A, Pi.C4'.6.2A (1), Pi.C5'.3.2E, Pi.V4.3.1A	<i>L. plantarum</i>
K.C5.3.1B, K.C6.3.2A, K.C6.3.2C, K.C8.3.1I, M.C4.3.1E, M.C4'.3.2B, M.C4'.4.3B, M.C5.3.1B, M.V3.3.1D, Pi.C3.3.1A, Pi.C4'.3.1A, Pi.C6.3.1A, Pi.C6.6.2B	<i>L. rhamnosus</i>

¹ : identification par séquençage partiel du gène codant l'ARNr16S

2.2. Isolement et identification de lactobacilles oraux

TABLE 2.2 – Composition du milieu LAMVAB.

Composant	Quantité (QSP* 1 litre)
Préparation pour bouillon MRS	52.25 g
L-cystéine à 5%	10 ml
Vert de bromocrésol	0.02 g
Agar	15 g
pH ajusté à 5,2 - Stérilisation	
Vancomycine	20 mg

* quantités suffisantes pour

2.2 Isolement et identification de lactobacilles oraux

2.2.1 Isolement de lactobacilles

Des écouvillonnages ont été réalisés dans la bouche de 23 volontaires sains. Des géloses LAMVAB (*Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin And Bromocresol green*) ont été ensemencées avec ces écouvillons (table 2.2) (HARTEMINK et coll. 1997). Le LAMVAB permet la croissance sélective d'une grande partie des lactobacilles, notamment grâce à leur résistance à la vancomycine. Certaines espèces de lactobacilles telles *L. delbrueckii* et *L. salivarius* sont néanmoins sensibles à la vancomycine (COEURET et coll. 2004). Après 48 heures d'incubation en anaérobiose à 37 °C, les colonies isolées ont été repiquées sur géloses MRS (*de Mann, Rogosa et Sharpe*) (MAN et coll. 1960). Une coloration de Gram et une recherche de la catalase ont été réalisées afin de vérifier l'appartenance de ces isolats au genre *Lactobacillus*. Au moins deux repiquages successifs ont été réalisés sur gélose MRS puis une colonie a été repiquée en bouillon MRS afin de procéder à la cryoconservation de l'isolat. L'objectif de cette étape était de constituer une collection de lactobacilles isolés de cavités orales d'individus sains afin de pouvoir évaluer leurs effets sur la production de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. En sortie de cryotube, les isolats étaient repiqués deux fois en bouillon MRS avant leur utilisation lors des différents essais.

2.2.2 Identification préliminaire des isolats

Les lactobacilles isolés de cavités orales ont dans un premier temps été identifiés par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF (appareil Microflex, Bruker, Billerica, USA). Ce système d'analyse couple une source de désorption/d'ionisation assistée par une matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) et un analyseur de temps de vol (*Time of Flight*). Chaque souche bactérienne possède un protéome qui lui est propre : c'est ce protéome qui est analysé grâce à la spectrométrie de masse. Les protéines sont ionisées et chaque molécule détectée est caractérisée par sa masse, sa charge, le ratio masse/charge et l'intensité du signal émis. Il existe deux protocoles sensiblement différents afin d'identifier des bactéries grâce à cette technique : la méthode rapide consiste à déposer puis étaler une colonie sur la cible en acier qui est ensuite passée dans l'automate. La deuxième méthode comprend une extraction préalable des protéines bactériennes, ce qui permet d'augmenter la fiabilité de l'identification (DUŠKOVÁ et coll. 2012). Les différents isolats ont ainsi été cultivés une nuit à 37 ° C en bouillon MRS. Un millilitre de la culture a été centrifugé à 8000 x *g* pendant deux minutes. Après élimination du surnageant, le culot a été remis en suspension dans 1,2 ml d'éthanol à 75 %. Une nouvelle centrifugation a alors été réalisée, suivie de l'élimination du surnageant puis de la suspension du culot dans 50 µl d'acide formique (Fluka, Sigma-Aldrich) à 70 % et 50 µl d'acétonitrile (VWR BDH Prolabo, Radnor, USA). Une dernière centrifugation a été réalisée, puis 1 µl de la phase liquide contenant les protéines a été déposé sur la cible. Après séchage à l'air libre, le dépôt a été recouvert de 1 µl de matrice HCCA (*α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*) avant traitement par l'automate. Une fois l'échantillon traité, le spectre obtenu est comparé par l'automate à une base de données (contenant 223 spectres correspondant à 98 espèces de lactobacilles parmi les 200 actuellement décrites) puis le résultat est fourni sous la forme d'une sélection des dix

2.3. Sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 aux acides organiques et aux pH acides

espèces les plus probables, chaque espèce étant associée à un score indicatif de la fiabilité du résultat (table 3.1).

2.3 Sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 aux acides organiques et aux pH acides

Le métabolisme des lactobacilles reposant sur la fermentation des glucides en acides (acides lactique et acétique en particulier), il s'est avéré nécessaire de déterminer les effets de l'acide lactique, de l'acide acétique et du pH sur la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 afin de distinguer les effets inhibiteurs dus à la production d'acides des autres modes d'actions des lactobacilles contre *P. aeruginosa* PAO1. *P. aeruginosa* PAO1 a été cultivé à 37 ° C une nuit dans un bouillon Luria-Bertani (LB). La culture a été centrifugée, le culot lavé par addition de 10 ml de NaCl à 0,9 % puis suspendu dans 10 ml de bouillon LB frais. Cette suspension a ensuite été diluée afin d'atteindre une densité optique de 0,2 à 600 nm (DO₆₀₀, Spectrophotomètre Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, Waltham, USA). La croissance de *P. aeruginosa* PAO1 a été étudiée à pH 4/5/6/7 et à des concentrations de 0/50/100 mM en acide lactique ou 0/12,5/25/50/100 mM en acide acétique dans du bouillon LB (table 2.3). Le pH a ensuite été ajusté par addition de HCl 1 M ou de NaOH 5 M. La DO₆₀₀ a de nouveau été mesurée par spectrophotométrie après une incubation de 22 heures à 37 ° C.

2.4 Effets des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1

2.4.1 Effets sur la croissance

Les premiers essais visaient à étudier la capacité des lactobacilles isolés à inhiber la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 ou de *S. aureus* SA1, un pathogène également impliqué dans les infections respiratoires, ceci afin de rechercher une éventuelle production de bactériocines. Deux techniques différentes ont été uti-

TABLE 2.3 – Paramètres des expérimentations visant à évaluer la sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 aux acides lactique et acétique

Acides	Concentrations (mM)	pH
Lactique	50	7
		6
	100	5
		4
Acétique	12,5	7
	25	6
	50	5
	100	4

lisées, celle de la double couche (fig. 2.1) (FLEMING et coll. 1975 ; GRINSTEAD et coll. 1992) et celle des puits (fig. 2.2) (SCHILLINGER et coll. 1989). *P. aeruginosa* PAO1 a été cultivé en présence des lactobacilles et dans du bouillon BHI (*Breain Heart Infusion*) retenus après criblage afin de déterminer si ces derniers pouvaient inhiber la croissance du pathogène en conditions non acides.

2.4.1.1 Tests en double couche

Lors des tests en double couche, le lactobacille a été étalé sur une gélose MRS. Après incubation pendant 72 heures à 37 ° C, celle-ci a été recouverte d'une couche de gélose molle TSA (*Trypticase Soy Agar*, 0,8 % d'agar) contenant la bactérie cible en inclusion (*P. aeruginosa* PAO1 ou *S. aureus* SA1 à 2.10^7 ufc/ml). En cas d'inhibition, la croissance de la souche cible est limitée et un halo d'inhibition apparaît autour des colonies productrices des molécules inhibitrices (fig. 2.1). Les lactobacilles, *P. aeruginosa* PAO1 et *S. aureus* SA1 ont été repiqués depuis un cryotube dans leurs milieux respectifs et cultivés 18 heures à 37 ° C.

2.4.1.2 Tests de diffusion en puits

Le test de diffusion en puits est une autre méthode standard permettant de s'affranchir de l'effet acide en testant des surnageants neutralisés (fig. 2.2).

2.4. Effets des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1

Il s'agit de creuser des puits dans une gélose molle (ici une gélose BHI à 0,8 % d'agar) contenant la souche ciblée puis de remplir ces puits avec un surnageant susceptible de présenter une activité contre cette souche. Différents surnageants produits par des lactobacilles ont ainsi pu être testés contre *P. aeruginosa* PAO1 et *S. aureus* SA1. Les cultures en TSB (*Trypticase Soy Broth*) de *P. aeruginosa* PAO1 et *S. aureus* SA1 ont été utilisées afin d'ensemencer (10^6 ufc/ml) des géloses molles de BHI à 0,8% en agar dans lesquelles ont été creusés les puits. Les cultures nocturnes de lactobacilles ont été centrifugées (8000 x *g* pendant 3 minutes). Les surnageants ont été neutralisés par addition de NaOH 1 M puis filtrés sur filtres de 0,2 μ m. Les surnageants neutralisés à pH $6,0 \pm 0,5$ (pHmètre pH 510, Eutech Instruments, Singapour) ont ensuite été déposés (60 μ l) dans les puits creusés dans la gélose molle contenant la souche testée. Les géloses ont ensuite été stockées à 4 ° C pendant 60 minutes afin de permettre aux éventuelles molécules actives de diffuser avant croissance de la souche pathogène, puis elles ont été incubées 24 heures à 37 ° C. Le résultat a été exprimé selon le diamètre du halo d'inhibition de la culture de la souche ciblée autour du puits. Les effets sur la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 de 58 isolats, dont les 36 déjà étudiés lors des essais en double couche, ont ainsi pu être testés (table 2.4).

2.4.1.3 Cocultures en bouillon *Brain Heart Infusion*

Des cultures de *P. aeruginosa* PAO1 en présence des lactobacilles inhibant la formation de biofilm ou l'activité élastolytique (sections 3.3.2 et 3.3.3) ont été réalisées afin de vérifier si ces activités inhibitrices reposaient sur une inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* PAO1. Les lactobacilles et *P. aeruginosa* PAO1 ont été repiqués en bouillon BHI, dans les mêmes conditions que lors des tests d'activité contre le biofilm ou l'élastase. Les incubations ont duré 7 ou 22 heures, selon que les lactobacilles avaient été retenus lors des essais

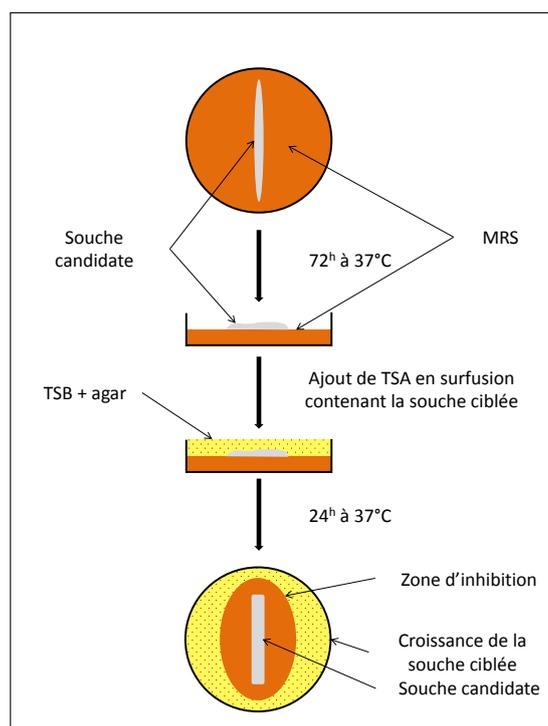


FIGURE 2.1 – Principe du test en double couche.

contre le biofilm ou l'élastase. À la fin de l'incubation, pH et concentrations bactériennes ont été mesurés.

2.4.2 Effets sur la production de biofilm

L'activité des isolats criblés contre la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PAO1 a été étudiée en utilisant une technique colorimétrique inspirée des travaux de Merritt (MERRITT et coll. 2005). Des cultures de *P. aeruginosa* PAO1 et de lactobacilles ont d'abord été réalisées en bouillon BHI (18 heures, 37 ° C, aérobiose) puis centrifugés à 2000 x *g* pendant 20 min. Les culots ont ensuite été remis en suspension dans du sérum physiologique à 0,9 % en NaCl et centrifugés à 2000 x *g* pendant 10 minutes et finalement remis en suspension dans du milieu frais (BHI). Chaque lactobacille a ensuite été mélangé avec *P. aeruginosa* PAO1 (v/v, 1 : 1) afin d'atteindre *ca.* 10⁷ ufc/ml de *P. aeruginosa* PAO1 et de lactobacille. Ce mélange a servi d'inoculum pour les cocultures utilisées lors des essais contre le biofilm ou contre l'élastase. Lors

2.4. Effets des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1

TABLE 2.4 – Lactobacilles isolés de laits crus testés contre *P. aeruginosa* PAO1 et *S. aureus* SA1 lors des essais en double couche et de diffusion en puits.

Isolats		Espèces
Méthodes de la double couche et de la diffusion en puits ¹	Méthode de la diffusion en puits ²	
K.B6.3.1A		<i>L. brevis</i>
K.B4.7.3A	M.B1.6.4F	<i>L. casei</i>
K.C2.3.1D, K.C6.3.2G	K.V6.3.1A, M.V5.3.2C,	<i>L. fermentum</i>
	K.V9.3.1N	<i>L. harbinensis</i>
	M.C5.3.1C (1)	<i>L. helveticus</i>
K.V5.3.1G, K.V6.3.1K	Pi.C1.3.1A	<i>L. parabuchneri</i>
	M.B4.7.0	<i>L. pentosus</i>
K.C1.3.1C, K.C1.7.1A, K.C2.3.1B, K.C4.7.0A, K.C4.7.0C, K.C4.7.1.A, K.V1.6.2, K.V2.3.1D (2), K.V2.32.C, K.V2.7.1 (2), K.V5.4.1A, K.V5.4.1B, K.V5.6.1C, K.V6.3.1H, K.V6.3.1J, M.C5'3.1C (1), M.C5'3.1D, M.C5'6.1B, M.C5'7.1B, M.V4.3.1F, M.V6.3.1F, Pi.C5'3.2E, Pi.V4.3.1A	K.V5.4.0B, K.V6.6.1A, M.C3.7.0B, M.C.4.3.1C, M.C4.3.1D, M.V4.3.1M, M.V5.5.1A, Pi.C4.7.1A, Pi.C4'6.2A (1)	<i>L. plantarum</i>
K.C5.3.1B, K.C8.3.1I, M.C4.3.1E, M.C4'4.3.B, M.C5.3.1B, Pi.C4'3.1A, Pi.C6.3.1A	K.C6.3.2A, K.C6.3.2C, M.C4'3.2B, M.V3.3.1D, Pi.C3.3.1A, Pi.C6.6.2B	<i>L. rhamnosus</i>

¹ 36 isolats

² 22 isolats

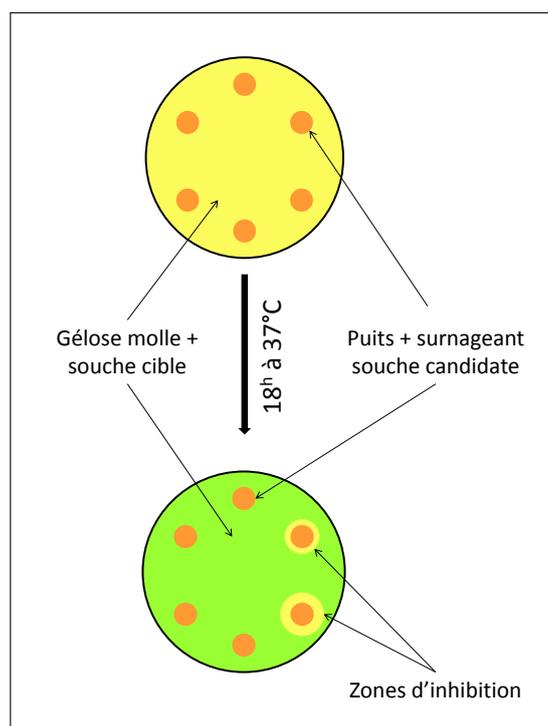


FIGURE 2.2 – Principe du test d'inhibition en puits.

des essais d'inhibition de la formation de biofilm, 4 aliquots de 100 μ l de cette suspension ont été déposés en plaque de 96 puits avant d'être incubés à 37 ° C pendant 7 heures. Le protocole de révélation du biofilm consistait à éliminer le milieu de culture puis à rincer les puits avec de l'eau distillée stérile. Le biofilm formé au fond des puits a alors été coloré par 100 μ l de cristal violet à 0,25 % pendant 10 minutes. La microplaque a ensuite été plongée dans deux bains successifs d'eau distillée stérile afin d'éliminer le cristal violet excédentaire puis séchée pendant 20 min à l'air libre. Le biofilm ainsi coloré a ensuite été décroché des parois des puits par ajout de 100 μ l d'acide acétique à 33 % suivi d'une incubation à température ambiante pendant 15 minutes. La solution a ensuite été homogénéisée puis transférée dans une nouvelle microplaque afin de mesurer la DO à 595 nm (spectrophotomètre Multiskan FC, Thermo Scientific). La quantité de biofilm formé par une culture pure de *P. aeruginosa* PAO1 a servi de contrôle positif, tandis que l'absorbance mesurée sur du bouillon BHI stérile a fait office de contrôle négatif.

2.4. Effets des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1

2.4.3 Effets sur l'activité élastolytique

L'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 a été étudiée grâce à un dosage enzymatique reposant sur un protocole déjà décrit par Rust et coll. et inspiré des travaux de Shotton (RUST et coll. 1994 ; SHOTTON 1970). L'élastine est un substrat de l'élastase B produite par *P. aeruginosa* PAO1. L'élastine rouge-Congo (ECR, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) est un dimère composé d'élastine et d'un colorant, le rouge-Congo, liés de façon covalente. Sous cette forme, l'ECR est insoluble ; l'action de l'élastase sur l'élastine rend soluble la fraction rouge-Congo et permet ainsi la mesure d'une densité optique à 450 nm, la valeur obtenue étant proportionnelle à l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Le protocole expérimental a été le suivant : les suspensions de *P. aeruginosa* PAO1 (10^7 ufc/ml) et de lactobacilles (10^7 ufc/ml, section 2.4.2) en bouillon BH ont été incubées pendant 22 heures à 37 ° C. La culture a ensuite été centrifugée (2000 x *g* pendant 5 minutes) afin de ne conserver que le surnageant dans lequel se trouvait l'élastase. Un millilitre d'une solution d'élastine rouge-Congo (20 mg/ml) dans un tampon de phosphate de sodium à 10 mM (pH 7,0) a été ajouté au surnageant puis le mélange a été incubé à 37 ° C pendant 18 heures. L'ECR insoluble a ensuite été précipitée par centrifugation à 2000 x *g* pendant 20 minutes puis l'absorbance de la fraction soluble de l'ECR a été mesurée à 450 nm (spectrophotomètre Multiskan FC). L'activité élastolytique d'une culture pure de *P. aeruginosa* PAO1 a servi de contrôle positif et l'absorbance mesurée sur du bouillon BHI stérile a fait office de contrôle négatif.

2.5 Caractérisation des isolats actifs contre *P. aeruginosa* PAO1

2.5.1 Clonalité

Des électrophorèses en champ pulsé (PFGE pour *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) ont été réalisées à l'aide de l'enzyme Sfi I (BRENNAN et coll. 2002; DELAVENNE et coll. 2013) afin de déterminer la clonalité au sein des 8 *L. fermentum* sélectionnés lors du criblage contre la production de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Les plugs contenant les bactéries ont été préparés dans une solution tampon (NaCl 1 M, Tris.HCl 10 mM, pH = 7,6) contenant 1 mg/ml de lysozyme (Sigma-Aldrich) et 40 U/ml de mutanolysine (Sigma-Aldrich), auquel a été ajouté (v/v) de l'EDTA (0,125 mM, pH = 7,6) contenant de l'agar (2 %) à bas point de fusion. Une fois solidifiés, les plugs ont été immergés dans 1 ml d'un tampon (NaCl 1 M, Tris.HCl 6 mM, EDTA 100 mM, sarkosyl 1 % (v/v), pH = 7,6) contenant 10 mg/ml de lysozyme et 100 unités de mutanolysine pendant une nuit à 37 ° C. Les plugs ont ensuite été immergés dans une solution de protéinase K (0,5 mg/ml) dans une solution d'EDTA à 0,5 M et de sarkosyl à 1 % (pH = 7,6) pendant une nuit à 55 ° C. La protéinase K a ensuite été neutralisée par lavage des plugs dans une solution tampon (Tris.Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,0) contenant 1 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) pendant 1 heure à 37 ° C. Le lavage a été répété une fois. Des tranches fines ont alors été prélevées dans les plugs et lavées trois fois pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution tampon (Tris.HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH = 8,0). Les tranches ainsi préparées ont été immergées dans 100 µl de tampon d'enzyme de restriction 1X (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes à 4 ° C. Une fois ces lavages effectués, les échantillons ont été digérés dans 100 µl de tampon de restriction contenant 0,2 µl de l'enzyme (Sfi I, 20 U/ml) pendant une nuit à 37 ° C. Les échantillons

2.5. Caractérisation des isolats actifs contre *P. aeruginosa* PAO1

TABLE 2.5 – Programme de l'électrophorèse en champ pulsé.

Étape	Programme (secondes)	Durée (heures)
1	0,5 - 20	20
2	30 - 60	8

ont finalement été insérés dans un gel de migration (agarose 1 % dans un tampon Tris-borate à 0,5X) avant d'effectuer une électrophorèse (CHEF DR II, Bio-Rad, table 2.5).

2.5.2 Identification

2.5.2.1 Séquençage des gènes *ARNr 16S*, *rpoA* et *pheS*

La fiabilité de l'identification de bactéries peut-être renforcée en utilisant une approche polyphasique, c'est-à-dire en combinant différentes techniques d'identification (DUŠKOVÁ et coll. 2012; MELLMANN et coll. 2008). Lors de cette étude, l'approche polyphasique reposait sur le séquençage d'une partie du gène codant l'ARN de la petite sous-unité ribosomique 16S (*ARNr 16S*) ou du gène codant l'unité alpha de l'ARN polymérase (*rpoA*), voire du gène codant l'unité alpha de la phénylalanine synthétase (*pheS*), ainsi que sur l'identification des bactéries par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF et par l'étude des caractères biochimiques des lactobacilles par l'utilisation de galeries API 50 CH (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France). Les lactobacilles isolés de cavités orales ont dans un premier temps été identifiés par spectrométrie de masse (section 2.2.2). Afin de séquencer le gène *ARNr 16S*, les ADN totaux ont été extraits en utilisant des kits QiAGEN (Venlo, Pays-Bas). Les amplifications ont été réalisées en utilisant le couple d'amorces U1/RU2 (table 2.6) (HÉRY-ARNAUD et coll. 2011). Un fragment de l'ADNr 16S a été amplifié avec une dénaturation initiale à 95 ° C pendant 15 minutes, suivie de 30 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 95 ° C pendant 1 minute, une hybridation des amorces à 64 ° C pendant 30 secondes et une extension à 72 ° C

pendant 1 minute. L'étape finale d'extension a été réalisée à 72 ° C pendant 5 minutes (table 2.7). Les amplicons ont ensuite été séquencés à la plateforme de séquençage du département de génétique du CHRU de Brest (INSERM-1078). Afin de séquencer les gènes *rpoA* et *pheS*, les ADN totaux ont été extraits en utilisant des kits FastDNA spin kit (mpbio, Santa Ana, États-Unis) pour l'analyse du gène *rpoA* et en utilisant des kits QiAGEN pour l'analyse du gène *pheS*. Les amplifications ont été réalisées en utilisant les amorces rpoA-21-F/rpoA-23R (*rpoA*) et pheS-21-F/pheS-22-R (*pheS*) (table 2.6) (NASER et coll. 2005). Le gène *rpoA* a été amplifié avec une dénaturation initiale à 95 ° C pendant 5 minutes, suivie de 3 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 95 ° C pendant 1 minute, une hybridation des amorces à 46 ° C pendant 2 minutes 30 secondes et une extension à 72 ° C pendant 1 minute 15 secondes. Trente cycles d'amplification comportant une dénaturation à 95 ° C pendant 35 secondes, une hybridation des amorces à 46 ° C pendant 1 minutes 15 secondes puis une extension à 72 ° C pendant 1 minute 15 secondes ont ensuite été réalisés. L'étape finale d'extension a été réalisée à 72 ° C pendant 5 minutes (table 2.8). Les amplicons ont ensuite été séquencés à la plateforme Biogenouest de Roscoff. Les séquences ont été assemblées grâce au logiciel DNA Baser 3.5.3 puis alignées grâce à l'outil MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, décembre 2012) afin d'identifier les lactobacilles. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées par la méthode *neighbour joining* sous MEGA 5.05/5.10 (TAMURA et coll. 2011).

2.5.2.2 Identification biochimique

En parallèle des identifications par séquençage et spectrométrie de masse, les lactobacilles ont été caractérisés en utilisant des galeries API 50 CH. Les lactobacilles ont été repiqués depuis leurs cryotubes dans des bouillons MRS puis repiqués une seconde fois avant ensemencement des galeries API 50 CH

2.5. Caractérisation des isolats actifs contre *P. aeruginosa* PAO1

TABLE 2.6 – Amorces utilisées lors de l'identification par PCR-séquençage.

Nom	Séquence	Références
U1	5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3'	1
RU2	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	
ropA-21-F	5'-ATGATYGARTTTGAAAAACC-3'	2
rpoA-23-R	5'-ACHGTRTTRATDCCDGCRCG-3'	
pheS-21-F	5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3'	
pheS-22-R	5'-CCWARVCCRAARGCAAARCC-3'	

¹ : HÉRY-ARNAUD et coll. 2011

² : NASER et coll. 2005

TABLE 2.7 – Cycles d'amplification utilisés lors de l'identification des lactobacilles par PCR-séquençage du gène de l'*ARNr 16S*.

Température	Durée (min.sec)	
95 ° C	15.00	Activation de la Taq polymérase
95 ° C	01.00	
64 ° C	00.30	Amplification × 30
72 ° C	01.00	
72 ° C	05.00	Finalisation de l'élongation

TABLE 2.8 – Cycles d'amplification utilisés lors de l'identification des lactobacilles par PCR-séquençage des gènes *rpoA* et *pheS*.

Température	Durée (min.sec)	
95 ° C	05.00	Activation de la Taq polymérase
95 ° C	01.00	
46 ° C	02.15	Pré-amplification × 3
72 ° C	01.15	
95 ° C	00.35	
46 ° C	01.15	Amplification × 35
72 ° C	01.15	
72 ° C	05.00	Finalisation de l'élongation

selon les instructions du fabricant.

2.5.3 Croissance

Les profils de croissance des lactobacilles sélectionnés et de *P. aeruginosa* PAO1 ont été établis en mesurant les absorbances de cultures en bouillons MRS et BHI grâce à un automate de type Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlande). La densité optique à 600 nm de chaque suspension bactérienne initiale a été fixée à $0,011 \pm 0.002$ (Spectrophotomètre Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific) puis l'absorbance de chaque culture a été mesurée à 600 nm toutes les 10 minutes pendant une incubation de 48 heures à 37 ° C. Chaque souche a été testée trois fois.

L'objectif à terme de ce projet étant d'utiliser les lactobacilles sélectionnés en tant que flore de barrière oropharyngée, il était indispensable de déterminer leur capacité à survivre, voire se développer dans cet environnement. Il était donc nécessaire d'étudier leur comportement dans une salive artificielle. La composition de cette salive artificielle a été obtenue à partir d'un travail similaire portant sur un *Streptococcus salivarius* (ROGER et coll. 2011). Le détail de la composition de cette salive artificielle est présenté dans la table 2.9. Les concentrations des ions et de l'urée correspondaient à des résultats issus de l'analyse d'une salive humaine, les mucines (Sigma-Aldrich) permettant de simuler le contenu protéique correspondant. L'ajout d'extraits de viande et de glucose permettait de simuler la composition d'une salive après une prise alimentaire. La salive artificielle a étéensemencée par une culture nocturne de lactobacilles diluée au 1/1000, afin d'obtenir une concentration de *ca.* 10^5 ufc/ml, puis incubée à 37 ° C pendant 48 heures. La concentration bactérienne et le pH ont été mesurés toutes les 6 heures pendant 48 heures, chaque dénombrement étant réalisé en double. Chaque essai a été répété 3 fois.

2.5. Caractérisation des isolats actifs contre *P. aeruginosa* PAO1

TABLE 2.9 – Composition de la salive artificielle (ROGER et coll. 2011).

Produit	Concentration (g/l)
KCl	0,9
KH ₂ PO ₄	0,66
MgCl ₂	0,08
KHCO ₃	0,49
NaNO ₃	0,37
CaCO ₃	0,12
NH ₄ Cl	0,60
Urée	0,20
Mucine gastrique de porc de type III	2,00
Glucose	5
Extraits de viande	1,4

2.5.4 Antibiorésistances

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'ampicilline, du chloramphénicol, de la clindamycine, de l'érythromycine, de la gentamicine, de la kanamycine, de la streptomycine, du couple quinupristine + dalfopristine, de la tétracycline et de la vancomycine ont été évaluées par la méthode des E-tests (Biomérieux). Les lactobacilles ont d'abord été repiqués depuis leurs cryotubes dans des bouillons MRS, puis incubés pendant 24 heures à 37 ° C. Ils ont ensuite été repiqués sur des géloses MRS puis de nouveau incubés 24 heures à 37 ° C. Quelques colonies ont alors été transférées dans 5 ml de sérum physiologique, dont 5 gouttes ont été transférées dans 10 ml de sérum physiologique. Des géloses de type MHS (Mueller-Hinton à 5% de sang de mouton, AES) ont été inondées par la suspension contenant les lactobacilles puis séchées à température ambiante pendant 15 minutes afin de permettre à la suspension de pénétrer la gélose. L'excédent de liquide a ensuite été éliminé puis les bandelettes E-test ont été déposées sur les géloses. Les géloses ont ensuite été incubées à 37 ° C pendant 24 à 48 heures avant la lecture des E-tests.

2.6 Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

Parmi les huit souches sélectionnées lors du criblage *in vitro*, 3 ont été retenues et mélangées afin d'en tester les effets dans un modèle d'infection de cellules épithéliales pulmonaires (lignée A549) par *P. aeruginosa* PAO1. Les 3 souches retenues étaient *L. paracasei* ES.D.88, *L. zeae* Od.76 et *L. fermentum* K.C6.3.1E. Les effets des lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 sur les cellules A549 ont été étudiés via la mesure de leur viabilité et le dosage des cytokines IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- α .

Initialement, les cellules employées devaient être des 16HBE14o-. Aucune cytotoxicité de *P. aeruginosa* PAO1 contre ces cellules n'ayant pu être démontrée, la décision a été prise de délaissier cette lignée au profit des cellules A549.

2.6.1 Mise au point du modèle cellulaire

Le modèle reposant sur les cellules A549 a ensuite nécessité une mise au point notamment en raison de l'existence d'interactions entre les bactéries (lactobacilles et *P. aeruginosa* PAO1) avec le mélange MTS + PMS qui permet la mesure de la viabilité cellulaire (section 2.6.4.1). Nous avons constaté au cours de nos expérimentations que les bactéries étaient en effet capables de réduire le MTS en formazan (BERRIDGE et coll. 2005). Les résultats obtenus étaient donc impossibles à interpréter car il était impossible de distinguer la part du signal liée à l'activité bactérienne et celle liée à l'activité cellulaire. Pour cette raison une étape de 2 heures d'exposition à la gentamicine a été ajoutée au protocole afin d'inhiber la réduction du tétrazolium par les bactéries. Il a également été nécessaire d'intégrer des rinçages des puits après le traitement antibiotique afin d'éliminer les débris bactériens et de supprimer la possibilité de réduction du tétrazolium par des enzymes libérées dans le milieu. La mise

2.6. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

au point du protocole a été relativement longue en raison notamment du peu de travaux publiés portant sur ce modèle.

2.6.2 Culture des cellules A549

Les cellules A549 sont des cellules épithéliales pulmonaires de type II ou pneumocytes de type II dérivées d'un adénocarcinome pulmonaire humain (GIARD et coll. 1973). Les cellules ont été cultivées en flasque dans un milieu de culture constitué à 89 % de DMEM + Glutamine (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne), 10 % de sérum de veau foetal (Lonza, Basel, Suisse) et 1 % de gentamicine (Sigma-Aldrich) (WANG et coll. 2013). Les flasques de culture ont été incubés à 37 ° C et sous atmosphère modifiée (5 % CO₂) jusqu'à atteindre la confluence cellulaire. Vingt-quatre heures avant les essais, les cellules ont été trypsinées, le mélange trypsine (Lonza) et cellules étant ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 500 x *g*. Les cellules ont alors été repiquées en plaques de 24 puits coatées avec du collagène (BD, Franklin Lakes, USA) dans 1 ml de DMEM + glutamine, chaque puits contenant 400000 cellules. Les plaques de 24 puits ont été incubées 24 heures à 37 ° C et 5 % en CO₂.

2.6.3 Préparation des inoculums bactériens

La souche *L. paracasei* ES.D.88 (isolée d'une cavité orale) a été retenue pour sa capacité à inhiber la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PAO1, les souches *L. fermentum* K.C6.3.1E (isolée du lait) et *L. zae* (isolée d'une cavité orale) ont été sélectionnées pour leur capacité à inhiber l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. En outre, la sélection de ces 3 souches a permis d'exploiter leurs diversités en raison de leur appartenance à 3 espèces différentes. Ces trois souches étaient également les plus acidifiantes lors des essais de croissance en salive artificielle. Les souches *L. paracasei* ES.D.88, *L. zae* Od.76, *L. fermentum* K.C6.3.1E et *P. aeruginosa* PAO1 ont été cultivées selon le

protocole indiqué en section 2.1. Les cultures ont ensuite été centrifugées 10 minutes à 2000 x *g*. Le culot a été remis en suspension dans 10 ml de sérum physiologique puis de nouveau centrifugé. La DO₆₀₀ (spectrophotomètre Genesys 10S UV-Vis) des suspensions bactériennes a été ajustée à 0,90 pour les lactobacilles et 0,15 pour *P. aeruginosa* PAO1 afin d'atteindre une MOI globale (*Multiplicity Of Infection*) de 1 : 500 (cellules : bactéries). Les 3 suspensions de lactobacilles ont été mélangées au ratio 1 : 1 : 1. Cinquante microlitres de ces suspensions ont été ajoutés dans les puits contenant les cellules. Deux séries de 6 puits ont été étudiées. Les concentrations bactériennes étaient en moyenne de $6,8 \cdot 10^7$ ufc/ml pour *P. aeruginosa* PAO1 et de $1,2 \cdot 10^8$ ufc/ml pour le mélange de lactobacilles lors des deux séries expérimentales. Les effets des lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 sur les cellules A549 ont été étudiés au sein de 4 groupes :

- Ctrl : cellules seules ;
- Lb : cellules + mélange de lactobacilles
- PAO1 : cellules + *P. aeruginosa* PAO1
- LbPAO1 : cellules + mélange de lactobacilles + *P. aeruginosa* PAO1.

En parallèle, des puits contenant du DMEM ont été inoculés par le mélange de lactobacilles, par *P. aeruginosa* PAO1 ou par le mélange de lactobacilles et *P. aeruginosa* PAO1. Après une incubation de 4 heures à 37 ° C et en atmosphère modifiée (5 % CO₂), des dénombrements par dilutions successives ont été réalisés sur géloses Mueller-Hinton (MH) pour *P. aeruginosa* PAO1 ou MRS pour les lactobacilles afin de détecter un éventuel effet bactéricide du mélange de lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1. De la même manière, l'efficacité de la gentamicine a été déterminée en réalisant des dénombrements après 4 heures d'incubation puis 2 heures de traitement antibiotique.

2.6. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

2.6.4 Mesure des effets des bactéries sur les cellules A549

Les microplaques ont été incubées pendant 4 heures à 37 ° C en atmosphère modifiée. Après cette co-incubation, les surnageants ont été prélevés et immédiatement congelés afin de permettre le dosage ultérieur des cytokines IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- α (section 2.6.4.2). Après lavage par du PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Lonza), 1 ml de DMEM contenant de la gentamicine à 0,5 mg/ml a été ajouté aux puits afin d'éliminer les bactéries présentes et éviter les interactions de ces dernières avec le mélange PMS + MTS (section 2.6.4.1). Les plaques ont alors été incubées à 37 ° C en atmosphère modifiée pendant 2 heures. Les puits ont ensuite été lavés 2 fois au PBS. Un millilitre de trypsine a été ajouté dans chaque puits, avant une incubation à 37 ° C et en atmosphère modifiée (5 % CO₂) durant 60 minutes. Une fois les cellules décollées, le mélange trypsine + cellules a été transféré en tube de 1,5 ml puis centrifugé à 500 x *g* pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et remplacé par 100 μ l de PBS. Les cellules en suspension dans du PBS ont été déposées dans des puits d'une microplaque de 96 puits contenant 20 μ l d'un mélange PMS + MTS (section 2.6.4.1). Les microplaques ont été incubées 2 heures à 37 ° C avant lecture des DO₄₅₀ (spectrophotomètre Multiskan FC). Les résultats sont exprimés en pourcentages de viabilité par rapport au contrôle (cellules seules). Les cytokines IL-6, IL8, IL-10 et TNF- α ont été quantifiées dans les surnageants de culture et en utilisant des kits ELISA.

2.6.4.1 Mesure de la viabilité cellulaire

Le test MTS (Promega, Fitchburg, USA) permet de déterminer le nombre de cellules viables lors d'essais de cytotoxicité. La réaction implique le MTS (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium*), un sel de tétrazolium, qui peut-être réduit en formazan en présence d'un accepteur d'électrons intermédiaire, le PMS (*Phenazine Methosul-*

fate) (BERRIDGE et coll. 2005). La réduction du MTS en formazan est réalisée par des oxydo-réductases cellulaires et permet la mesure de la viabilité cellulaire. Le MTS est très faiblement coloré, au contraire du formazan qui permet une lecture d'absorbance à 450 nm (spectrophotomètre Multiskan FC).

2.6.4.2 Dosage des cytokines

Les concentrations en IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- α ont été mesurées en utilisant des kits ELISA (TNF-alpha ELISA Kit, human/IL-10 ELISA Kit, human/IL-6 ELISA Kit, human/IL-8 ELISA Kit, human, Promokine, Heidelberg, Allemagne). Ces mesures ont été effectuées sur les surnageants des cultures cellulaires après 4 heures de co-incubation en présence des bactéries.

La stratégie de criblage et le choix des souches ont ensuite été validés dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1.

2.7 Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

Les effets d'un mélange de *L. paracasei* ES.D.88, *L. casei* Od.76 et *L. fermentum* K.C6.3.1E ont été évalués dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1.

Les souris C57BL/6 ont notamment été choisies car leur sensibilité à *P. aeruginosa* permet de provoquer une pneumonie, tout en évitant une mortalité trop importante parmi les populations (BRAGONZI 2010; YU et coll. 1998). Les souris C57BL/6 ont été acquises auprès de l'entreprise Janvier Labs (Saint-Berthevin, France). Les souris ont été hébergées au sein de l'animalerie de l'UBO et ont eu un accès illimité à l'eau et aux aliments. Après une semaine d'acclimatation, les souris ont été transférées au sein du secteur infectieux d'expérimentation animale et hébergées dans un portoir ventilé associant une unité de traitement de l'air (Easyflow, Tecniplast, Buggugiate, Italie) et des cages hermétiques. Le modèle murin utilisé lors de ces expérimentations était

2.7. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

un modèle de pneumonie aigüe à *P. aeruginosa* PAO1.

2.7.1 Préparation des inoculums bactériens

Comme détaillé dans la section consacrée au modèle cellulaire (section 2.6.3), les souches *L. paracasei* ES.D.88, *L. zeae* Od.76 et *L. fermentum* K.C6.3.1E ont été sélectionnées lors des étapes de criblage puis mélangées avant d'être administrées aux souris. Les lactobacilles et *P. aeruginosa* PAO1 ont été repiqués depuis un cryotube respectivement dans des bouillons MRS et BHI filtrés puis cultivés 24 heures à 37 ° C. Ils ont ensuite été repiqués dans du milieu frais puis de nouveau cultivés à 37 ° C pendant 18 heures. Après 18 heures d'incubation, les cultures ont été lavées par centrifugation à 1350 x *g* pendant 10 minutes à 20 ° C. Une fois le surnageant éliminé, 10 ml de SSI (sérum salé isotonique, 0,9 % en NaCl) ont été ajoutés sur le culot avant de procéder à une nouvelle centrifugation (mêmes conditions). La DO₆₀₀ des suspensions lavées a été ajustée à 1,0 et 0,05 (Spectrophotomètre Jenway série 73, Stone, Royaume-Uni) respectivement pour le mélange de lactobacilles (après mélange des 3 lactobacilles) et pour *P. aeruginosa* PAO1 afin d'atteindre des concentrations souhaitées (table 2.10). Les suspensions mères ont été étalées sur géloses MH et MRS afin de dénombrer *P. aeruginosa* PAO1 et les lactobacilles. Les lactobacilles ont été administrés par voie intratrachéale aux souris C57BL/6 sous la forme d'un mélange équilibré des trois souches (1 : 1 : 1).

2.7.2 Modalités d'administration des bactéries

En raison de la finalité de ce travail, à savoir la mise au point d'une flore de barrière oropharyngée, le modèle animal retenu a été celui d'une prophylaxie reposant sur l'administration des lactobacilles aux souris 18 heures ou 42 heures puis 18 heures avant l'infection par *P. aeruginosa* PAO1. Ces horaires ont été définis selon deux critères : dans un premier temps éviter de répéter des instillations trop rapprochées qui auraient pu menacer la santé des souris et

dans un second temps ne pas trop espacer les administrations de lactobacilles de l'infection afin de pouvoir observer un effet éventuel. Le choix d'euthanasier les animaux 4 heures après l'infection était supporté par différents travaux (LE BERRE et coll. 2011; WÖLBELING et coll. 2011) ayant notamment démontré l'importance de la réaction inflammatoire à cet instant. Les bactéries ont été administrées aux souris par instillation oropharyngée grâce à une canule de gavage de 24 gauge (Poopers & Sons, NY, USA). Au moment de l'instillation, les souris étaient sous anesthésie au Sevoflurane (Abott, Chicago, USA). Chaque instillation consistait en l'administration intratrachéale de 75 μ l d'une suspension stérile ou bactérienne. Les essais ont porté sur 4 groupes de souris selon la nature de la suspension administrée. Le groupe « lactobacilles » (Lb) a reçu le mélange des 3 lactobacilles, le groupe « *P. aeruginosa* PAO1 » (PAO1) a reçu le pathogène, le groupe « lactobacilles et *P. aeruginosa* PAO1 » (LbPAO1) a d'abord reçu le mélange de lactobacilles puis *P. aeruginosa* PAO1. Le groupe contrôle (Ctrl) a quant à lui reçu SSI.

Les souris de chaque groupe (Lb, PAO1, LbPAO1) étaient réparties dans deux sous-groupes selon la nature des analyses (charges bactériennes pulmonaires ou dosage de cytokines). Chaque sous-groupe comprenait 6 souris, soit 12 souris par groupe.

Deux séries d'expérimentations ont été menées. Lors de chaque essai, 3 groupes de 12 souris ont été préparés, en plus d'un groupe contrôle comportant 6 souris (fig. 2.3). Lors de la prophylaxie reposant sur une administration unique de lactobacilles, le mélange de lactobacilles a été administré à J0. Dix-huit heures plus tard, *P. aeruginosa* PAO1 a été administré aux souris, lesquelles ont été euthanasiées 4 heures plus tard, soit 22 heures après la première instillation de lactobacilles. Le ratio « lactobacilles instillés/*P. aeruginosa* PAO1 instillés » était de 25. Lors de la prophylaxie reposant sur deux administrations de lactobacilles, une première instillation de lactobacilles a été

2.7. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

réalisée 42 heures avant l'infection, puis une seconde 24 heures plus tard. La suite du protocole a été identique aux expérimentations précédentes, à savoir une instillation de *P. aeruginosa* PAO1 18 heures après la dernière instillation de lactobacilles, suivie d'une euthanasie des souris 4 heures plus tard. Le ratio « lactobacilles instillés/*P. aeruginosa* PAO1 instillés » était cette fois de 5 lors des deux instillations de lactobacilles (fig. 2.3, table 2.10).

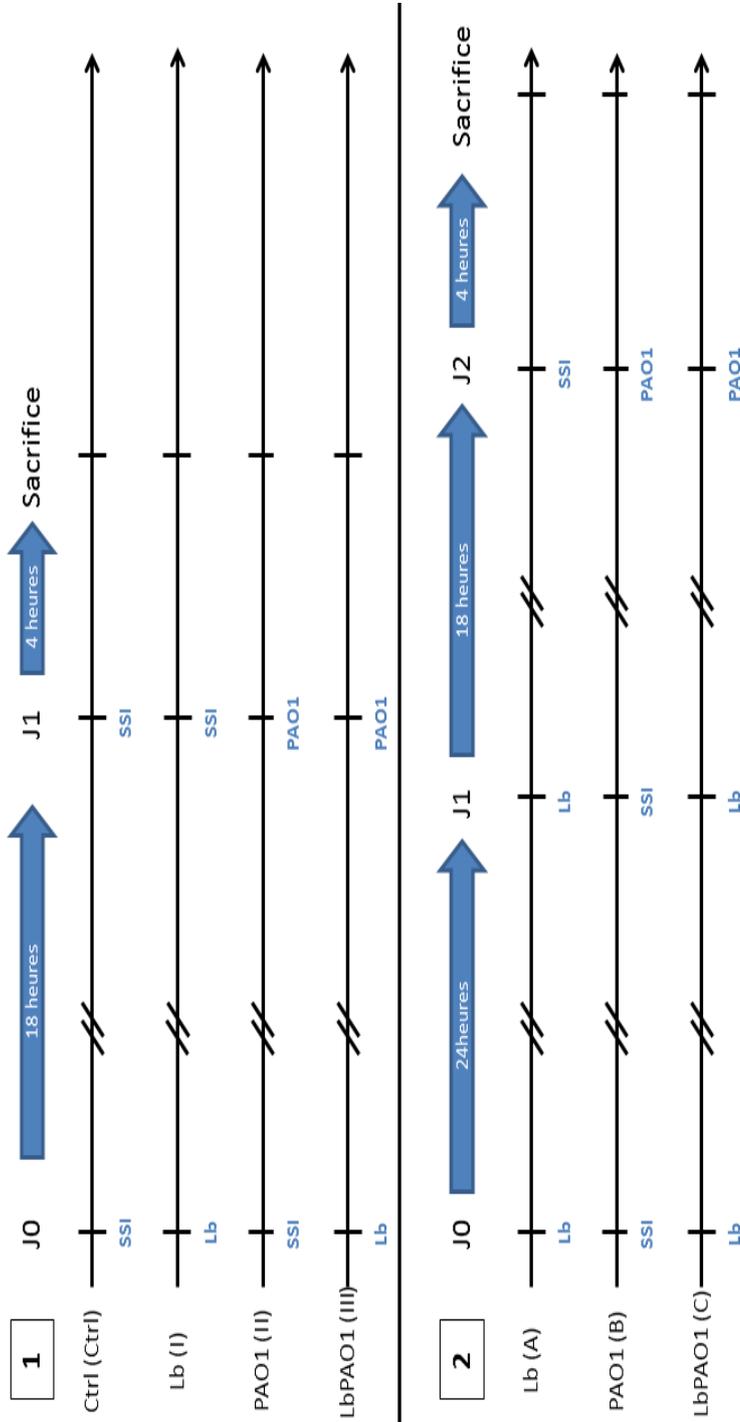


FIGURE 2.3 – Déroulement des expérimentations animales. 1 : Essai comportant une seule instillation du mélange des lactobacilles *L. paracasei* ES.D.88, *L. zeae* Od.76 et *L. fermentum* K.C6.3.1E. 2 : Essai comportant deux instillations des mêmes lactobacilles espacées de 24 heures. Les flèches bleues indiquent la durée de l'incubation. En bleu est indiquée la suspension instillée. SSI : sérum salé isotonique; Lb : lactobacilles; PAO1 : *P. aeruginosa* PAO1.

2.7. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

TABLE 2.10 – Quantités de bactéries administrées aux souris et exprimées en ufc.

	Lactobacilles, instillation 1	Lactobacilles, instillation 2	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Ratio Lb/PAO1
Essai 1	-	$1,4 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^5$	26
Essai 2	$6,0 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	5 (2x)

Les animaux ont été anesthésiés grâce à un mélange de kétamine à 100 ml/kg (Virbac, Carros, France) et de xylazine à 15 mg/kg (Bayer Santé, Puteaux, France) puis euthanasiés par exsanguination intracardiaque. Selon la nature des analyses à effectuer, deux prélèvements différents ont été réalisés : un lavage broncho-alvéolaire (LBA) ou un prélèvement des poumons. Les dénombrements pulmonaires bactériens ont été réalisés sur les poumons tandis que les dosages de cytokines ont été effectués sur les LBA. S'agissant des poumons, ils ont été prélevés de manière aseptique puis broyés (Silentcrusher S, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Allemagne) dans 7 ml de SSI. Le broyat a ensuite été étalé sur des géloses MH et MRS en utilisant la technique des dilutions successives afin de dénombrer *P. aeruginosa* PAO1 et les lactobacilles. Les géloses ont été incubées 24 heures à 37 ° C pour la recherche de *P. aeruginosa* PAO1 et 48 heures à 37 ° C pour la recherche des lactobacilles. Dans le groupe « LBA », les trachées des animaux ont été incisées afin d'y installer un cathéter. Un robinet trois voies a été fixé à ce cathéter afin de pouvoir à la fois injecter du SSI dans les poumons de la souris et récupérer ce liquide. Le lavage a été réalisé par trois injections de 0,5 ml de SSI dans les poumons. Une fois récupéré et pesé, le LBA a été centrifugé à 320 x *g*, pendant 10 minutes et à 4 ° C. Le surnageant a ensuite été congelé à -20 ° C jusqu'à son utilisation pour le dosage des cytokines grâce à des kits ELISA (TNF-alpha ELISA Kit, mouse/IL-10 ELISA Kit, mouse/IL-6 ELISA Kit, mouse, Promokine).

2.8 Statistiques

Les calculs statistiques ont été effectués en utilisant les logiciels MS Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) et SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, USA) ainsi que l'outil en ligne BiostaTGV (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>).

Les effets des lactobacilles sur la production de biofilm et sur l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 ont d'abord nécessité l'étude de la corrélation entre les trois séries d'expérimentation grâce à un test de Student inverse ($p < 0,05$). Une fois la corrélation établie, les différences entre chaque essai ont été étudiées par analyse de la variance (ANOVA) et le test de la moindre différence (LSD) a été utilisé afin de détecter les activités antagonistiques des différents lactobacilles contre la production de biofilm ($p < 0,05$) et l'activité élastolytique ($p < 0,01$) de *P. aeruginosa* PAO1.

La sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 aux acides organiques et au pH a été déterminée en réalisant une analyse de la covariance (ANCOVA) sur les densités optiques mesurées lors du suivi de croissance de *P. aeruginosa* PAO1.

Les résultats obtenus grâce au modèle cellulaire et au modèle animal ont été comparés en utilisant le test non-paramétrique de Mann-Whitney.

CHAPITRE 3

Résultats

3.1	Isolement et identification de lactobacilles oraux	95
3.2	Sensibilité de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 aux acides organiques et aux pH acides	97
3.3	Effets des lactobacilles sur <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .	99
3.3.1	Effets sur la croissance	99
3.3.2	Effets sur la production de biofilm	102
3.3.3	Effets sur l'activité élastolytique	102
3.4	Caractérisation des isolats actifs contre <i>P. aeruginosa</i> PAO1	104
3.4.1	Clonalité	104
3.4.2	Identification	104
3.4.3	Croissance	105
3.4.4	Antibiorésistances	109
3.5	Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	109
3.5.1	Effets des bactéries sur la viabilité des cellules A549	109
3.5.2	Effets des bactéries sur la sécrétion de cytokines . .	111
3.6	Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à <i>P. aeruginosa</i> PAO1	115

3.6.1 Prophylaxie avec une administration de lactobacilles 115

3.6.2 Prophylaxie avec deux administrations de lactobacilles 118

3.1. Isolement et identification de lactobacilles oraux

3.1 Isolement et identification de lactobacilles oraux

Deux-cent quinze isolats bactériens ont été obtenus à partir d'écouvillonnages de cavités orales de volontaires sains (table 3.2). Parmi ces 215 isolats, 15 n'ont pu être identifiés en spectrométrie de masse : le résultat alors obtenu (*NPF* pour *No Peak Found*) indiquait l'impossibilité pour l'automate de procéder à l'analyse de l'empreinte protéique. Parmi les 200 autres isolats, 12 ont été classés dans d'autres genres que *Lactobacillus*, avec des scores inférieurs à 1,7, témoignant de l'absence de fiabilité concernant ces identifications. Parmi ces 12 isolats, cinq étaient rattachés au genre *Pseudomonas*, trois au genre *Staphylococcus*, deux au genre *Paenibacillus*, un au genre *Aromatoleum*, un au genre *Weissella*. Finalement, 188 isolats ont été rattachés au genre *Lactobacillus*, parmi lesquels 164 (87,2%) ont obtenu un score d'identification en spectrométrie de masse supérieur à 1,7 (table 3.2). Parmi ces 164 isolats 73,4% appartenaient à l'une des trois espèces *L. fermentum*, *L. paracasei* ou *L. salivarius*. Malgré l'utilisation de géloses LAMVAB, des *L. salivarius* ont été isolés.

TABLE 3.1 – Signification des scores attribués lors d'une identification par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF.

Score	Signification
2,300 à 3,000	Forte probabilité d'identification à l'espèce
2,000 à 2,299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable
1,700 à 1,999	Identification au genre probable
0,000 à 1,699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification

TABLE 3.2 – Identification préliminaire, déterminée par spectrométrie de masse, des 188 lactobacilles isolés au cours des écouvillonnages des cavités orales de volontaires sains.

Espèces	Score MALDI-ToF						Totaux	%
	>2.3	>2.0	>1.7	<1.7				
<i>L. casei</i>	0	5	5	2			12	6.4%
<i>L. equi</i>	0	0	0	1			1	0.5%
<i>L. fermentum</i>	0	18	54	8			80	42.6%
<i>L. oris</i>	0	1	2	0			3	1.6%
<i>L. paracasei</i>	9	20	4	2			35	18.6%
<i>L. plantarum</i>	0	1	3	1			5	2.7%
<i>L. reuteri</i>	0	2	4	1			7	3.7%
<i>L. rhamnosus</i>	0	1	5	1			7	3.7%
<i>L. sakei</i>	0	0	1	0			1	0.5%
<i>L. salivarius</i>	0	5	13	5			23	12.2%
<i>L. vaginalis</i>	0	3	0	0			3	1.6%
<i>L. zeae</i>	0	2	1	1			4	2.1%
<i>L. sp</i>	0	2	3	2			7	3.7%
Totaux selon scores MALDI-ToF	9	60	95	24			188	100%
% selon scores MALDI-ToF	4.8%	31.9%	50.5%	12.8%			100.0%	

3.2. Sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 aux acides organiques et aux pH acides

3.2 Sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 aux acides organiques et aux pH acides

Les résultats obtenus lors des tests d'inhibition ont semblé indiquer que *P. aeruginosa* PAO1 était sensible aux acides lactique et acétique ainsi qu'aux pH acides. La croissance de *P. aeruginosa* PAO1 a donc été mesurée dans différentes conditions de pH et en présence de différentes concentrations en acide lactique ou acétique. *P. aeruginosa* PAO1 s'est avéré sensible à une acidification par un acide fort (HCl, $p < 0,0001$) avec une inhibition prononcée de sa croissance à pH 5 et 4 ($p < 0,0001$). En revanche, aucun effet spécifique de l'acide lactique n'a été observé ($p = 0,99$, fig. 3.1). L'ajout d'acide acétique au milieu de culture (bouillon LB) a induit des effets différents : comme observé précédemment, l'acidification a induit une diminution significative de la croissance de *P. aeruginosa* PAO1. De plus, l'acide acétique a présenté une activité inhibitrice spécifique sur la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 ($p = 0,0013$) à pH 6 pour des concentrations supérieures à 50 mM et à pH 5 pour des concentrations supérieures à 25 mM. Aucun effet spécifique de l'acide acétique n'a été constaté à pH 4 ni à pH 7 (fig. 3.2).

La forte sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 aux pH acides et à l'acide acétique nous a contraints à utiliser des milieux pauvres en sucres afin de tester l'activité des lactobacilles contre cette bactérie. C'est la raison pour laquelle, lors des expérimentations portant sur la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1, nous avons choisi d'utiliser le BHI qui ne contient que 2 g/l de glucose et qui permet ainsi de limiter la production d'acides par les lactobacilles.

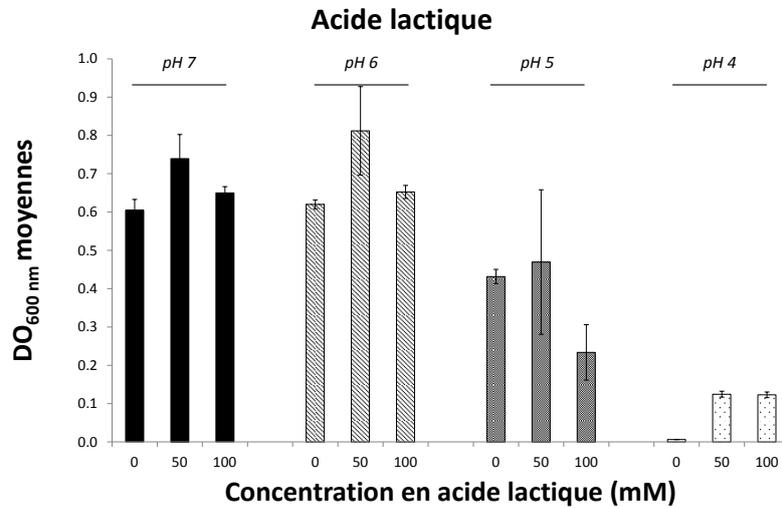


FIGURE 3.1 – Croissance de *P. aeruginosa* PAO1 dans du bouillon LB, pendant 22 heures, à différents pH et différentes concentrations en acide lactique. En absence d'acide lactique, la diminution de pH était obtenue par addition de HCl 1N. Chaque résultat représente la moyenne de trois essais.

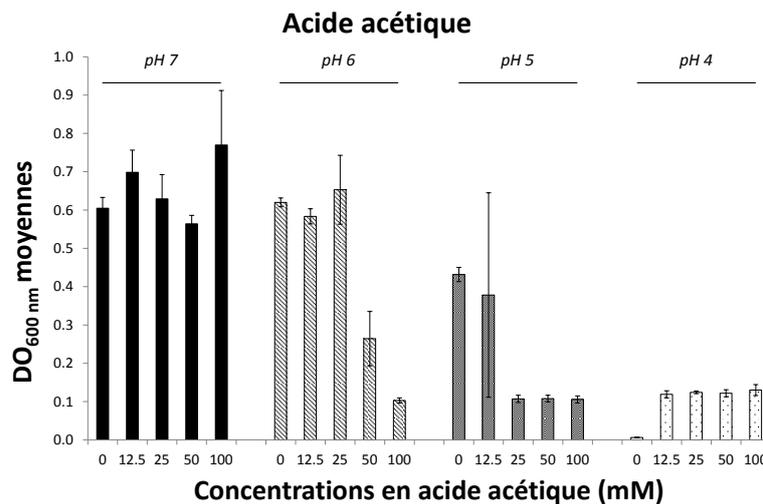


FIGURE 3.2 – Croissance de *P. aeruginosa* PAO1 dans du bouillon LB, pendant 22 heures, à différents pH et différentes concentrations en acide acétique. En absence d'acide acétique, la diminution de pH était obtenue par addition de HCl 1N. Chaque résultat représente la moyenne de trois essais.

3.3. Effets des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1

3.3 Effets des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1

3.3.1 Effets sur la croissance

3.3.1.1 Tests d'inhibition en double couche

Trente-six isolats du lait ont été testés (fig. 2.2). La largeur de la zone d'inhibition était supérieure à 54 mm lors de tous les essais contre *P. aeruginosa* PAO1 (table 3.3), et atteignait toute la largeur de la boîte pour 21 lactobacilles sur 36. Tous les lactobacilles ont, dans une moindre mesure, également inhibé la croissance de *S. aureus* SA1, avec des largeurs de zones d'inhibition supérieures à 20 mm (table 3.4). Ces résultats ont démontré l'existence d'un mécanisme d'inhibition des deux pathogènes commun à tous les lactobacilles testés. Les lactobacilles étant des producteurs importants d'acides organiques, nous avons émis l'hypothèse que les deux pathogènes testés, notamment *P. aeruginosa* PAO1, étaient sensibles aux acides organiques produits par les lactobacilles. Ainsi, les tests d'inhibition suivants ont été réalisés avec la méthode des puits et en utilisant des surnageants de cultures de lactobacilles neutralisés à pH 6 afin d'éviter des inhibitions strictement dues à la présence d'acides organiques et pour essayer de mettre en évidence la production éventuelle de bactériocines.

3.3.1.2 Tests d'inhibition par diffusion en puits

Cinquant-huit lactobacilles ont ainsi été testés dont les 36 déjà testés lors des essais en double couche. Aucune inhibition, ni de la croissance de *P. aeruginosa* PAO1, ni de celle de *S. aureus* SA1, n'a ainsi pu être mise en évidence, confirmant ainsi l'hypothèse d'une inhibition exclusivement liée à la présence d'acides organiques produits par les lactobacilles.

3.3.1.3 Cocultures en bouillon *Brain Heart Infusion*

Afin de valider les tests d'inhibition de la formation de biofilm et de l'activité élastolytique, l'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 en

TABLE 3.3 – Résultats des essais d’inhibition en double couche de la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 par des lactobacilles.

	Espèces	Dimensions des stries de lactobacilles (mm)		Dimension des zones d’inhibition	
		Hauteur	Largeur	Hauteur	Largeur
K.B4.7.3A	<i>L. casei</i>	59	6	90	60
K.B6.3.1A	<i>L. brevis</i>	53	5	90	90
K.C1.3.1C	<i>L. plantarum</i>	51	6	90	90
K.C1.7.1A	<i>L. plantarum</i>	50	7	90	64
K.C2.3.1B	<i>L. plantarum</i>	46	6	90	90
K.C2.3.1D	<i>L. fermentum</i>	50	6	90	54
K.C4.7.0A	<i>L. plantarum</i>	53	6	90	90
K.C4.7.0C	<i>L. plantarum</i>	57	6	90	90
K.C4.7.1A	<i>L. plantarum</i>	49	6	90	78
K.C5.3.1B	<i>L. rhamnosus</i>	57	5	90	90
K.C6.3.2G	<i>L. fermentum</i>	58	5	90	75
K.C8.3.1I	<i>L. rhamnosus</i>	51	5	69	58
K.V1.6.2	<i>L. plantarum</i>	52	6	90	90
K.V2.3.1D (2)	<i>L. plantarum</i>	50	5	90	90
K.V2.3.2C	<i>L. plantarum</i>	47	7	90	90
K.V2.7.1 (2)	<i>L. plantarum</i>	51	6	90	90
K.V5.3.1G	<i>L. parabuchneri</i>	51	5	80	69
K.V5.4.1A	<i>L. plantarum</i>	55	6	90	76
K.V5.4.1B	<i>L. plantarum</i>	56	6	90	71
K.V5.6.1C	<i>L. plantarum</i>	56	6	90	78
K.V6.3.1H	<i>L. plantarum</i>	45	6	90	90
K.V6.3.1J	<i>L. plantarum</i>	50	6	90	90
K.V6.3.1K	<i>L. parabuchneri</i>	44	3	90	90
M.C4.3.1E	<i>L. rhamnosus</i>	48	5	90	78
M.C4’4.3B	<i>L. rhamnosus</i>	50	16	90	72
M.C5.3.1B	<i>L. rhamnosus</i>	53	5	90	90
M.C5’3.1C (1)	<i>L. plantarum</i>	54	6	90	90
M.C5’3.1D	<i>L. plantarum</i>	49	6	90	90
M.C5’6.1B	<i>L. plantarum</i>	50	5	90	72
M.C5’7.1B	<i>L. plantarum</i>	49	6	90	90
M.V4.3.1F	<i>L. plantarum</i>	52	6	90	78
M.V6.3.1F	<i>L. plantarum</i>	28	7	90	90
Pi.C4’3.1A	<i>L. rhamnosus</i>	53	6	90	90
Pi.C5’3.2E	<i>L. plantarum</i>	47	6	90	78
Pi.C6.3.1A	<i>L. rhamnosus</i>	50	6	90	90
Pi.V4.3.1A	<i>L. plantarum</i>	48	25	90	90

3.3. Effets des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1

TABLE 3.4 – Résultats des essais d'inhibition en double couche de la croissance de *S. aureus* SA1 par des lactobacilles.

	Espèces	Dimensions des stries de lactobacilles (mm)		Dimension des zones d'inhibition	
		Hauteur	Largeur	Hauteur	Largeur
K.B4.7.3A	<i>L. casei</i>	50	6	65	36
K.B6.3.1A	<i>L. brevis</i>	57	6	85	48
K.C1.3.1C	<i>L. plantarum</i>	54	7	75	40
K.C1.7.1A	<i>L. plantarum</i>	50	35	65	60
K.C2.3.1B	<i>L. plantarum</i>	60	7	65	33
K.C2.3.1D	<i>L. fermentum</i>	51	7	60	20
K.C4.7.0A	<i>L. plantarum</i>	50	7	85	40
K.C4.7.0C	<i>L. plantarum</i>	55	7	85	62
K.C4.7.1A	<i>L. plantarum</i>	53	6	80	40
K.C5.3.1B	<i>L. rhamnosus</i>	55	5	80	45
K.C6.3.2G	<i>L. fermentum</i>	55	6	80	40
K.C8.3.1I	<i>L. rhamnosus</i>	45	5	72	50
K.V1.6.2	<i>L. plantarum</i>	55	6	80	45
K.V2.3.1D (2)	<i>L. plantarum</i>	49	5	67	33
K.V2.3.2C	<i>L. plantarum</i>	52	7	83	57
K.V2.7.1 (2)	<i>L. plantarum</i>	50	4	70	30
K.V5.3.1G	<i>L. parabuchneri</i>	55	6	75	40
K.V5.4.1A	<i>L. plantarum</i>	52	7	80	50
K.V5.4.1B	<i>L. plantarum</i>	60	6	75	40
K.V5.6.1C	<i>L. plantarum</i>	55	6	77	46
K.V6.3.1H	<i>L. plantarum</i>	48	6	82	35
K.V6.3.1J	<i>L. plantarum</i>	52	10	72	35
K.V6.3.1K	<i>L. parabuchneri</i>	50	6	85	40
M.C4.3.1E	<i>L. rhamnosus</i>	48	16	71	50
M.C4'.4.3B	<i>L. rhamnosus</i>	53	6	75	40
M.C5.3.1B	<i>L. rhamnosus</i>	55	5	75	31
M.C5'.3.1C (1)	<i>L. plantarum</i>	50	10	70	35
M.C5'.3.1D	<i>L. plantarum</i>	53	12	70	30
M.C5'.6.1B	<i>L. plantarum</i>	51	7	75	40
M.C5'.7.1B	<i>L. plantarum</i>	50	50	90	90
M.V4.3.1F	<i>L. plantarum</i>	56	6	78	35
M.V6.3.1F	<i>L. plantarum</i>	27	7	40	25
Pi.C4'.3.1A	<i>L. rhamnosus</i>	50	6	73	35
Pi.C5'.3.2E	<i>L. plantarum</i>	47	10	67	35
Pi.C6.3.1A	<i>L. rhamnosus</i>	59	6	67	50
Pi.V4.3.1A	<i>L. plantarum</i>	48	6	68	22

présence des lactobacilles a été testée dans les mêmes conditions de 7 et 22 heures de coculture, respectivement pour les souches inhibant la formation de biofilm et l'activité élastolytique. Les lactobacilles n'ont pas inhibé de façon significative la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 après 7 ou 22 heures de coculture en BHI à 37 ° C. Après 7 heures de coculture, le pH moyen était de $6,62 \pm 0,07$, contre $6,40 \pm 0,31$ après 22 heures de coculture. Le pH des cultures de *P. aeruginosa* PAO1 seul étaient respectivement de $7,32 \pm 0,04$ et $6,90 \pm 0,05$ après 7 heures et 22 heures d'incubation, pour un pH initial du BHI de 7,40.

3.3.2 Effets sur la production de biofilm

L'activité de 87 lactobacilles sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PAO1 a pu être mesurée en utilisant un protocole inspiré des travaux de Valdez et Peeters (PEETERS et coll. 2008 ; VALDÉZ et coll. 2005). Parmi les 87 lactobacilles, 67 appartiennent à la collection d'isolats oraux et 20 à la collection d'isolats laitiers. Cinq lactobacilles, tous d'origine buccale, ont inhibé la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PAO1 durant une co-incubation en BHI, à 37 ° C et pendant 7 heures ($p < 0,05$, fig. 3.3). Les quatre *L. fermentum* ES.A.2, ES.F.115, ES.A.1a et ES.A.6a ont respectivement conduit à une diminution de la quantité de biofilm formé de 5, 7, 12 et 12%, tandis que la souche la plus active, *L. paracasei* ES.D.88, a entraîné une diminution de la quantité de biofilm formé de 16%. Les résultats, exprimés en pourcentage, sont les rapports entre les DO_{595} obtenues en présence et en absence de lactobacille.

3.3.3 Effets sur l'activité élastolytique

Les 87 lactobacilles précédemment testés pour leur capacité à inhiber la formation de biofilm ont également été testés pour leurs effets sur l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Cinq isolats ont démontré une activité inhibitrice significative ($p < 0,001$, fig. 3.4). Après 22 heures de co-incubation,

3.3. Effets des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1

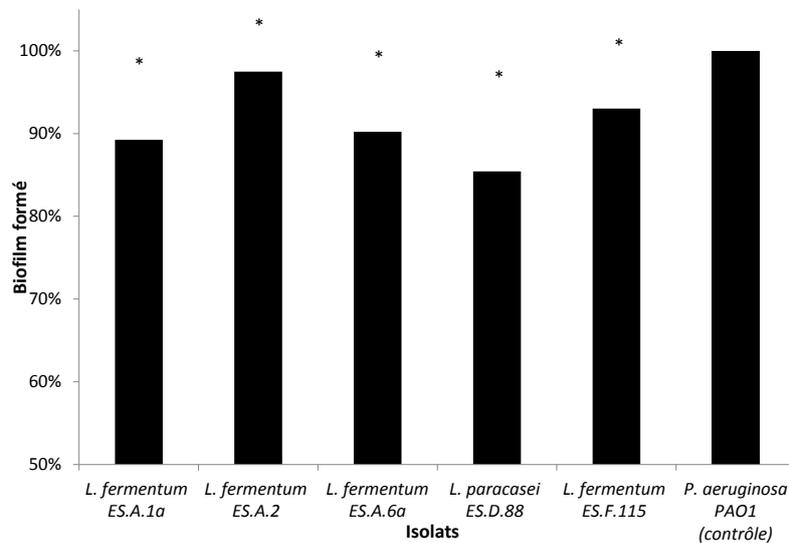


FIGURE 3.3 – Inhibition par les lactobacilles de la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PAO1. La formation de biofilm a été mesurée par densité optique (595 nm) après 7 heures d'incubation en bouillon BHI (pH = 6,6 ± 0,1). Les résultats présentés sont ceux des souches ayant démontré une capacité à réduire la quantité de biofilm formé (* $p < 0,05$). Chaque résultat représente la moyenne de 3 séries de 4 réplicats.

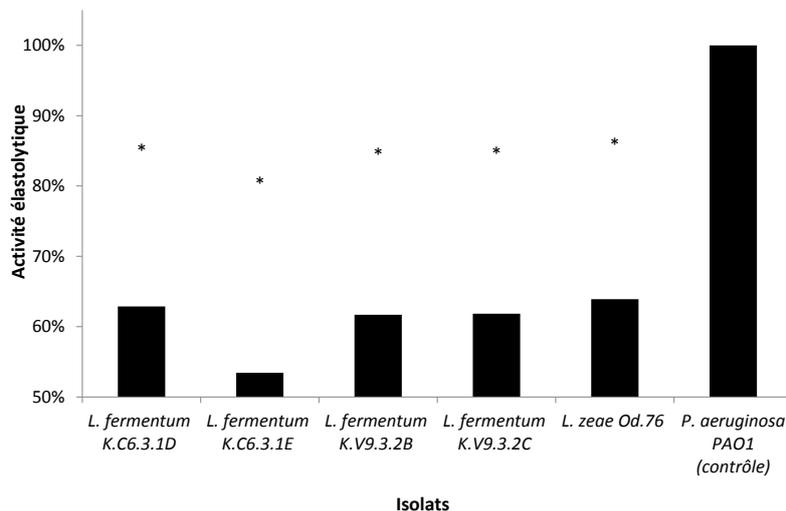


FIGURE 3.4 – Inhibition par les lactobacilles de l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. L'activité élastolytique a été mesurée par densité optique (450 nm) après 22 heures d'incubation en bouillon BHI (pH = 6,4 ± 0,3). Les résultats présentés sont ceux des souches ayant démontré une capacité à réduire la quantité de biofilm formé (* $p < 0,001$). Chaque résultat représente la moyenne de 3 séries d'essais.

L. fermentum K.C6.3.1D, K.V9.3.2B, K.V9.3.2C et K.C6.3.1E ont respectivement inhibé l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 de 37 %, 38 %, 38 % et 47 %, tandis que *L. zeae* Od.76 a inhibé cette activité de 36 %. Les résultats représentent les rapports entre les DO₄₅₀ en présence et en absence de lactobacille. Les 4 *L. fermentum* ont été isolés de laits crus tandis que le *L. zeae* a été isolé de la cavité orale d'un volontaire sain.

3.4 Caractérisation des isolats actifs contre *P. aeruginosa* PAO1

3.4.1 Clonalité

Parmi les 10 isolats ayant présenté une activité inhibitrice, les isolats *L. fermentum* ES.A.1a, ES.A.2 et ES.A.6a, actifs contre la formation de biofilm, appartenaient au même clone. Seuls 8 isolats sur 10 incluant la souche *L. fermentum* ES.A.2 ont donc été conservés au cours des essais ultérieurs.

3.4.2 Identification

3.4.2.1 Séquençage

Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S a permis de confirmer l'appartenance des souches ES.A.2, ES.F.115, K.C6.3.1D, K.C6.3.1E, K.V9.3.2B et K.V9.3.2C à l'espèce *L. fermentum* et de la souche ES.D.88 à l'espèce *L. paracasei*. L'analyse de ce gène a permis de situer la souche Od.76 au sein du groupe *L. casei*, sans pouvoir déterminer si elle appartenait à l'espèce *L. casei* ou *L. zeae*. Le séquençage du gène *rpoA* a simplement confirmé ces résultats, sans apporter plus d'information concernant la souche Od.76. Le séquençage du gène *pheS* a d'une part permis de confirmer les identités des souches ES.A.2, ES.D.88, ES.F.115, K.C6.3.1D, K.C6.3.1E, K.V9.3.2B et K.V9.3.2C et d'autre part d'attribuer Od.76 à l'espèce *L. zeae* (table 3.6). Les séquences des gènes *ARNr 16S*, *rpoA* et *pheS* ont été déposées dans la banque de données *Genbank*

3.4. Caractérisation des isolats actifs contre *P. aeruginosa* PAO1

(table 3.7).

3.4.3 Croissance

La croissance des 8 lactobacilles présélectionnés a été étudiée dans du bouillon MRS largement utilisé pour la croissance des lactobacilles ainsi que dans une salive artificielle. Lors de la croissance en bouillon MRS, la phase de latence a duré entre 1 et 4 heures quelle que soit la souche, hormis pour *L. fermentum* ES.A.2 dont la phase de croissance exponentielle n'a débuté qu'après 12 heures d'incubation à 37 ° C (fig. 3.5). Les lactobacilles ont été classés en deux groupes distincts : une fois la phase stationnaire atteinte, les DO₆₀₀ mesurées pour *L. fermentum* K.C6.3.1D et *L. paracasei* ES.D.88 sont restées stables tandis que pour les 6 autres souches, une chute importante des DO₆₀₀ a été observée. Ces résultats ont mis en évidence l'existence d'un mécanisme de floculation pour les souches *L. fermentum* ES.A.2, ES.F.115, K.C6.3.1E, K.V9.3.2B, K.V9.3.2C et *L. zae* Od.76.

Toutes les souches ont démontré une bonne capacité à survivre et à pousser dans la salive artificielle. Après 48 heures d'incubation à 37 ° C, les concentrations des 8 lactobacilles étaient comprises entre $1,8 \cdot 10^6$ et $9,3 \cdot 10^7$ ufc/ml pour des concentrations initiales comprises entre $2,6 \cdot 10^3$ et $8,1 \cdot 10^4$ ufc/ml (fig. 3.6). Quelles que soient les souches testées, aucune acidification significative du milieu n'a été observée au cours des 12 premières heures de culture (pH $7,14 \pm 0,06$). En revanche, après 24 heures d'incubation, des différences entre les pH ont été observées selon les souches testées (fig. 3.7). Ces dernières ont été réparties en deux groupes selon leur capacité d'acidification : les souches du premier groupe (*L. fermentum* K.V9.3.2B, K.V9.3.2C, ES.A.2 et ES.F.115 ainsi que *L. paracasei* ES.D.88) ont peu acidifié le milieu, diminuant son pH de $0,65 \pm 0,31$ unités, tandis que les souches appartenant au second groupe (*L. fermentum* K.C6.3.1D et K.C6.3.1E ainsi que *L. zae* Od.76) ont

TABLE 3.5 – Identification des 8 souches sélectionnées par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF et par galeries API 50 CHL.

Souche	Spectrométrie de masse MALDI-ToF		API 50 CHL	
	Identification	Score	Identification	Score
ES.A.2	<i>L. fermentum</i>	1.916	<i>L. fermentum</i>	96.30%
ES.D.88	<i>L. paracasei</i>	2.458	<i>L. paracasei</i>	98.40%
ES.F.115	<i>L. fermentum</i>	2.210	<i>L. fermentum</i>	98.50%
Od.76	<i>L. zeae</i>	2.089	- *	- *
	<i>L. casei</i>	2.043		
K.C6.3.1D	<i>L. fermentum</i>	2.180	<i>L. fermentum</i>	99.70%
K.C6.3.1E	<i>L. fermentum</i>	2.109	<i>L. fermentum</i>	99.70%
K.V9.3.2B	<i>L. fermentum</i>	2.163	<i>L. fermentum</i>	99.70%
K.V9.3.2C	<i>L. fermentum</i>	2.223	<i>L. fermentum</i>	99.80%

* pas d'identification possible de *L. zeae* par la galerie API 50 CHL

TABLE 3.6 – Identification des 8 souches sélectionnées par séquençage des gènes *ARNr 16s*, *rpoA* et *pheS*.

Souche	<i>ARNr 16S</i>	<i>rpoA</i>	<i>pheS</i>
ES.A.2	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
ES.D.88	groupe <i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>
ES.F.115	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
Od.76	groupe <i>L. casei</i>	<i>L. zeae/casei</i>	<i>L. zeae</i>
K.C6.3.1D	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
K.C6.3.1E	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
K.V9.3.2B	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
K.V9.3.2C	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>

TABLE 3.7 – Numéros d'accèsion Genbank des séquences *ARNr 16S*, *rpoA* et *pheS*.

Souche	<i>ARNr 16S</i>	<i>rpoA</i>	<i>pheS</i>
ES.A.2	[KC762296]	[KC861367]	-
ES.D.88	[KC762297]	[KC861369]	-
ES.F.115	[KC762298]	[KC861368]	-
Od.76	[KC762299]	[KC861370]	[KJ402364]
K.C6.3.1D	[KC762300]	[KC861371]	-
K.C6.3.1E	[KC762301]	[KC861372]	-
K.V9.3.2B	[KC762302]	[KC861373]	-
K.V9.3.2C	[KC762303]	[KC861374]	-

3.4. Caractérisation des isolats actifs contre *P. aeruginosa* PAO1

induit une acidification plus importante de l'ordre de $2,45 \pm 0,30$ unités de pH. Après 48 heures d'incubation, les deux lactobacilles hétérofermentaires facultatifs *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zeae* Od.76 étaient ceux ayant entraîné l'acidification la plus importante (diminution du pH de $3,28 \pm 0,36$ unités).

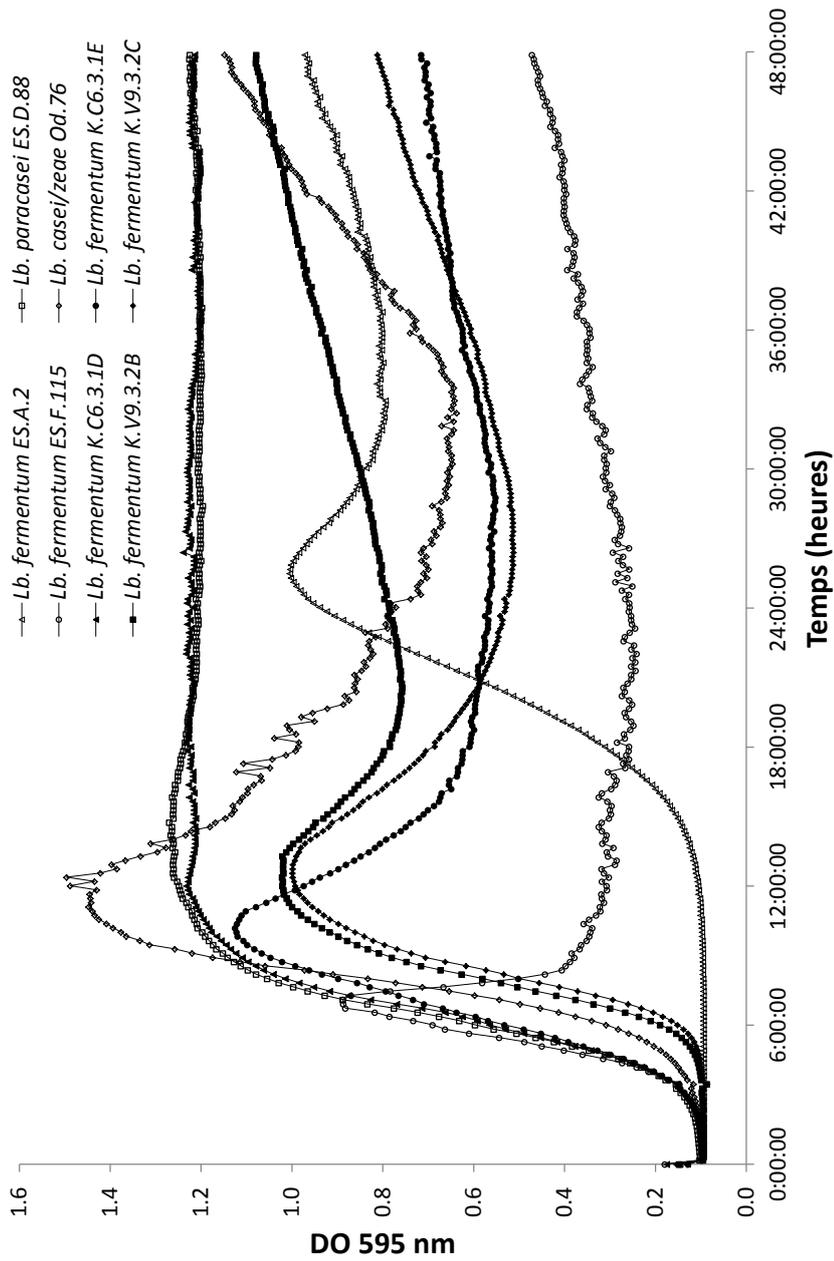


FIGURE 3.5 – Suivi de la croissance des lactobacilles dans du bouillon MRS par mesure de la densité optique à 600 nm. Moyennes de triplicats.

3.5. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

3.4.4 Antibiorésistances

Les profils de résistances aux antibiotiques des souches de lactobacilles ont été établis en fonction des recommandations de l'EFSA (*European Food Safety Authority*) (BORIES et coll. 2008). Aucune des souches de lactobacilles n'a démontré de résistance autre que celle à la Vancomycine, propre au genre *Lactobacillus*.

3.5 Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

Parmi les 8 souches sélectionnées lors du criblage, *L. paracasei* ES.D.88, *L. zeae* Od.76 et *L. fermentum* K.C6.3.1E ont été retenues et utilisées en mélange afin d'étudier d'une part leur innocuité pour les cellules et d'autre part leur capacité éventuelle à protéger les cellules A549 (lignée de pneumocytes de type II) de la cytotoxicité exercée par *P. aeruginosa* PAO1 ainsi que leurs effets sur la sécrétion des cytokines IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- α (section 2.6). Les cellules ont été co-infectées par le mélange de lactobacilles et par *P. aeruginosa* PAO1 puis incubées pendant 4 heures à 37 ° C en atmosphère modifiée (5 % CO₂). Après co-incubation de *P. aeruginosa* PAO1 avec le mélange de lactobacilles dans du DMEM, les concentrations de *P. aeruginosa* PAO1 étaient les mêmes qu'en l'absence des lactobacilles (respectivement 2,8.10⁶ et 3,1.10⁶ ufc par puits), témoignant de l'absence d'effet bactéricide des lactobacilles sur *P. aeruginosa* PAO1 dans les conditions des tests cellulaires. Après traitement par la gentamicine, aucune bactérie n'était détectée dans le DMEM.

3.5.1 Effets des bactéries sur la viabilité des cellules A549

Les pourcentages de viabilité ont été exprimés par rapport aux résultats du groupe Ctrl. La viabilité des cellules A549 du groupe Lb (4 heures d'incubation, MOI = 250) était de 112 % ($p = 0,044$), signe de l'absence de cytotoxicité

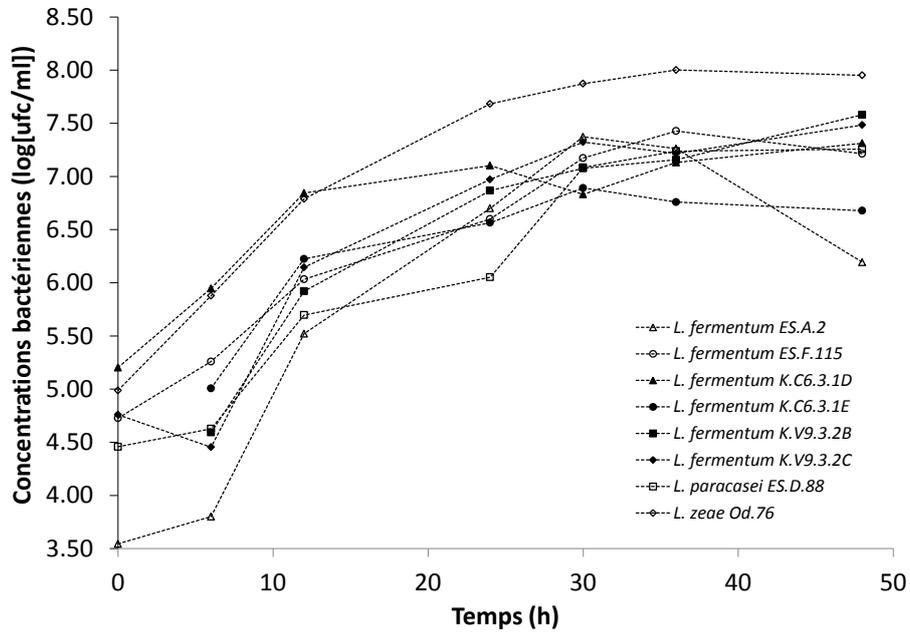


FIGURE 3.6 – Mesure de la croissance des lactobacilles dans une salive artificielle par dénombrements sur gélose MRS. Moyennes de triplicats.

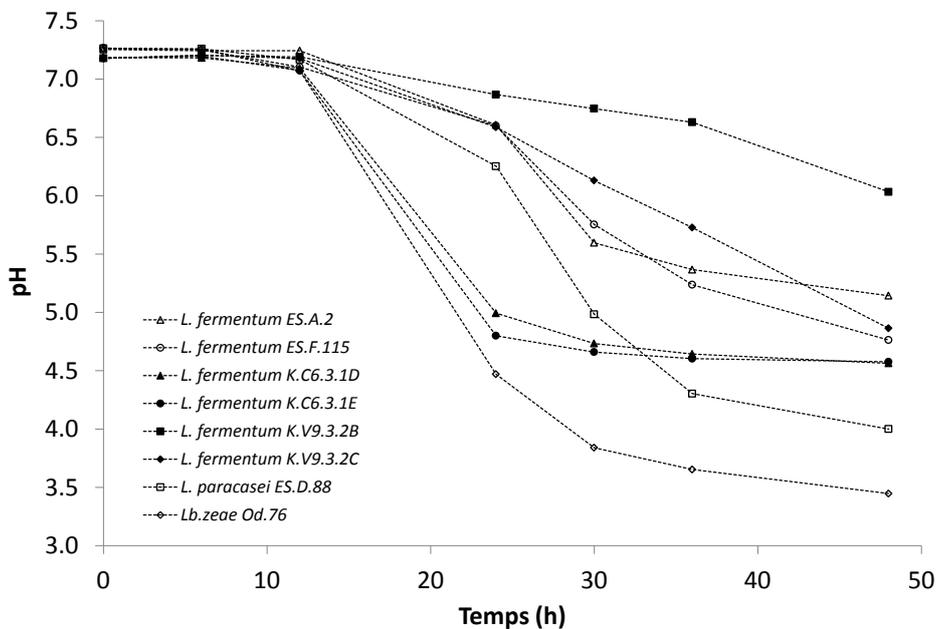


FIGURE 3.7 – Variations de pH de la salive artificielle lors de la croissance des lactobacilles. Moyennes de triplicats.

3.5. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

des lactobacilles pour les cellules. Concernant le groupe PAO1, la viabilité des cellules A549 était de 23 % (fig. 3.8), démontrant la cytotoxicité de *P. aeruginosa* PAO1 vis-à-vis des cellules. La viabilité des cellules était de 75 % pour le groupe LbPAO1. En présence des lactobacilles, la viabilité des cellules était en partie restaurée par rapport au groupe PAO1 ($p < 0,001$) sans toutefois atteindre la viabilité observée pour le groupe Ctrl ($p < 0,001$).

3.5.2 Effets des bactéries sur la sécrétion de cytokines

Les lactobacilles et *P. aeruginosa* PAO1 seuls ont augmenté la production d'IL-6 par les cellules par rapport au groupe Ctrl (fig. 3.9). Les concentrations dans les surnageants étaient respectivement de $27,6 \pm 6,5$, de $60,5 \pm 12,0$ ($p = 0,04$) et de $68,4 \pm 8,3$ pg/ml ($p = 0,03$) pour les groupes Ctrl, Lb et PAO1. En présence à la fois des lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1, la concentration en IL-6 était également augmentée et était de $84,5 \pm 10,3$ pg/ml ($p < 0,001$).

Il n'y a pas eu de différence significative de production d'IL-8 entre les groupes Ctrl et Lb (fig. 3.10). Les concentrations dans les surnageants étaient respectivement de 1731 ± 237 et de 2317 ± 215 pg/ml ($p = 0,1$) pour les groupes Ctrl et Lb. *P. aeruginosa* PAO1 a augmenté la production d'IL-8 par les cellules A549. La concentration moyenne dans les surnageants était de 3526 ± 284 pg/ml pour le groupe PAO1 ($p < 0,001$). En présence des lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 (LbPAO1), la concentration en IL-8 était également augmentée et était de 3155 ± 194 pg/ml ($p = 0,001$). La présence des lactobacilles n'a pas permis d'inhiber l'augmentation de la concentration en IL-8 due à *P. aeruginosa* PAO1 ($p = 0,4$).

Les concentrations en IL-10 dans les surnageants des cultures des cellules A549 étaient faibles et toutes inférieures à 7 pg/ml lors des 48 mesures (fig. 3.11). Aucune différence n'a été observée entre les groupes Ctrl, Lb

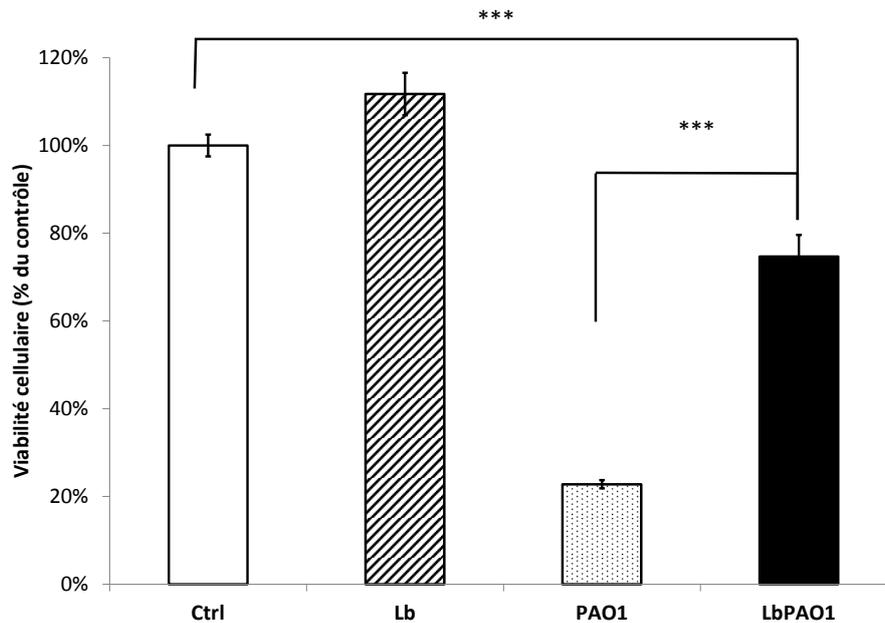


FIGURE 3.8 – Viabilité des cellules A549 après 4 heures d’incubation en absence de bactéries (Ctrl), en présence du mélange des 3 lactobacilles *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zeae* Od.76 (Lb), en présence de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1) ou en présence du mélange de lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 (LbPAO1). Le pourcentage de viabilité est exprimé en fonction du groupe contrôle. $n = 12$. *** $p < 0,001$.

($p = 0,65$) et PAO1 ($p = 0,17$), qui présentaient respectivement des concentrations en IL-10 de $0,2 \pm 0,5$, $0,1 \pm 0,5$ et $0,0 \pm 0,7$ pg/ml. La concentration en IL-10 ($2,6 \pm 1,3$) pour le groupe LbPAO1 était augmentée ($p = 0,01$) par rapport au groupe Ctrl.

Concernant la sécrétion de TNF- α , les résultats des 4 groupes étaient identiques (fig. 3.12). Les concentrations dans les surnageants étaient respectivement de 441 ± 18 , 604 ± 66 , 510 ± 77 et 535 ± 54 pg/ml pour les groupes Ctrl, Lb, PAO1 et LbPAO1. Ni les lactobacilles ni *P. aeruginosa* PAO1 n’ont eu une quelconque activité sur la production de TNF- α par les cellules A549.

3.5. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

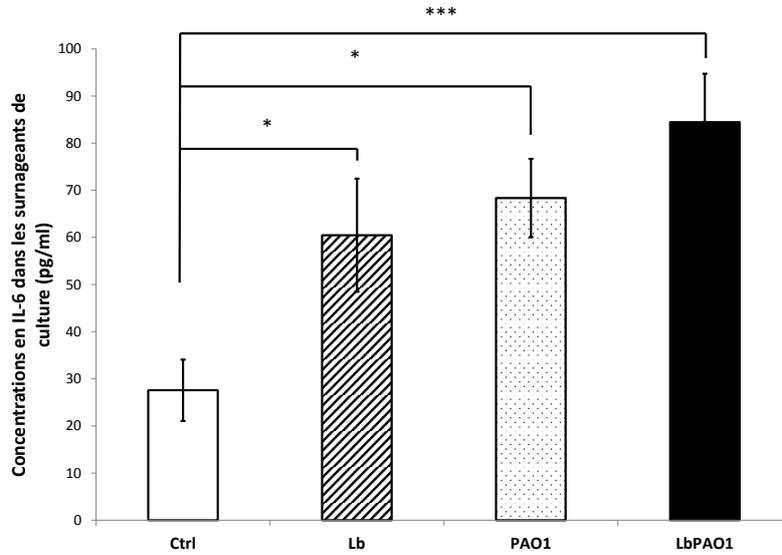


FIGURE 3.9 – Concentrations en IL-6 dans les surnageants de culture des cellules A549 après 4 heures d'incubation en absence de bactéries (Ctrl), en présence du mélange des 3 lactobacilles *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zae* Od.76 (Lb), en présence de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1) ou en présence du mélange de lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 (LbPAO1). n = 12. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

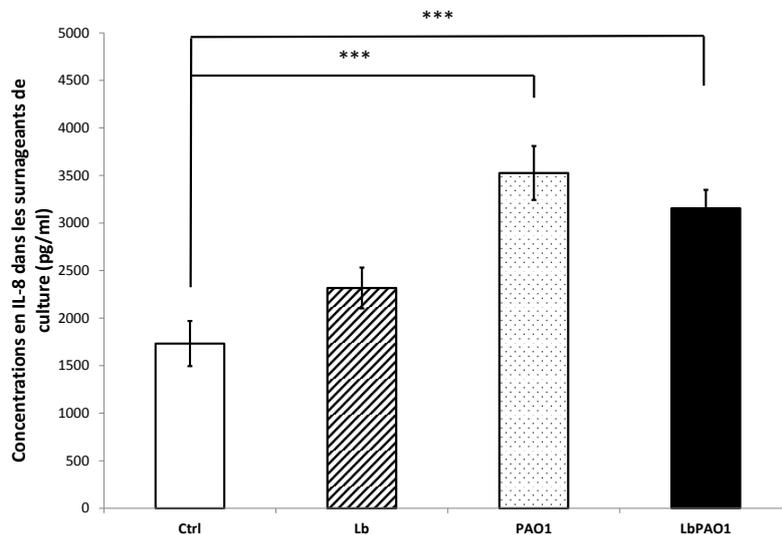


FIGURE 3.10 – Concentrations en IL-8 dans les surnageants de culture des cellules A549 après 4 heures d'incubation en absence de bactéries (Ctrl), en présence du mélange des 3 lactobacilles *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zae* Od.76 (Lb), en présence de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1) ou en présence du mélange de lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 (LbPAO1). n = 12. *** $p < 0,001$.

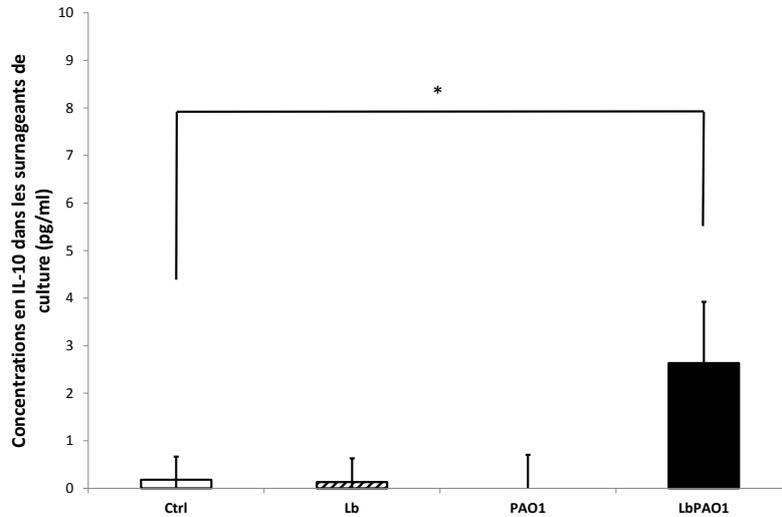


FIGURE 3.11 – Concentrations en IL-10 dans les surnageants de culture des cellules A549 après 4 heures d’incubation en absence de bactéries (Ctrl), en présence du mélange des 3 lactobacilles *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zaeae* Od.76 (Lb), en présence de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1) ou en présence du mélange de lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 (LbPAO1). n = 12. * $p < 0,05$.

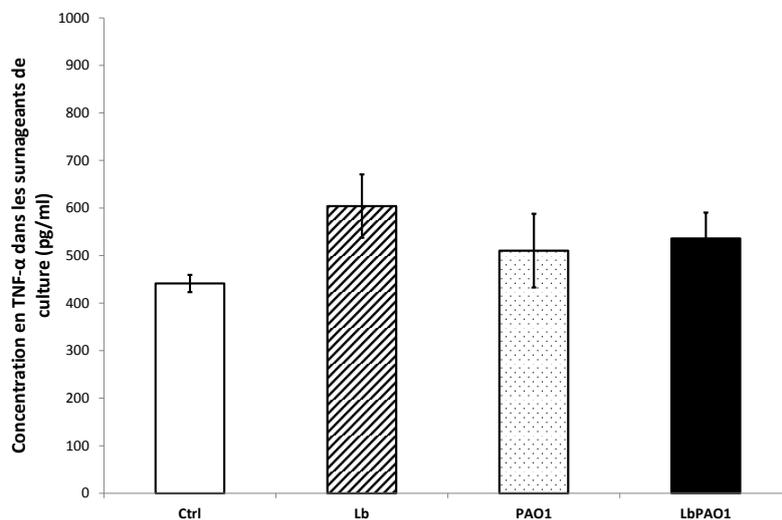


FIGURE 3.12 – Concentrations en TNF- α dans les surnageants de culture des cellules A549 après 4 heures d’incubation en absence de bactéries (Ctrl), en présence du mélange des 3 lactobacilles *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zaeae* Od.76 (Lb), en présence de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1) ou en présence du mélange de lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 (LbPAO1). n = 12. * $p < 0,05$.

3.6. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

3.6 Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

Afin de vérifier la pertinence de la stratégie de criblage *in vitro*, les effets de l'administration intratrachéale et prophylactique du mélange des 3 lactobacilles *L. paracasei* ES.D.88, *L. zeae* Od.76 et *L. fermentum* K.C6.3.1E ont été étudiés dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1. Deux séries d'expérimentations ont été menées, reposant sur deux stratégies prophylactiques différentes : le premier essai comportait une seule administration de lactobacilles 18 heures avant l'infection des animaux par *P. aeruginosa* PAO1. Le deuxième essai comportait deux administrations de lactobacilles respectivement 42 et 18 heures avant l'infection par *P. aeruginosa* PAO1.

3.6.1 Prophylaxie avec une administration de lactobacilles

3.6.1.1 Charges bactériennes pulmonaires

Lors de ce premier essai reposant sur une seule administration intratrachéale prophylactique du mélange de lactobacilles, $1,4 \cdot 10^7$ ufc de lactobacilles et $5,5 \cdot 10^5$ ufc de *P. aeruginosa* PAO1 ont été instillées aux souris. Quatre heures après l'instillation de *P. aeruginosa* PAO1, les charges en *P. aeruginosa* PAO1 dans les broyats pulmonaires étaient respectivement de $1,2 \pm 0,5 \cdot 10^6$ et $3,1 \pm 0,2 \cdot 10^4$ ufc pour les groupes PAO1 et LbPAO1 ($p = 0,026$, fig. 3.13). La charge pulmonaire en *P. aeruginosa* PAO1 était ainsi inférieure dans le groupe LbPAO1. Concernant les lactobacilles, leurs concentrations étaient respectivement de $4,5 \pm 2,8 \cdot 10^4$ et $6,1 \pm 2,9 \cdot 10^4$ ufc par paire de poumons pour les groupes Lb et LbPAO1 ($p = 0,814$, fig. 3.14). *P. aeruginosa* PAO1 n'a eu aucun effet sur la persistance des lactobacilles au niveau pulmonaire.

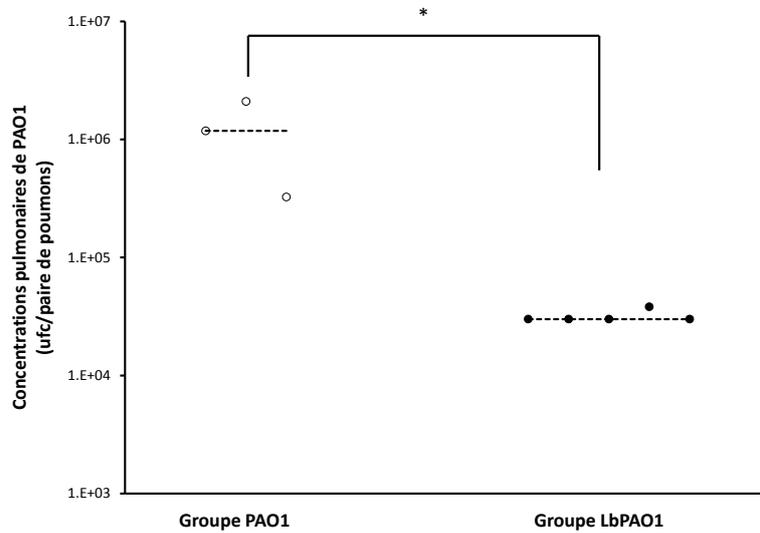


FIGURE 3.13 – Concentrations pulmonaires de *P. aeruginosa* PAO1 4 heures après l’infection dans le cas d’une prophylaxie comportant une administration de lactobacilles 18 heures avant l’infection. Groupe PAO1 : *P. aeruginosa* PAO1, n=3; Groupe LbPAO1 : lactobacilles puis *P. aeruginosa* PAO1, n=5. * $p < 0,05$.

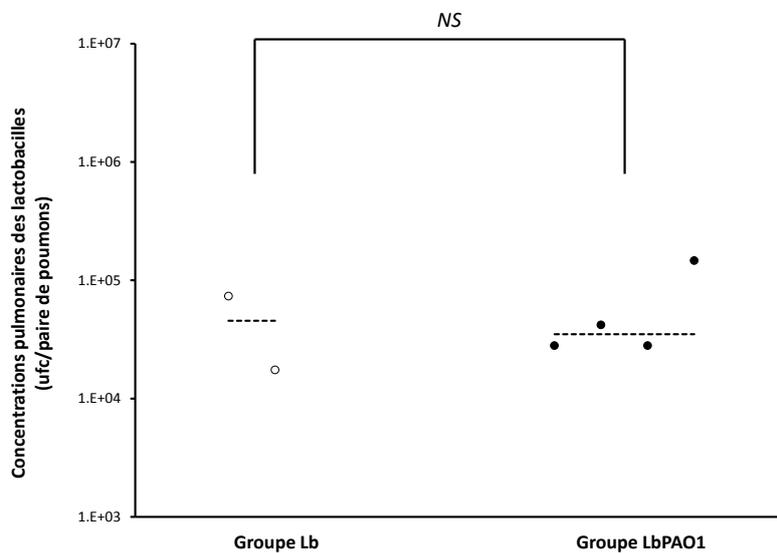


FIGURE 3.14 – Concentrations pulmonaires des lactobacilles 4 heures après instillation de sérum salé isotonique ou de *P. aeruginosa* PAO1 dans le cas d’une prophylaxie comportant une administration de lactobacilles 18 heures avant l’infection. Groupe Lb : lactobacilles, n=2; Groupe LbPAO1 : lactobacilles puis *P. aeruginosa* PAO1, n=4. NS : non significatif.

3.6. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

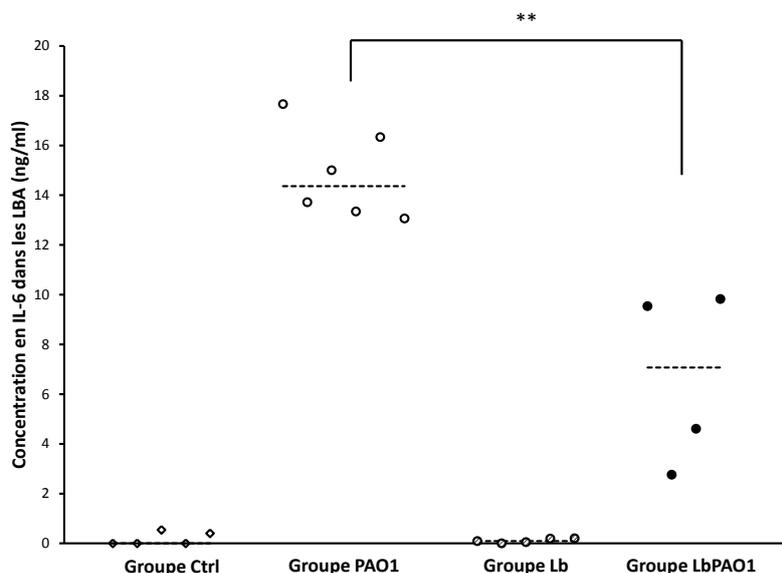


FIGURE 3.15 – Concentrations en IL-6 dans les lavages broncho-alvéolaires murins 4 heures après l’instillation de *P. aeruginosa* PAO1 dans le cas d’une prophylaxie comportant une administration de lactobacilles 18 heures avant l’infection. Ctrl : sérum physiologique seul, n=5; PAO1 : *P. aeruginosa* PAO1, n=6; Lb : lactobacilles, n=5; LbPAO1 : lactobacilles puis *P. aeruginosa* PAO1, n=4. ** $p < 0,01$.

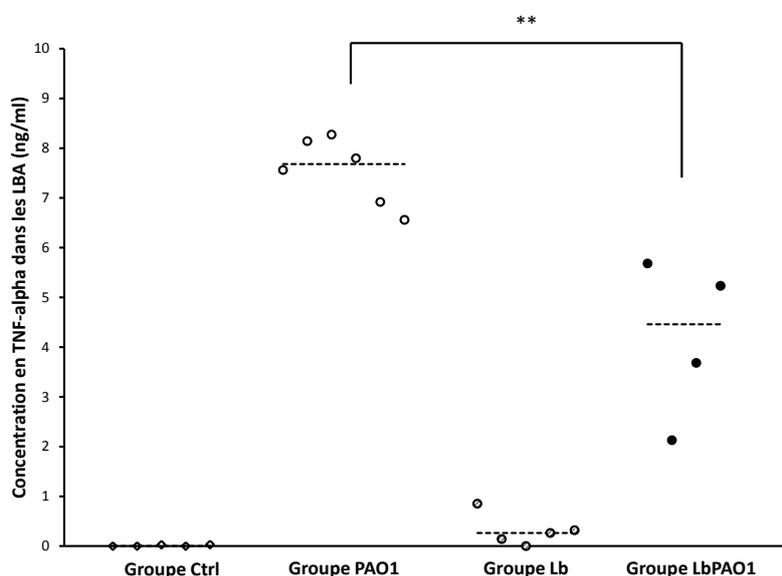


FIGURE 3.16 – Concentrations en TNF- α dans les lavages broncho-alvéolaires murins 4 heures après l’instillation de *P. aeruginosa* PAO1 dans le cas d’une prophylaxie comportant une administration de lactobacilles 18 heures avant l’infection. Ctrl : sérum physiologique seul, n=5; PAO1 : *P. aeruginosa* PAO1, n=6; Lb : lactobacilles, n=5; LbPAO1 : lactobacilles puis *P. aeruginosa* PAO1, n=4. ** $p < 0,01$.

3.6.1.2 Dosage des cytokines dans les lavages broncho-alvéolaires

Les concentrations en IL-6 dans les LBA étaient respectivement de $0,2 \pm 0,1$, $14,9 \pm 0,7$, $0,1 \pm 0,0$ et $6,7 \pm 1,8$ ng/ml pour les groupes Ctrl, PAO1, Lb et LbPAO1 (fig. 3.15). La production d'IL-6 était réduite lors d'une administration prophylactique du mélange de lactobacilles chez les souris ensuite infectées par *P. aeruginosa* PAO1 par rapport aux souris infectées n'ayant pas reçu les lactobacilles ($p = 0,009$). Les concentrations en TNF- α étaient respectivement de $0,01 \pm 0,01$, $7,5 \pm 0,3$, $0,3 \pm 0,1$ et $4,2 \pm 0,8$ ng/ml pour les groupes Ctrl, PAO1, Lb et LbPAO1 (fig. 3.16). La production de TNF- α était réduite lors de l'administration du mélange de lactobacilles chez les souris ensuite infectées par *P. aeruginosa* PAO1 par rapport aux souris infectées n'ayant pas reçu les lactobacilles ($p = 0,009$). Les concentrations en IL-10 étaient faibles, toutes inférieures à 60 pg/ml. Aucune différence significative n'a été détectée entre les groupes Ctrl, Lb, PAO1 et LbPAO1. Globalement, l'administration prophylactique de lactobacilles 18 heures avant l'infection par *P. aeruginosa* PAO1 a permis de réduire les effets pro-inflammatoires du pathogène en réduisant la sécrétion d'IL-6 et de TNF- α dans les poumons des souris.

3.6.2 Prophylaxie avec deux administrations de lactobacilles**3.6.2.1 Charges bactériennes pulmonaires**

Lors de ce deuxième essai reposant sur deux administrations intratrachéales prophylactiques du mélange de lactobacilles, $6,20 \cdot 10^6$ et $6,25 \cdot 10^6$ ufc de lactobacilles ont été instillées respectivement 42 et 18 heures avant l'instillation de $1,2 \cdot 10^6$ ufc de *P. aeruginosa* PAO1 aux souris. Quatre heures après l'instillation de *P. aeruginosa* PAO1, les charges en *P. aeruginosa* PAO1 dans les broyats pulmonaires étaient respectivement de $3,7 \pm 1,5 \cdot 10^6$ et $3,0 \pm 0,6 \cdot 10^4$ ufc pour les groupes PAO1 et LbPAO1 ($p = 0,177$, fig. 3.17). Contrairement aux résultats obtenus lors de la prophylaxie avec une seule administration de lac-

3.6. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

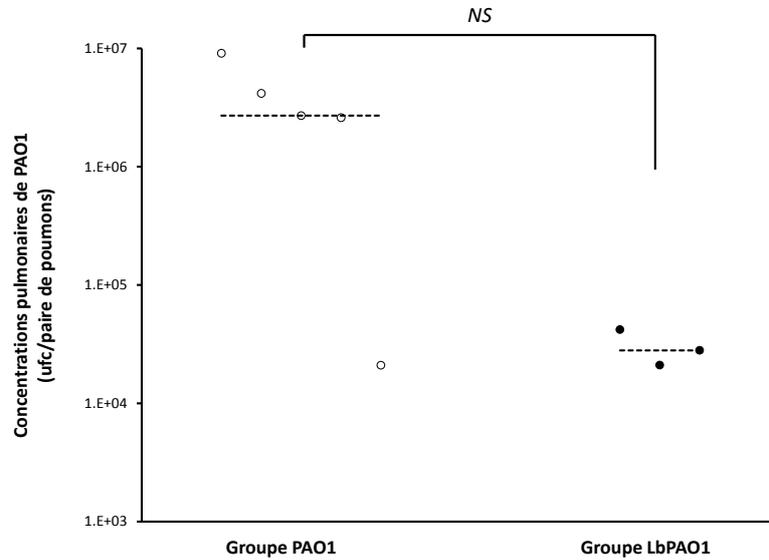


FIGURE 3.17 – Concentrations pulmonaires de *P. aeruginosa* PAO1 4 heures après l’instillation de *P. aeruginosa* PAO1 dans le cas d’une prophylaxie comportant deux administrations de lactobacilles 42 et 18 heures avant l’infection. Groupe PAO1 : *P. aeruginosa* PAO1, n=5; Groupe LbPAO1 : lactobacilles puis *P. aeruginosa* PAO1, n=3. *NS* : non significatif.

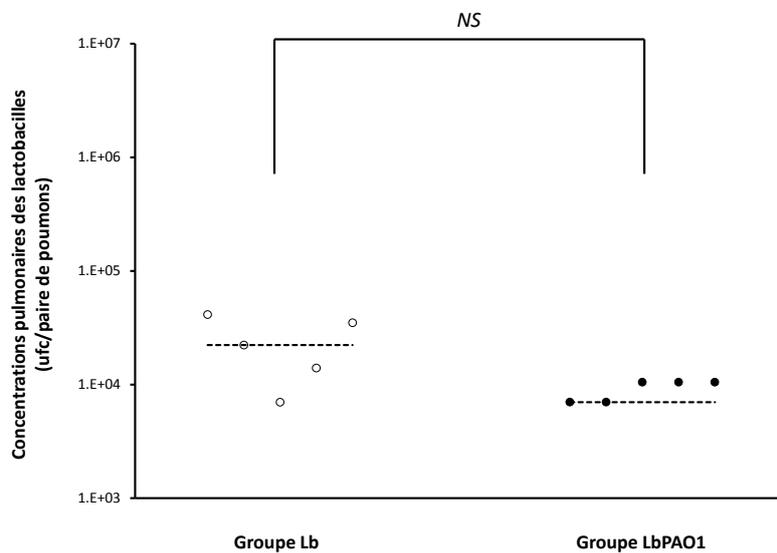


FIGURE 3.18 – Concentrations pulmonaires des lactobacilles 4 heures après l’instillation de sérum salé isotonique ou de *P. aeruginosa* PAO1 dans le cas d’une prophylaxie comportant deux administrations de lactobacilles 42 et 18 heures avant l’infection. Groupe Lb : lactobacilles, n=5; Groupe LbPAO1 : lactobacilles puis *P. aeruginosa* PAO1, n=5. *NS* : non significatif.

tobacilles, la charge pulmonaire en *P. aeruginosa* PAO1 n'était pas significativement diminuée après deux administrations prophylactiques de lactobacilles. Concernant les lactobacilles, leurs concentrations étaient respectivement de $2,4 \pm 0,6 \cdot 10^4$ et de $9,1 \pm 0,9 \cdot 10^3$ ufc par paire de poumons pour les groupes Lb et LbPAO1 ($p = 0,087$, fig. 3.18). *P. aeruginosa* PAO1 n'a ainsi pas plus eu d'effet sur la persistance pulmonaire des lactobacilles que lors de la première série d'expérimentations.

3.6.2.2 Dosage des cytokines dans les lavages broncho-alvéolaires

Les concentrations en IL-6 dans les LBA étaient respectivement de $0,2 \pm 0,1$, $10,3 \pm 1,5$, $0,3 \pm 0,1$ et $9,3 \pm 2,6$ ng/ml pour les groupes Ctrl, PAO1, Lb et LbPAO1 (fig. 3.15). La production d'IL-6 était inchangée lors de l'administration du mélange de lactobacilles chez les souris ensuite infectées par *P. aeruginosa* PAO1 par rapport aux souris infectées n'ayant pas reçu les lactobacilles ($p = 0,937$). Les concentrations en TNF- α étaient respectivement de $0,01 \pm 0,01$, $7,2 \pm 0,4$, $0,4 \pm 0,1$ et $4,0 \pm 1,1$ ng/ml pour les groupes Ctrl, PAO1, Lb et LbPAO1 (fig. 3.16). La production de TNF- α était réduite lors de l'administration du mélange de lactobacilles chez les souris ensuite infectées par *P. aeruginosa* PAO1 par rapport aux souris infectées n'ayant pas reçu les lactobacilles ($p = 0,041$). Les concentrations en IL-10 étaient faibles, toutes inférieures à 70 pg/ml. Aucune différence significative n'a été détectée entre les groupes Ctrl, Lb, PAO1 et LbPAO1.

Globalement, l'administration prophylactique de lactobacilles 42 et 18 heures avant l'infection par *P. aeruginosa* PAO1 a permis de réduire l'activité pro-inflammatoire du pathogène en réduisant la sécrétion de TNF- α dans les poumons des souris. Cette réduction de l'inflammation était moins importante que lors de la prophylaxie comportant une seule administration de lactobacilles puisque les concentrations en IL-6 étaient identiques pour les groupes

PAO1 et LbPAO1.

Lors des 2 expérimentations, une diminution de la concentration pulmonaire de *P. aeruginosa* PAO1 chez les animaux ayant reçu les 3 lactobacilles par rapport à ceux n'ayant pas reçu les lactobacilles a été observée, bien que cette différence n'ait été significative que lors de la première série d'expérimentations. Chez les souris infectés par *P. aeruginosa* PAO1 et ayant reçu une ou deux doses prophylactiques du mélange de lactobacilles, la production de TNF- α était réduite par rapport aux souris n'ayant pas reçu les lactobacilles. La sécrétion d'IL-6 n'était réduite qu'après une seule administration de lactobacilles chez les souris infectées. Après deux administrations de lactobacilles, les concentrations pulmonaires en IL-6 chez les souris infectées étaient équivalentes à celles observées chez les animaux n'ayant pas reçu les lactobacilles.

CHAPITRE 4

Discussion

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste chez les patients particulièrement vulnérables. C'est l'une des principales causes de pneumonies nosocomiales, notamment chez les patients sous ventilation mécanique où ces infections aboutissent à une augmentation de la mortalité (CROUCH BREWER et coll. 1996 ; FUJITANI et coll. 2011). L'inflammation causée par les infections chroniques à *P. aeruginosa* est également responsable d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité chez les patients atteints de la mucoviscidose (LYCZAK et coll. 2002). Les fréquences élevées, leur sévérité et les résistances aux traitements antibiotiques qui caractérisent les infections à *P. aeruginosa* mettent en évidence la nécessité de développer de nouvelles thérapies. Différents essais portant sur l'utilisation de probiotiques dans le cadre des pneumonies à *P. aeruginosa* ont été menés, avec des résultats divergents (ALEXANDRE et coll. 2013). Les lactobacilles sont des bactéries majoritairement non-pathogènes et fortement associées au microbiote humain, souvent utilisées comme probiotiques. Leurs effets en tant que probiotiques sont divers et dépendent des souches employées : activité anti-bactérienne, renforcement de l'effet barrière des épithéliums, stimulation du système immunitaire (PETROF 2009). En raison de ces effets souche-dépendants, il est important de sélectionner les lactobacilles à utiliser pour une application particulière en fonction

de critères les plus objectifs possibles : l'un des problèmes rencontrés lors de l'analyse des articles parus sur le sujet est parfois le manque de justification concernant le choix des souches utilisées. Quelques souches de lactobacilles (*L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* 299, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. acidophilus*) ont déjà été testées contre les pneumonies à *P. aeruginosa* avec plus ou moins de succès dans le cadre des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (BARRAUD et coll. 2010; SIEMPOS et coll. 2010). Les souches ainsi testées (section 1.6.3.2) n'avaient été sélectionnées ni pour leurs activités spécifiques contre *P. aeruginosa* ni pour leur adaptation particulière à l'écosystème respiratoire.

L'objectif principal de ce travail était de cribler et tester la capacité de lactobacilles isolés de cavités orales d'individus sains et de laits crus à réduire les dommages causés par une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* PAO1 dans un modèle murin. Des lactobacilles ont d'abord été isolés des cavités orales de volontaires sains. Ces isolats et quelques souches isolées de laits crus ont été testés contre la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Les isolats les plus intéressants ont été caractérisés (identification, croissance en salive artificielle, antibiorésistances). Parmi les souches retenues, trois ont été testées en mélanges dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1 puis dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1.

4.1 Isolement de lactobacilles oraux

Lors de cette étude, 188 isolats appartenant à 12 espèces différentes de lactobacilles ont été recouverts des cavités orales de 23 volontaires sains. La diversité des lactobacilles isolés de cavités orales humaines est généralement importante et ces 12 espèces sont communément rencontrées chez les individus sains (AHRNÉ et coll. 1998; COLLOCA et coll. 2008; DAL BELLO et coll. 2006;

4.2. Criblage *in vitro*

DEWHIRST et coll. 2010 ; MAUKONEN et coll. 2008 ; TEANPAISAN et coll. 2006). Les trois espèces majoritaires identifiées lors de l'étude de Dewhirst et coll. étaient *L. paracasei*, *L. vaginalis* et *L. fermentum*, comprenant respectivement 21, 17 et 12% des isolats identifiés. Lors de notre travail, les trois espèces majoritaires étaient *L. fermentum*, *L. paracasei* et *L. salivarius*, comportant respectivement 43, 19 et 12 % des isolats. Ce parallèle entre les deux travaux est à pondérer pour plusieurs raisons : nous avons travaillé sur un nombre restreint d'échantillons, obtenus uniquement chez des individus sains. Les prélèvements ont été effectués grâce à des écouvillons qui ne permettaient pas de réaliser des échantillonnages très localisés, au niveau du sulcus gingival par exemple. De plus, certains isolats obtenus chez un même individu sont probablement des clones, ce qui tempère l'interprétation de ces résultats en terme de répartition des lactobacilles au sein des diverses espèces. Malgré tout, ce travail nous a permis de constater d'une part la présence de lactobacilles dans la cavité orale d'individus sains et surtout de constater une diversité non négligeable au sein de cette population bactérienne. L'origine alimentaire de certains lactobacilles oraux ayant été suggérée (CAUFIELD et coll. 2007), des souches de lactobacilles isolées de laits crus ont été incluses dans les souches testées.

4.2 Criblage *in vitro*

La première stratégie de criblage reposait sur la capacité des lactobacilles à inhiber la croissance de *P. aeruginosa* PAO1, une souche souvent prise comme modèle et au génome entièrement séquencé. Les premiers essais en double couche et en puits ont mis en évidence le fait que tous les lactobacilles testés inhibaient cette croissance, nous poussant à nous interroger sur un éventuel effet générique propre à tous les lactobacilles, et non souche-dépendant. Lors de cette étude, il a ainsi été démontré que *P. aeruginosa* PAO1 était particulièrement sensible aux pH acides et à l'acide acétique, cette sensibilité étant

dose-dépendante. Ainsi, à pH 4 ou 5, la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 était complètement inhibée pour des concentrations supérieures à 25 mM. À pH 6, une concentration en acide acétique supérieure à 50 mM était nécessaire afin d'observer les mêmes résultats. En raison de cette sensibilité, une autre stratégie de criblage des lactobacilles a été mise en œuvre afin de chercher des mécanismes d'inhibition ne faisant pas intervenir la production d'acides, commune à tous les lactobacilles. Nous avons choisi de tester les effets des lactobacilles contre la production de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Ce sont en effet deux des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, la formation de biofilm étant indispensable à la colonisation des poumons et l'activité élastolytique étant une cause importante de destruction des tissus pulmonaires. Les différents essais nécessitant des cocultures ont été réalisés dans du bouillon BHI (2 g/l de glucose) afin de limiter la production d'acides par les lactobacilles. Cette stratégie nous a permis de distinguer les effets purement acides des autres mécanismes impliqués dans la réduction de la virulence de *P. aeruginosa* PAO1. Les lactobacilles testés ont été sélectionnés parmi les isolats oraux (n = 67) ainsi qu'au sein de la collection d'isolats laitiers (n = 20) du LUBEM.

Le criblage de ces deux collections a abouti à la sélection de 5 isolats actifs contre la production de biofilm ainsi que de 5 isolats inhibant l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Les 5 lactobacilles actifs contre la formation de biofilm ont été isolés dans la bouche de volontaires sains tandis que 4 des 5 lactobacilles inhibiteurs de l'activité élastolytique ont été isolés de laits crus. Des cocultures des lactobacilles sélectionnés et de *P. aeruginosa* PAO1, dans les conditions utilisées lors des tests d'inhibition, ont permis de confirmer l'absence d'effet sur la croissance du pathogène ainsi que l'absence d'acidification significative du milieu. Ceci combiné au faible nombre de souches actives semblent indiquer l'existence de mécanismes inhibiteurs ne faisant pas inter-

4.2. Criblage *in vitro*

venir la production d'acides.

Un typage par PFGE a permis de mettre en évidence l'existence d'une clonalité entre les 3 isolats *L. fermentum* ES.A.1a, ES.A.2 et ES.A.6a, actifs contre la formation de biofilm. Tous les lactobacilles retenus ont été identifiés au niveau de l'espèce grâce à une approche polyphasique combinant des méthodes phénotypiques (MALDI-ToF, API 50 CHL) et moléculaires (séquençages des gènes *rpoA*, *pheS* et *ARNr 16S*). À l'exception des souches *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zae* Od.76 qui sont des hétérofermentaires facultatifs, toutes les souches ayant démontré une inhibition de la production de biofilm ou de l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 appartiennent à l'espèce *L. fermentum* et sont ainsi des hétérofermentaires obligatoires, donc producteurs à la fois des acides lactique et acétique par fermentation du glucose. Il a déjà été démontré que ces acides, et en particulier l'acide acétique, exercent une activité antibactérienne (ALAKOMI et coll. 2000).

La formation de biofilm et la production d'élastase sont deux facteurs de virulence importants chez *P. aeruginosa*. Il est intéressant de noter que, parmi les 8 souches actives contre l'activité élastolytique ou la formation de biofilm, les 4 souches de *L. fermentum* isolées des laits crus (K.C6.1.D, K.C6.3.1E, K.V9.3.2B et K.V9.3.2C) ont uniquement inhibé l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1, tandis que les 2 *L. fermentum* humains (ES.A.2, ES.F.115) ont uniquement inhibé la formation de biofilm. Les deux autres souches isolées de cavités orales, *L. zae* Od.76 et *L. paracasei* ES.D.88, ont quant à elles respectivement inhibé la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Il a été démontré que l'élastase détruisait les jonctions serrées de l'épithélium respiratoire, augmentant de fait leur perméabilité et la sécrétion d'IL-8 tout en réduisant la réponse immunitaire de l'hôte (AZGHANI et coll. 2000 ; KON et coll. 1999). Dans un travail précédent, il a également été démontré que l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* était

positivement corrélée aux dégâts infligés aux poumons lors d'une infection (LE BERRE et coll. 2011). En 2000, Rumbaugh et coll. ont démontré que l'activité élastolytique et la formation de biofilm étaient sous le contrôle du quorum-sensing de *P. aeruginosa* (RUMBAUGH et coll. 2000). Il se pourrait donc que les lactobacilles puissent inhiber ce quorum-sensing, soit en produisant des molécules antagonistes des acyl homosérines lactones, soit en inhibant les facteurs de régulation des gènes *lasI* ou *lasR* (SMITH et coll. 2003). De plus, l'utilisation d'un milieu de culture pauvre en sucre (BHI) afin de limiter la production d'acide ainsi que le faible nombre de souches actives contre la formation de biofilm ou contre l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 nous permettent de penser que des mécanismes autres que la production d'acides organiques ont été impliqués. Des études ont ainsi démontré la capacité de certaines bactéries à inhiber la formation de biofilm par des mécanismes ne reposant pas sur des activités bactéricides (DHEILLY et coll. 2010 ; VALLE et coll. 2006). Valle et coll. ont par exemple observé que le surnageant de culture de *E. coli* CFT073 inhibait de façon significative la quantité de biofilm formé par *P. aeruginosa* PAK. Les auteurs de cette étude ont notamment démontré que *E. coli* CFT073 était capable de libérer sa capsule polysaccharidique et que cette dernière interférait avec la formation de biofilm par différents pathogènes dont *P. aeruginosa* PAK. Dheilly et coll. ont également constaté que la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PAO1 $_{YFP}$ était réduite en présence du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 : le biovolume ainsi que l'épaisseur de ce biofilm étaient ainsi respectivement réduits 3 et 5 fois. Il sera ainsi nécessaire d'étudier plus précisément les mécanismes permettant aux lactobacilles sélectionnés lors de ce travail d'inhiber la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 et éventuellement de vérifier leur activité contre un plus grand nombre de souches de *P. aeruginosa*.

Les activités antagonistes des bactéries probiotiques nécessitent une cer-

4.3. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

taine capacité à survivre et/ou à se multiplier dans l'écosystème ciblé. Toutes les souches actives contre la formation de biofilm ou l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 ont ainsi démontré une bonne capacité à se multiplier dans une salive artificielle, ce qui peut-être une bonne indication concernant leur capacité à survivre dans un environnement oropharyngé. Toutefois, certains travaux ont mis en évidence le risque que certains probiotiques soient impliqués dans le développement de caries (MONTALTO et coll. 2004). Afin de réduire ce risque, il pourrait être préférable d'utiliser des souches peu acidifiantes telles que *L. fermentum* K.V9.3.2B et K.V9.3.2C, inhibitrices de l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1, ou les souches *L. fermentum* ES.A.2 et ES.F.115, actives contre le biofilm, plutôt que des souches plus acidifiantes telles que *L. zae* Od.76 ou *L. paracasei* ES.D.88. Cependant, et étant donné la grande sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 à la production d'acides organiques, ces deux souches pourraient être utilisées, en assurant éventuellement un suivi de l'état bucco-dentaire des patients traités.

Lors de l'utilisation de probiotiques chez l'Homme, il est important de s'assurer que les souches employées ne puissent transmettre de gènes de résistances aux antibiotiques aux micro-organismes constituant les microbiotes oraux ou gastro-intestinaux. Ainsi, aucune des souches sélectionnées lors de ce travail n'a présenté de résistance autre que celle à la vancomycine, intrinsèque à la plupart des lactobacilles (DANIELSEN et coll. 2003).

4.3 Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

4.3.1 Modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

Nous avons choisi de mélanger trois lactobacilles parmi les 8 préselectionnés *in vitro* et de tester leurs effets dans un modèle d'infection des cellules pulmonaires A549 par *P. aeruginosa* PAO1. La souche *L. paracasei* ES.D.88

était la plus active contre la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PAO1 et *L. fermentum* K.C6.3.1E inhibait le plus fortement l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Afin de diversifier la nature du mélange de lactobacilles, nous y avons intégré *L. zeae* Od.76. Cette diversité taxonomique pourrait permettre d'augmenter la diversité des métabolismes en jeu au sein du mélange et ainsi favoriser la colonisation de l'écosystème respiratoire par le mélange de lactobacilles. De plus, ces 3 souches sont celles ayant présenté les acidifications les plus importantes après 24 heures de croissance dans une salive artificielle.

Très peu de travaux ont porté sur l'étude des interactions entre lactobacilles et cellules respiratoires. De fait, nos expériences ont été construites en adaptant des travaux portant sur l'écosystème digestif.

Notre premier choix portait sur l'utilisation de cellules 16HBE 14o-, une lignée de cellules bronchiques ; devant l'impossibilité de détecter une cytotoxicité de *P. aeruginosa* PAO1 dans ce modèle, nous avons choisi d'utiliser les cellules A549, une lignée de pneumocytes de type II. Plusieurs expérimentations ont été menées afin de sélectionner la meilleure durée d'incubation. Celle-ci devait être assez longue pour permettre à *P. aeruginosa* PAO1 d'exercer sa cytotoxicité, mais suffisamment courte pour éviter qu'une acidification trop importante du milieu par les lactobacilles n'ait d'effets sur la viabilité des cellules et de *P. aeruginosa* PAO1. La durée d'incubation des cellules en présence des lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 a été fixée à 4 heures (ADER et coll. 2005 ; WANG et coll. 2013). L'inoculation des lactobacilles ne pouvant se faire de manière prophylactique en raison de ce risque d'acidification importante du milieu, nous avons opté pour une co-inoculation des lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1. De plus, afin d'éviter une réduction du tétrazolium par des enzymes bactériennes, un traitement par de la gentamicine à 0,5 mg/ml pendant 2 heures a été ajouté à la fin de la co-incubation. Des lavages ont ensuite été réalisés afin d'éliminer un maximum de débris cellulaires ou bacté-

4.3. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

riens. En effet, lors de la mise au point du protocole, l'étape de trypsination était réalisée directement après l'incubation de 4 heures. Le traitement antibiotique n'était appliqué que sur le culot contenant cellules et bactéries. Nous avons alors constaté que les mesures de viabilité sur des culots ne contenant pas de cellules mais uniquement des bactéries étaient positives, suggérant une relative inefficacité du traitement antibiotique dans la suppression du signal lié aux bactéries, d'où une nécessité de l'appliquer directement dans les puits et avant trypsination. Après 4 heures d'incubation et 2 heures de traitement antibiotique, ni les lactobacilles ni *P. aeruginosa* PAO1 n'étaient détectables dans le milieu de culture. Enfin, nous avons choisi d'inoculer les bactéries au ratio 1 : 1 afin de respecter les ratios utilisés lors du criblage *in vitro*. Ce ratio est également le plus neutre, bien que les lactobacilles soient éventuellement défavorisés dans la mesure où ils présentent un métabolisme plus lent que celui de *P. aeruginosa* PAO1.

L'activité cytotoxique de *P. aeruginosa* sur les cellules A549 a été démontrée au cours de différents travaux (ADER et coll. 2005 ; WANG et coll. 2013). Cette cytotoxicité est en partie causée par l'élastase sécrétée par *P. aeruginosa* qui est responsable de la destruction des épithéliums respiratoires (AZGHANI et coll. 1990 ; BLACKWOOD et coll. 1983). Azghani et coll. ont également mis en évidence l'activité pro-inflammatoire de l'élastase de *P. aeruginosa* (AZGHANI et coll. 2002). En effet, lors de l'infection de cellules A549 par *P. aeruginosa*, la sécrétion d'IL-8 était significativement augmentée. En parallèle de cette augmentation, l'élastase stimulait l'activation des ERK (*Extracellular-signal-Regulated-Kinases*). Les ERK sont des enzymes appartenant à la voie des MAP-kinases (MAPK ou *Mitogen-Activated protein kinases*) qui permet notamment l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Ce facteur de transcription est particulièrement impliqué dans la régulation de l'immunité et de l'inflammation.

Une inhibition de l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 par les lactobacilles pourrait ainsi non seulement réduire les dégâts causés aux tissus mais également réduire l'inflammation causée par *P. aeruginosa*.

4.3.2 Effets des lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 sur la viabilité des cellules A549

Conformément à ce qui a déjà été décrit, l'inoculation des cellules A549 par *P. aeruginosa* PAO1 seul a entraîné une diminution significative de la viabilité cellulaire. L'inoculation des cellules par le mélange de lactobacilles a eu pour effet une augmentation de leur viabilité. La co-inoculation des cellules par le mélange de lactobacilles et par *P. aeruginosa* PAO1 (ratio 1 : 1) a permis de restaurer partiellement la viabilité des cellules A549 après 4 heures d'incubation. L'effet cytoprotecteur du mélange de lactobacilles ne s'étant pas exercé via une activité bactéricide sur *P. aeruginosa* PAO1 ou une acidification du milieu, d'autres mécanismes sont à envisager. Le premier pourrait être l'inhibition de l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1, *L. fermentum* K.C6.3.1E et *L. zae* Od.76 ayant inhibé ce facteur de virulence de *P. aeruginosa* PAO1 *in vitro*.

Une autre hypothèse est l'existence d'une inhibition de l'adhésion du pathogène aux cellules. Ainsi Wong et coll. ont étudié les effets de *L. rhamnosus* GG dans un modèle d'infection par *Streptococcus pneumoniae* de la lignée de cellules épithéliales humaines CCL23 (WONG et coll. 2013). Les auteurs ont comparé les effets des lactobacilles sur l'adhésion de 4 souches de *Streptococcus pneumoniae* (PMP843, PMP558, PMP812 et PMP6) aux cellules épithéliales. Les lactobacilles étaient inoculés 1 heure avant l'infection, en même temps que le pathogène ou bien 1 heure après l'infection. Deux doses de lactobacilles ont été testées. Lors des inoculations prophylactiques du lactobacille, les adhésions de 3 des 4 souches de *Streptococcus pneumoniae* étaient réduites. Lors des co-

4.3. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

inoculations, la dose élevée de lactobacilles permettait de réduire l'adhésion de toutes les souches de *Streptococcus pneumoniae*. En traitement curatif, l'utilisation de la dose élevée de *L. rhamnosus* GG a permis l'inhibition de 2 souches de *Streptococcus pneumoniae*. La faible dose de *L. rhamnosus* GG a également permis la réduction de l'adhésion de *Streptococcus pneumoniae* PMP558. En présence (administration 1 heure avant infection) ou en absence des lactobacilles, aucune différence de concentrations d'IL-6 et d'IL-8 n'a été constatée. Ces expérimentations ont été réalisées pour les souches *Streptococcus pneumoniae* PMP843 et PMP6. Ce travail a démontré la capacité de *L. rhamnosus* GG a protéger les cellules par une inhibition de l'adhésion du pathogène plutôt que par une activité anti-inflammatoire. Sans aller jusqu'à parler d'inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* PAO1, nos travaux mettent également en évidence l'existence de mécanismes non-inflammatoires permettant d'exercer un effet protecteur sur les cellules pulmonaires A549.

Différents travaux ont également permis de démontrer la capacité de certains lactobacilles à exercer une activité cytoprotectrice via une interaction avec le système immunitaire et notamment en influençant la sécrétion de cytokines. Rizzo et coll. ont ainsi démontré l'effet protecteur d'un prétraitement de cellules A549 par une souche de *L. plantarum* face à une infection par *Streptococcus pyogenes* (RIZZO et coll. 2013). Les cellules étaient exposées au lactobacille pendant 12 heures avant leur infection par le pathogène. Les cellules étaient ensuite cultivées 24 heures en présence de *Streptococcus pyogenes*, leur viabilité étant mesurée (essai MTT) à 8, 12 et 24 heures. Le prétraitement par le lactobacille a permis de restaurer la viabilité cellulaire après 12 heures d'infection. En revanche, à 8 heures, aucune différence de viabilité n'apparaissait entre les cellules infectées prétraitées ou non. Lors de ce travail, les auteurs ont également démontré une stimulation de la sécrétion des IL-17 et -23 par *Streptococcus pyogenes*, ainsi qu'une réduction de cette activité

pro-inflammatoire après un prétraitement des cellules par le lactobacille. En utilisant des anticorps anti-TLR2 ou anti-TLR4, l'effet anti-inflammatoire du lactobacille était absent. *L. plantarum* exerçait ainsi son activité via ces deux récepteurs. Cependant, ce mécanisme n'est probablement pas intervenu lors de nos travaux puisque nous n'avons détecté aucune activité anti-inflammatoire du mélange de lactobacilles et notamment aucun effet sur la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8.

4.3.3 Effets des lactobacilles et de *P. aeruginosa* PAO1 sur la sécrétion de cytokines par les cellules A549

Lors des expérimentations cellulaires, ni les lactobacilles, ni *P. aeruginosa* PAO1 seuls n'ont modifié significativement la production d'IL-10 ou de TNF- α . Toutefois, lors de la co-infection des cellules par les lactobacilles et *P. aeruginosa* PAO1, la concentration en IL-10 dans le surnageant était légèrement augmentée, bien que les concentrations soient restées très faibles. Les lactobacilles ont augmenté la sécrétion d'IL-6, tandis que *P. aeruginosa* PAO1 a stimulé la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8. Les lactobacilles n'ont démontré aucun effet sur l'activité pro-inflammatoire initiée par *P. aeruginosa* PAO1, pas plus qu'ils n'ont eu d'effet sur la sécrétion d'IL-8.

Malgré tout, différents travaux ont mis en évidence l'existence d'interactions possibles entre lactobacilles et système immunitaire, notamment via les TLR.

Armstrong et coll. ont ainsi étudié l'expression des TLR2 et 4 par des cellules alvéolaires de type II humaines obtenues par culture primaire (ARMSTRONG et coll. 2004). Ils ont également étudié les effets du lipopolysaccharide (LPS) et du acide lipotéichoïque (LTA), qui sont des médiateurs de l'inflammation présents respectivement chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, sur la sécrétion de l'IL-8. Ils ont d'une part démontré que ces deux

4.3. Effets des lactobacilles dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1

TLR sont bien exprimés par ces cellules, mais que le TLR2 n'était quasiment pas exprimé à la surface de la cellule. L'expression des mRNA des TLR2 et 4 était stimulée par le LPS. Toutefois, si cette stimulation se traduisait bien par une surexpression à la surface cellulaire du TLR4, l'expression à la surface du TLR2 n'était pas influencée par le LPS, suggérant l'existence d'un contrôle post-transcriptomique de l'expression du TLR2. La sécrétion d'IL-8 était stimulée à la fois par le LPS et par le LTA. L'effet du LTA était moins important que celui du LPS, ce que les auteurs expliquent par la faible expression à la surface cellulaire du TLR2. Ce travail met en évidence le rôle des cellules épithéliales dans la réponse immunitaire au niveau pulmonaire, grâce notamment à l'interaction entre TLR et composants des parois des bactéries à Gram positif ou négatif. Le LPS et le LTA stimulaient ainsi la sécrétion d'IL-8 par les cellules alvéolaires de type II.

La capacité de certains lactobacilles à réduire l'inflammation consécutive à une infection par un pathogène a déjà été mise en évidence. Dans un modèle cellulaire d'infection par la souche entéro-toxinogène *E. coli* 987, Shimazu et coll. ont constaté une diminution de la production d'IL-6 et d'IL-8 par des cellules épithéliales intestinales porcines (culture primaire) après un prétraitement par *L. jensenii* TL2937 (SHIMAZU et coll. 2012). Dans ce modèle, *L. jensenii* TL2937 inhibait l'activation des voies des MAPK et du NF- κ B, impliquées dans les réponses inflammatoires de la cellule. Parallèlement, *L. jensenii* TL2937 entraînait une réduction de la production de l'IL-6 et de l'IL-8.

Les effets des bactéries sur l'inflammation diffèrent donc selon les couples bactéries/cellules en jeu, suggérant ainsi l'existence de relations complexes entre ces entités. De plus, il est difficile de tirer des conclusions quant à ce qui pourrait se passer *in vivo* à partir de résultats obtenus dans des modèles cellulaires, notamment parce que les cellules épithéliales ne sont pas les seuls intervenants de la réponse immunitaire chez l'animal. Le résultat important

obtenu dans notre modèle cellulaire était ainsi l'effet cytoprotecteur exercé par les lactobacilles lors d'une infection de pneumocytes de type II par *P. aeruginosa* PAO1, possiblement via une inhibition de l'activité élastolytique du pathogène ou une réduction de sa capacité à adhérer aux cellules.

Lors de nos expérimentations cellulaires, nous n'avons pas mis en évidence de rôle important des cytokines IL-6, IL-8, IL-10 ou TNF- α dans l'effet cytoprotecteur des lactobacilles. La première explication possible est que, dans ce modèle, la cytotoxicité de *P. aeruginosa* PAO1 et l'effet cytoprotecteur des lactobacilles s'exercent sans activation de ces voies de signalisation. Une seconde hypothèse est que ces expérimentations ont été réalisées en présence uniquement de cellules épithéliales qui, bien qu'impliquées dans l'immunité, n'en sont pas les principaux effecteurs. Les cascades de signalisation, via notamment les cytokines, sont plus difficiles à mettre en évidence dans de tels modèles, d'où l'intérêt du modèle animal, plus complexe et impliquant tous les acteurs de la réponse immunitaire.

4.4 Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

Afin de valider notre stratégie de criblage *in vitro*, nous avons étudié les effets de l'instillation trachéale et prophylactique d'un mélange de 3 lactobacilles sur la charge bactérienne pathogène et sur l'inflammation au niveau respiratoire dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1.

4.4.1 Modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

Le potentiel infectieux de *P. aeruginosa* PAO1 repose sur sa capacité à coloniser des épithéliums, et notamment l'épithélium respiratoire, et également sur ses nombreux facteurs de virulence. Parmi ces derniers, le biofilm et l'élastase jouent un rôle important dans le caractère pathogène de la bactérie (section 1.4.3).

4.4. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

La capacité de *P. aeruginosa* à adhérer à des épithéliums repose notamment sur leur dégradation (WILSON et coll. 1996), or l'élastase produite par *P. aeruginosa* PAO1 entraîne une dégradation de l'épithélium respiratoire (AZGHANI et coll. 1990 ; BLACKWOOD et coll. 1983). L'élastase sécrétée par *P. aeruginosa* inhibe également les capacités de phagocytose des macrophages alvéolaires via la dégradation de 2 protéines du surfactant (SP-A et DP-D) (FAURE et coll. 2006 ; MARIENCHECK et coll. 2003). Ces deux collectines sont impliquées dans la phagocytose par les macrophages alvéolaires, dans le chimiotactisme pour les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles. Elles peuvent également moduler la sécrétion de cytokines par les cellules. Le biofilm formé par *P. aeruginosa* est un élément important dans la mise en place d'une infection, notamment au niveau respiratoire (COSTERTON et coll. 1999 ; RÖMLING et coll. 2012). Le biofilm permet à *P. aeruginosa* d'échapper au moins partiellement au système immunitaire de l'hôte.

Il a été démontré que *P. aeruginosa* stimulait la production d'IL-6 et de TNF- α par les macrophages alvéolaires et par des cellules épithéliales pulmonaires murines (RAOUST et coll. 2009). Cette production des cytokines IL-6 et TNF- α est liée à la reconnaissance du LPS par les TLR2 et 4 ou de la flagelline par le TLR5 des macrophages alvéolaires et des cellules épithéliales. De même, dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* TBCF10839, Wölbelling et coll. ont constaté que les concentrations en TNF- α et en IL-6 dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) étaient maximales 4 heures après l'instillation intratrachéale de *P. aeruginosa* (WÖLBELING et coll. 2011). Faure et coll. ont étudié l'importance de l'expression du TLR4 dans le contrôle d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez la souris (FAURE et coll. 2004). Les auteurs ont comparé les conséquences d'une infection pulmonaire par des doses moyennes de *P. aeruginosa* PA103 (6.10^4 ufc par souris) chez des souris exprimant (C3H/FeJ) ou n'exprimant pas (C3H/HeJ) le TLR4. La clairance

de *P. aeruginosa* PA103 était inférieure chez les souris C3H/HeJ 4 heures après l'infection, avec pour conséquence une mortalité également plus élevée à 4 jours chez ces souris. Dans les lavages broncho-alvéolaires, les quantités de leucocytes étaient significativement réduites chez les souris C3H/HeJ. De plus, lors de l'infection par de hautes doses de *P. aeruginosa* PA103 (5.10^5 ufc par souris), ces souris ne sécrétaient quasiment pas de TNF- α au niveau pulmonaire, contrairement aux souris C3H/FeJ. Le faible nombre de leucocytes et l'absence de sécrétion de TNF- α au niveau pulmonaire pourrait indiquer l'inexistence d'une réponse immunitaire adéquate permettant d'éliminer le pathogène en l'absence de TLR4 fonctionnel.

Ramphal et coll. se sont intéressés à l'interaction entre LPS et TLR2 et 4 chez des souris TLR2,4^{-/-} et TLR2,4^{+/+} d'une part et à l'interaction entre flagelline, une protéine importante du filament flagellaire, et TLR5 en utilisant la souche *P. aeruginosa* PAK Δ *fliC* (absence du gène *fliC* impliqué dans la synthèse de la flagelline) chez des souris TLR2,4^{+/+} d'autre part (RAMPHAL et coll. 2008). Ils ont d'abord constaté que les souris TLR2,4^{-/-} étaient incapables de contrôler l'infection à *P. aeruginosa* PAK Δ *fliC*. Ils ont également démontré que la sécrétion de TNF- α était principalement liée à une activation des TLR2 et 4 par le LPS et que la sécrétion d'IL-6 était induite par la somme des effets de l'activation des TLR2 et 4 et de la détection de la flagelline.

Ces différents travaux ont mis en évidence le fait qu'une partie non négligeable de l'effet pro-inflammatoire de *P. aeruginosa* PAO1 s'exerce via sa reconnaissance par les TLR, notamment via les TLR2, 4 et 5. Cette inflammation est nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire, mais une inflammation non contrôlée peut être délétère pour l'hôte, d'où l'intérêt de s'intéresser d'une part aux effets antibactériens des lactobacilles mais également à leurs effets sur l'inflammation.

4.4. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

4.4.2 Effet des lactobacilles sur la charge pulmonaire en *P. aeruginosa* PAO1

La prophylaxie reposant sur l'administration d'une seule dose du mélange de lactobacilles 18 heures avant l'instillation de *P. aeruginosa* PAO1 a permis de réduire la charge pulmonaire du pathogène chez les souris 4 heures après l'infection. Nous avons également observé une diminution de la charge pulmonaire en *P. aeruginosa* PAO1 dans le cas d'une prophylaxie reposant sur l'administration de deux doses du mélange de lactobacilles respectivement 42 et 18 heures avant l'instillation de *P. aeruginosa* PAO1, bien que cette différence ne soit pas significative. Cette diminution de la concentration de *P. aeruginosa* PAO1 pourrait s'expliquer par la production par les lactobacilles d'acides organiques. Comme démontré lors de nos expérimentations *in vitro*, *P. aeruginosa* PAO1 affiche une grande susceptibilité aux acides et particulièrement à l'acide acétique. Ainsi, à des concentrations supérieures à 50 mM, l'acide acétique inhibait la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 dès pH 6. Néanmoins, ces effets certes très importants *in vitro* sont probablement moins importants *in vivo* en raison de l'existence d'une régulation du pH physiologique, même s'il est possible que le pH soit plus acide localement.

L'hypothèse de la production de bactériocines par les lactobacilles peut être écartée dans la mesure où aucune activité bactériostatique ou bactéricide des 3 lactobacilles n'a été détectée hors conditions acides *in vitro*. Étant donnée l'absence d'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 lors de cocultures avec les lactobacilles, il est possible que cette diminution de la concentration en *P. aeruginosa* PAO1 dans les poumons ait été causée par un autre mécanisme.

Un des facteurs pouvant permettre d'expliquer la diminution de la charge pathogène pulmonaire serait une inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* aux épithéliums. Ainsi, certains probiotiques ont démontré des capacités à inhiber la colonisation de différents écosystèmes par des pathogènes en limitant

leur adhésion aux cellules épithéliales (FORESTIER et coll. 2001 ; MATSUMOTO et coll. 2008 ; OSSET et coll. 2001). Matsumoto et coll. ont ainsi étudié les effets de *Bifidobacterium longum* BB536 et de *Bifidobacterium breve* ATCC15700 dans un modèle murin de sepsis à *P. aeruginosa* D4 (MATSUMOTO et coll. 2008). Les auteurs ont notamment constaté que *Bifidobacterium longum* BB536 permettait la survie de 70 % des souris contre 0 % chez les souris non traitées. Cette survie améliorée s'accompagnait d'une réduction de la charge en *P. aeruginosa* D4 dans tout le jéjunum, l'ileum, le cécum et le côlon. Ils ont ensuite étudié les effets d'une pré-incubation de cellules CaCo-2 en présence de *Bifidobacterium longum* BB536 ou de *Bifidobacterium breve* ATCC15700 pendant 4 heures avant l'inoculation de *P. aeruginosa* D4. Après deux heures d'incubation, l'adhésion du pathogène était réduite en présence de *Bifidobacterium breve* ATCC15700 et encore plus en présence de *Bifidobacterium longum* BB536. Cependant, les surnageants des bifidobactéries inhibaient la croissance de *P. aeruginosa* D4, suggérant l'existence d'un mécanisme bactéricide plutôt qu'une inhibition spécifique de l'adhésion du pathogène aux épithéliums.

Une autre hypothèse qui pourrait permettre d'expliquer la diminution de la charge pulmonaire de *P. aeruginosa* PAO1 repose sur l'existence de phénomènes de co-agrégation. Ainsi, Ekmecki et coll. ont démontré la capacité de différentes souches de lactobacilles à co-agréger avec *E. coli* ATCC11229 *in vitro* (EKMEKCI et coll. 2009). Ces capacités de co-agrégation dépendaient principalement de la souche de lactobacille et très peu des conditions d'incubation (aérobie ou anaérobie). La formation de co-agrégats entre lactobacilles et pathogène permet notamment de créer un environnement biochimique hostile autour de ce dernier, tout en réduisant ses capacités à se déplacer et à adhérer aux épithéliums (YOUNES et coll. 2012). *In vitro*, les souches *L. fermentum* K.C6.3.1E et *L. zae* Od.76 ont ainsi démontré une forte capacité à flocculer dans du MRS qui pourrait se traduire *in vivo* par une capacité à

4.4. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

former des co-agrégats avec *P. aeruginosa* PAO1, l'empêchant de persister au niveau pulmonaire et d'exercer une partie de son activité pathogène ou bien encore de former du biofilm.

Lors de nos travaux, *L. fermentum* K.C6.3.1E et *L. zeae* Od.76 faisaient partie des 5 souches inhibant significativement l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 *in vitro*. L'inhibition de cette activité *in vivo* par les lactobacilles pourrait d'une part réduire les capacités d'adhésion de *P. aeruginosa* PAO1 mais également restaurer l'activité immunitaire du surfactant pulmonaire et favoriser l'élimination du pathogène par l'hôte. L'inhibition de la formation de biofilm, notamment par *L. paracasei* ES.D.88, pourrait quant à elle limiter la capacité de *P. aeruginosa* PAO1 à persister au niveau de l'épithélium respiratoire. Tant la production d'élastase que la formation de biofilm sont sous contrôle du quorum-sensing de *P. aeruginosa* (LE BERRE et coll. 2006 ; SINGH et coll. 2000). Valdéz et coll. ont ainsi démontré que *L. plantarum* ATCC 10241 inhibait le quorum-sensing de *P. aeruginosa* PA100 en réduisant la production des acyl homosérine lactones (VALDÉZ et coll. 2005). Il est toutefois difficile de conclure quant aux résultats obtenus *in vivo* en se basant sur ce qui a été observé *in vitro*.

4.4.3 Effets des lactobacilles sur la production pulmonaire de cytokines

Nous avons observé une activité anti-inflammatoire des lactobacilles lors de nos expérimentations animales. Dans notre étude, lors de la prophylaxie comportant une seule administration de lactobacilles 18 heures avant l'instillation du pathogène, les concentrations des cytokines IL-6 et TNF- α dans les LBA des souris ayant reçu les lactobacilles et *P. aeruginosa* PAO1 étaient moins importantes que dans les LBA des souris ayant reçu le pathogène seul ($p < 0,01$), indiquant une réduction de l'inflammation causée par *P. aerugi-*

nosa PAO1. Lors des expérimentations comportant deux instillations de lactobacilles, seules les concentrations en TNF- α dans les LBA étaient réduites, les concentrations en IL-6 n'étant pas différentes entre le groupe ayant reçu uniquement le pathogène et le groupe ayant reçu le mélange de lactobacilles avant l'instillation de *P. aeruginosa* PAO1. Cette réduction de l'inflammation pourrait être causée par la réduction de la charge pulmonaire en *P. aeruginosa* PAO1 mais également par une interaction entre les lactobacilles et le système immunitaire de la souris.

Tanaka et coll. ont étudié les effets de l'administration de *L. pentosus* b240 pendant 21 jours chez des souris CBA/J avant leur infection par *Streptococcus pneumoniae* (TANAKA et coll. 2011). Les souris ont quotidiennement reçu les lactobacilles inactivés thermiquement ou un placebo par voie orale (gavage). Elles étaient ensuite observées pendant 14 jours (survie) ou euthanasiées après 2 jours (charges bactériennes et dosages des cytokines). Aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant la survie des souris 14 jours après l'infection. Toutefois, 2 jours après l'infection, les concentrations pulmonaires de *Streptococcus pneumoniae* étaient significativement réduites chez les souris appartenant au groupe ayant reçu le lactobacille. Dans le même temps, les concentrations pulmonaires des cytokines TNF- α et IL-6 étaient significativement réduites chez les souris ayant reçu le lactobacille. Les concentrations de ces cytokines n'étaient pas modifiées dans le groupe ayant seulement reçu les lactobacilles par rapport au groupe ayant seulement reçu le placebo. Chez les souris infectées ayant reçu le lactobacille, l'expression des TLR2 et 4 était augmentée par rapport aux souris n'ayant pas reçu le lactobacille. Chez les souris infectées, *L. pentosus* b240 a induit une inhibition de l'activation de JNK, qui appartient aux MAP-kinases. Ces résultats démontrent ainsi l'existence d'une interaction entre *L. pentosus* b240 et le système immunitaire murin via les TLR2,4 et la voie des MAP-kinases permettant de contrôler l'infection par

4.4. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

Streptococcus pneumoniae.

Racedo et coll. ont étudié les effets de l'administration de *L. casei* CRL431 dans un modèle murin de pneumonie à *Streptococcus pneumoniae* (RACEDO et coll. 2006). Des souris Swiss ont reçu 10^9 ufc du lactobacille par voie orale (eau de boisson) chaque jour pendant 2 jours puis 10^6 ufc de *Streptococcus pneumoniae* par voie intranasale (groupe Lc2d). Les souris ont ensuite été euthanasiées aux jours 1,2,3,5,7,10 et 15 après l'infection afin d'étudier les paramètres microbiologiques, histopathologiques et immunitaires. La clairance de *Streptococcus pneumoniae* était ainsi augmentée dès le premier jour après l'infection chez les souris ayant reçu le probiotique. Toujours chez ces souris, les taux de polynucléaires neutrophiles (PNN) et de leucocytes dans le sang étaient plus élevés jusqu'à 5 jours après l'infection. Parallèlement, les concentrations en TNF- α dans les poumons était supérieures chez les souris Lc2d jusqu'à la douzième heure après l'infection. Dès la vingt-quatrième heure post-infection, la tendance s'inversait, avec une concentration en TNF- α dans les LBA supérieure pour le groupe contrôle jusqu'à la quarante-huitième heure post-infection.

Il est intéressant de noter que selon le lactobacille employé, la méthode et les intervalles d'administration, les effets sur l'inflammation chez les souris sont différents. Racedo et coll. ont constaté un effet plutôt pro-inflammatoire, au moins durant les quelques heures suivant l'infection, tandis que Tanaka et coll. ont démontré un effet anti-inflammatoire des lactobacilles. Lors des deux études, l'administration orale de lactobacilles a toutefois permis d'améliorer la clairance des pathogènes au niveau respiratoire. Selon les résultats décrits dans ces travaux, les lactobacilles seraient ainsi capables d'interagir avec le système immunitaire afin de contrôler l'activation des TLR ainsi que la signalisation cellulaire telle que la voie des MAP-kinases, permettant ainsi un meilleur contrôle de l'infection par les animaux. Il est possible d'envisager l'existence

de ces mécanismes lors de nos travaux en raison de la modulation des effets pro-inflammatoires de *P. aeruginosa* PAO1 (IL-6 et TNF- α) par le mélange des lactobacilles *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zeae* Od.76. Racedo et coll. ont également décrit une augmentation des niveaux d'IgA et d'IgG anti-pneumococciques dans les LBA des souris au quinzième jour suivant l'infection. Toutefois, le rôle des immunoglobulines est incertain dans notre modèle dans la mesure où l'activation de leur production nécessite des délais supérieurs à la durée de nos expérimentations.

Un des pivots de l'interaction entre les lactobacilles et le système immunitaire pourrait être le macrophage. Miake et coll. ont étudié les effets d'une injection prophylactique intrapéritonéale de *L. casei* YIT 9018 inactivé thermiquement chez des souris C57BL/6 ayant reçu une injection intrapéritonéale de *P. aeruginosa* KC-2 (MIAKE et coll. 1985). Ils ont constaté une diminution des quantités de *P. aeruginosa* présentes dans la rate et dans la cavité péritonéale des souris 5 jours après l'administration du lactobacille et 6 ou 12 heures après l'injection de *P. aeruginosa*. En parallèle, les quantités de PNN étaient augmentées dans la cavité péritonéale dès le premier jour après l'injection du lactobacille. Les souris contrôles (injection de PBS) et les souris ayant reçu le lactobacille ont été irradiées avant l'infection : ce traitement devait permettre de détruire certaines cellules telles que les PNN, tout en préservant l'activité des macrophages. Après irradiation, les quantités de *P. aeruginosa* chez les souris ayant reçu le lactobacille étaient inférieures à celles observées chez les souris ayant reçu du PBS. Après traitement par un agent bloquant spécifiquement l'activité des macrophages, l'effet protecteur du lactobacille a disparu, suggérant une interaction entre lactobacille et macrophage.

Ainsi, Kim et coll. ont étudié les effets de l'acide lipotéichoïque de *L. plantarum* K8 (pLTA), un composant de la paroi des bactéries à Gram positif, sur l'activité inflammatoire du LPS de *E. coli* O55 : B5 sur des macrophages dé-

4.4. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

rivés de la moëlle osseuse de souris BALB/c sauvages ou mutées sur le TLR2 (KIM et coll. 2008). Le TLR2 n'était pas nécessaire à l'induction de la sécrétion de TNF- α par les macrophages. Ensuite, le prétraitement des cellules pendant 18 heures par le pLTA a permis de réduire leur sécrétion de TNF- α après stimulation par du LPS, et ce uniquement chez les macrophages exprimant le TLR2. De plus, l'effet anti-inflammatoire du pLTA dépendait de la dose de pLTA utilisée. L'acide lipotéichoïque pourrait ainsi jouer un rôle dans la réduction des effets pro-inflammatoires induits par la détection du LPS par les TLR, notamment en interagissant avec le TLR2. Kim et coll. ont également démontré au cours de ce travail que le prétraitement de cellules appartenant à la lignée de monocytes THP-1 permettait une inhibition de la phosphorylation de ERK, p38 et JNK (3 acteurs de la voie des MAP-kinases) ainsi qu'une inhibition de NF- κ B.

Ces travaux mettent en évidence la capacité des lactobacilles à communiquer avec le système immunitaire. Cette communication, notamment dans le cas d'une infection, semble jouer un rôle dans la réduction des effets délétères de celle-ci, notamment en permettant d'inhiber partiellement les voies de signalisation associées à l'inflammation. De plus, et contrairement aux résultats obtenus lors des expérimentations sur les cellules A549, les lactobacilles n'ont pas stimulé la sécrétion d'IL-6 chez la souris, renforçant l'hypothèse de leur interaction avec d'autres cellules que les cellules épithéliales.

Il est possible que l'effet anti-inflammatoire de nos 3 lactobacilles chez la souris infectée par *P. aeruginosa* PAO1 soit en fait lié à la réduction de la charge pathogène pulmonaire. Cependant, lors de la prophylaxie comportant 2 administrations de lactobacilles, aucune inhibition de la sécrétion d'IL-6 n'a été observée, et la réduction de la sécrétion de TNF- α était moins importante que lors de la prophylaxie avec une seule administration de lactobacilles. Lors des deux séries expérimentales, les variations de concentrations en *P. aerugi-*

nosa PAO1 entre les groupes PAO1 et LbPAO1 ont été similaires. L'une des différences entre les deux séries d'expérimentations était la concentration en lactobacilles : leur concentration était en effet moins élevée dans le groupe Lb-PAO1 après deux instillations prophylactiques. Cette corrélation entre concentration inférieure en lactobacilles et diminution de l'effet anti-inflammatoire semble indiquer l'existence d'un effet spécifique des lactobacilles dans notre modèle, au-delà d'une réduction de la charge bactérienne pulmonaire de *P. aeruginosa* PAO1. Il est également possible que l'effet anti-inflammatoire soit moins marqué lors de l'exposition prolongée des souris aux lactobacilles.

4.4.4 Clairance des lactobacilles dans les poumons

Vingt-deux heures après l'administration des lactobacilles, leur nombre était réduit de 2,5 logarithmes par rapport à la quantité de bactéries instillées. Cette diminution a été observée aussi bien lors de l'essai avec une administration de lactobacilles que lors de l'essai avec deux administrations de lactobacilles. Plusieurs causes peuvent expliquer cette diminution : la clairance par l'organisme, la difficulté d'une partie des bactéries à adhérer ou bien encore une compétition entre les différents lactobacilles instillés. De plus, la concentration pulmonaire des lactobacilles était la même 4 heures après l'infection, tant lors des expérimentations comportant une seule administration du mélange que dans le cas de deux administrations du mélange. En revanche, l'instillation de *P. aeruginosa* PAO1 n'a eu aucune influence sur les concentrations pulmonaires des lactobacilles. Le fait que les concentrations pulmonaires en lactobacilles aient été les mêmes après une ou deux instillations semble indiquer leur difficulté à persister au-delà de 24 heures. À notre connaissance, aucune étude portant sur l'utilisation de lactobacilles dans des modèles murins d'infections respiratoires n'a tenu compte de la persistance de ces bactéries après instillation dans les poumons. Ce paramètre est important car au-delà

4.4. Effets des lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1

d'un éventuel effet stimulant la réponse immunitaire de l'hôte, les lactobacilles peuvent entrer en compétition spatiale avec un pathogène. La persistance des lactobacilles dans les poumons permet d'envisager que les bactéries exercent les effets démontrés *in vitro*, à savoir réduction de la formation de biofilm ou diminution de l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1, directement dans les poumons.

Les résultats obtenus grâce aux modèles cellulaire et animal ont permis de démontrer les effets protecteurs du mélange de *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zeae* Od.76 vis-à-vis des cellules A549 et des souris C57BL/6. Ces effets semblent en partie exercés via une activité antibactérienne des lactobacilles mais également grâce à une interaction entre lactobacilles et système immunitaire. Ces résultats sont cependant essentiellement descriptifs et une analyse des mécanismes intervenant dans ces effets sera nécessaire.

CHAPITRE 5

Conclusions et perspectives

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste responsable essentiellement d'infections pulmonaires chez les individus vulnérables, particulièrement dans les services de réanimation ou chez les patients atteints de la mucoviscidose. *P. aeruginosa* possède de nombreux mécanismes de virulence et d'antibiorésistances, ce qui rend ces infections compliquées à combattre. En conséquence, les pneumonies à *P. aeruginosa* induisent des augmentations significatives des taux de mortalité et de morbidité chez les patients affectés. Plus généralement, la multiplication des résistances aux antibiotiques représente un enjeu sanitaire majeur, comme en témoigne l'apparition de germes résistants à toutes les molécules actuellement sur le marché. Il existe cependant des alternatives aux traitements reposant exclusivement sur l'administration d'antibiotiques, l'une d'elles étant l'utilisation de probiotiques. L'utilisation de probiotiques revient à confronter le pathogène à un adversaire qui va réduire voire éliminer son potentiel de nuisance par différents mécanismes connus ou à découvrir.

L'objectif de ce travail était de développer une flore de barrière oropharyngée offrant une protection contre la colonisation des poumons par *P. aeruginosa*. La première étape de ce travail devait nous permettre de constituer une collection de lactobacilles isolés des cavités orales de volontaires sains. Cent

quatre-vingt-huit isolats ont été obtenus par écouvillonnage des cavités orales de vingt-trois volontaires sains. L'intérêt de ces isolats a ensuite été évalué en fonction de leur activité contre la production de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa*, deux facteurs de virulence de cette bactérie. Ces essais ont dû être réalisés en tenant compte de la sensibilité de *P. aeruginosa* aux pH acides ainsi qu'à l'acide acétique, naturellement produit par un certain nombre de lactobacilles, et ceci afin d'éviter de ne sélectionner des isolats actifs qu'en raison de leur production d'acides. Soixante-sept des isolats oraux ainsi que 20 lactobacilles isolés de laits crus ont été criblés contre la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa*. Trois souches actives contre la production de biofilm et 5 souches inhibant l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* ont alors été sélectionnées. Parmi ces 8 souches, 5 appartenaient à l'espèce *Lactobacillus fermentum*, 1 à l'espèce *L. paracasei* et 1 à l'espèce *L. zae*.

Les souches sélectionnées ont ensuite été identifiées grâce à une approche polyphasique combinant spectrométrie de masse de type MALDI-ToF, galeries API 50 CHL et séquençage des gènes *ARNr 16S*, *rpoA* et *pheS*. La capacité de ces lactobacilles à pousser dans une salive artificielle ainsi que leurs résistances aux antibiotiques ont également été étudiées. Ces souches ont ainsi démontré de bonnes capacités à survivre et à se multiplier dans une salive artificielle et aucune autre résistance que celle à la vancomycine n'a été détectée.

Nous avons ensuite mesuré les effets d'un mélange de lactobacilles sur la prolifération de cellules épithéliales pulmonaires A549 ainsi que sur la sécrétion des cytokines IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- α par ces cellules. Le mélange incluait 2 des souches les plus actives contre l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 (*L. fermentum* K.C6.3.1E et *L. zae* Od.76) ainsi que l'une des souches les plus actives contre la formation de biofilm par *P. aeruginosa* PAO1 (*L. paracasei* ES.D.88). Ces souches étaient en outre celles ayant le plus acidifié le

milieu lors des essais de croissance en salive artificielle. Ce mélange a permis de réduire significativement la cytotoxicité exercée par *P. aeruginosa* PAO1 sur des cellules épithéliales pulmonaires A549, sans que nous puissions détecter de modification significative de l'activité pro-inflammatoire de *P. aeruginosa* PAO1 par les lactobacilles.

Les effets prophylactiques de ce mélange de lactobacilles ont finalement été mesurés dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1. Lors de l'administration du mélange de lactobacilles 18 heures avant l'infection de souris C57BL/6 par *P. aeruginosa*, la colonisation pulmonaire par le pathogène était réduite de façon significative et associée à une diminution de la sécrétion des cytokines IL-6 et TNF- α . Lors d'une seconde série d'expérimentations animales comportant cette fois deux administrations du mélange de lactobacilles 42 et 18 heures avant l'infection, la colonisation des poumons par *P. aeruginosa* était de nouveau réduite mais de manière non significative. L'activité anti-inflammatoire des lactobacilles ne concernait cette fois qu'une réduction de la sécrétion de TNF- α , sans effet sur la sécrétion d'IL-6.

Cette stratégie nous a permis de sélectionner des souches de lactobacilles adaptées à l'écosystème ciblé, à savoir la partie supérieure de l'arbre respiratoire. Ces résultats nous ont également permis de valider notre stratégie de criblage. Des expérimentations supplémentaires seront cependant nécessaires afin, d'une part, de confirmer l'intérêt spécifique de ces souches et, d'autre part, de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de leur activité. L'une des premières expérimentations à mettre en place serait d'utiliser des lactobacilles appartenant aux espèces des souches testées et ne présentant pas d'activité contre la formation de biofilm ou l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 comme contrôle négatif lors des expérimentations cellulaires ou animales. Ceci devrait permettre de déterminer la spécificité de l'activité des lactobacilles sélectionnés. Il serait également intéressant d'évaluer les effets individuels des 3 lactoba-

cilles testés, avec la possibilité d'ajuster les proportions de chaque espèce dans le mélange administré. De plus, les résultats obtenus lors des expérimentations animales sont principalement descriptifs, et une étude des mécanismes par lesquels les lactobacilles agissent chez la souris est nécessaire. Il serait notamment intéressant d'étudier les effets de ces lactobacilles sur l'activation des TLR. Il serait également intéressant de mesurer les concentrations pulmonaires de KC (un homologue de IL-8 chez les rongeurs), afin d'établir un point de comparaison supplémentaire avec le modèle cellulaire, et en raison de son implication dans le recrutement des leucocytes.

Ces résultats sont encourageants quant à la possibilité d'utiliser le potentiel probiotique des lactobacilles dans la recherche d'alternatives aux traitements des infections respiratoires par des antibiothérapies seules.

Bibliographie

- Aas, J. A., B. J. Paster, L. N. Stokes, I. Olsen, and F. E. Dewhirst (2005). “Defining the normal bacterial flora of the oral cavity.” *Journal of clinical microbiology*, 43 (11), pp. 5721–32.
- Ader, F., R. Le Berre, K. Faure, P. Gosset, O. Epaulard, B. Toussaint, B. Polack, E. Nowak, N. B. Viget, E. Kipnis, and B. P. Guery (2005). “Alveolar response to *Pseudomonas aeruginosa*: role of the type III secretion system.” *Infection and immunity*, 73 (7), pp. 4263–71.
- Ahrné, S., S. Nobaek, B. Jeppsson, I. Adlerberth, A. Wold, and G. Molin (1998). “The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa.” *Journal of applied microbiology*, 85 (1), pp. 88–94.
- Alakomi, H.-L. L., E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, and I. M. Helander (2000). “Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane.” *Applied and environmental microbiology*, 66 (5), pp. 2001–5.
- Alexandre, Y., G. Le Blay, S. Boisramé-Gastrin, F. Le Gall, G. Héry-Arnaud, S. Gouriou, S. Vallet, and R. Le Berre (2013). “Probiotics: a new way to fight bacterial pulmonary infections?” *Médecine et maladies infectieuses*, 44 (1), pp. 9–17.
- Alfaleh, K., J. Anabrees, D. Bassler, and T. Al-Kharfi (2011). “Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants.” *The Cochrane database of systematic reviews*, 16 (3), p. CD005496.

Bibliographie

- Araya, M., L. Morelli, G. Reid, M. E. Sanders, C. Stanton, M. Pineiro, and P. Ben Embarek (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Tech. rep. London Ontario, Canada: Joint FAO/WHO Working Group, pp. 1–11.
- Armstrong, L., A. R. L. Medford, K. M. Uppington, J. Robertson, I. R. Witherden, T. D. Tetley, and A. B. Millar (2004). “Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells.” *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 31 (2), pp. 241–5.
- Asahara, T., K. Shimizu, K. Nomoto, T. Hamabata, A. Ozawa, and Y. Takeda (2004). “Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7.” *Infection and immunity*, 72 (4), pp. 2240–7.
- Attridge, R. T. and C. R. Frei (2011). “Health care-associated pneumonia: an evidence-based review.” *The American journal of medicine*, 124 (8), pp. 689–97.
- Azghani, A. O., J. W. Baker, S. Shetty, E. J. Miller, and G. J. Bhat (2002). “*Pseudomonas aeruginosa* elastase stimulates ERK signaling pathway and enhances IL-8 production by alveolar epithelial cells in culture.” *Inflammation research*, 51 (10), pp. 506–10.
- Azghani, A. O., T. Bedinghaus, and R. Klein (2000). “Detection of elastase from *Pseudomonas aeruginosa* in sputum and its potential role in epithelial cell permeability.” *Lung*, 178 (3), pp. 181–9.
- Azghani, A. O., J. C. Connelly, B. T. Peterson, L. D. Gray, M. L. Collins, and A. R. Johnson (1990). “Effects of *Pseudomonas aeruginosa* elastase on alveolar epithelial permeability in guinea pigs.” *Infection and immunity*, 58 (2), pp. 433–8.
- Baron, M. (2009). “A patented strain of *Bacillus coagulans* increased immune response to viral challenge.” *Postgraduate medicine*, 121 (2), pp. 114–8.

- Barraud, D., C. Blard, F. Hein, O. Marçon, A. Cravoisy, L. Nace, F. Alla, P.-E. Bollaert, and S. Gibot (2010). “Probiotics in the critically ill patient: a double blind, randomized, placebo-controlled trial.” *Intensive care medicine*, 36 (9), pp. 1540–7.
- Beck, J. M., V. B. Young, and G. B. Huffnagle (2012). “The microbiome of the lung.” *Translational research*, 160 (4), pp. 258–66.
- Berridge, M. V., P. M. Herst, and A. S. Tan (2005). “Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.” *Biotechnology annual review*, 11 (05), pp. 127–52.
- Bik, E. M., C. D. Long, G. C. Armitage, P. Loomer, J. Emerson, E. F. Mongodin, K. E. Nelson, S. R. Gill, C. M. Fraser-Liggett, and D. A. Relman (2010). “Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals.” *The ISME journal*, 4 (8), pp. 962–74.
- Bjarnsholt, T. (2013). “The role of bacterial biofilms in chronic infections.” *APMIS. Supplementum*, (136), pp. 1–51.
- Blackwood, L. L., R. M. Stone, B. H. Iglewski, and J. E. Pennington (1983). “Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection.” *Infection and immunity*, 39 (1), pp. 198–201.
- Bories, G., P. Brantom, J. B. de Barberà, A. Chesson, P. Sandro, B. Debski, N. Dierick, A. Franklin, J. Gropp, I. Halle, A. Mantovani, M. Mézes, C. Nebbia, W. Rambeck, G. Rychen, and A. Von (2008). “Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance”. *The EFSA Journal*, 732, pp. 1–15.
- Boucher, H. W., G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, and J. Bartlett (2009). “Bad bugs, no drugs:

Bibliographie

- no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America.” *Clinical infectious diseases*, 48 (1), pp. 1–12.
- Bousbia, S., L. Papazian, P. Saux, J. M. Forel, J.-P. Auffray, C. Martin, D. Raoult, and B. La Scola (2012). “Repertoire of intensive care unit pneumonia microbiota.” *PloS One*, 7 (2), e32486.
- Bragonzi, A. (2010). “Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens.” *International journal of medical microbiology*, 300 (8), pp. 584–93.
- Branda, S. S., S. Vik, L. Friedman, and R. Kolter (2005). “Biofilms: the matrix revisited.” *Trends in microbiology*, 13 (1), pp. 20–6.
- Breidenstein, E. B. M., C. de la Fuente-Núñez, and R. E. W. Hancock (2011). “*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance.” *Trends in microbiology*, 19 (8), pp. 419–26.
- Brennan, N. M., A. C. Ward, T. P. Beresford, P. F. Fox, M. Goodfellow, and T. M. Cogan (2002). “Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese”. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2), pp. 820–30.
- Bruzzese, E., V. Raia, M. I. Spagnuolo, M. Volpicelli, G. De Marco, L. Maiuri, and A. Guarino (2007). “Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study.” *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 26 (3), pp. 322–8.
- Caballero, A. R., J. M. Moreau, L. S. Engel, M. E. Marquart, J. M. Hill, and R. J. O’Callaghan (2001). “*Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas proteases*.” *Analytical biochemistry*, 290 (2), pp. 330–7.
- Cannon, J. P., T. A. Lee, J. T. Bolanos, and L. H. Danziger (2005). “Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases.” *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official pub-*

- lication of the European Society of Clinical Microbiology*, 24 (1), pp. 31–40.
- Cardenas, P. A., P. J. Cooper, M. J. Cox, M. Chico, C. Arias, M. F. Moffatt, and W. O. Cookson (2012). “Upper airways microbiota in antibiotic-naïve wheezing and healthy infants from the tropics of rural Ecuador.” *PloS One*, 7 (10), e46803.
- Caufield, P. W., Y. Li, A. Dasanayake, and D. Saxena (2007). “Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries.” *Caries research*, 41 (1), pp. 2–8.
- Charlson, E. S., K. Bittinger, A. R. Haas, A. S. Fitzgerald, I. Frank, A. Yadav, F. D. Bushman, and R. G. Collman (2011). “Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract.” *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184 (8), pp. 957–63.
- Chastre, J. and J.-Y. Fagon (2002). “Ventilator-associated pneumonia.” *American journal of respiratory and critical care medicine*, 165 (7), pp. 867–903.
- Clatworthy, A. E., E. Pierson, and D. T. Hung (2007). “Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy.” *Nature chemical biology*, 3 (9), pp. 541–8.
- Coeuret, V., M. Gueguen, and J. P. Vernoux (2004). “Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products.” *International journal of food microbiology*, 97 (2), pp. 147–56.
- Collado, M. C., J. Meriluoto, and S. Salminen (2007). “Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus.” *Letters in applied microbiology*, 45 (4), pp. 454–60.
- COLLÈGE DES UNIVERSITAIRES DE MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES (2008a). « Infections nosocomiales - Hygiène hospitalière ». *E. Pilly*. 21ème. Vivactis Plus Ed, p. 625–7.

Bibliographie

- (2008b). « Infections selon le site ». *E. Pilly*. 21ème. Vivactis Plus Ed, p. 216–35.
- Colloca, M., M. Ahumada, M. López, and M. Nader-Macías (2008). “Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects”. *Oral diseases*, 6 (4), pp. 227–33.
- COMITÉ TECHNIQUE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES ET DES INFECTIONS LIÉES AUX SOINS (2007). *Définition des infections associées aux soins*. Rapp. tech., p. 1–11.
- Costello, E. K., C. L. Lauber, M. Hamady, N. Fierer, J. I. Gordon, and R. Knight (2009). “Bacterial community variation in human body habitats across space and time.” *Science*, 326 (5960), pp. 1694–7.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg (1999). “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.” *Science*, 284 (5418), pp. 1318–22.
- Cotter, P. D. P., C. Hill, and R. P. R. Ross (2005). “Bacteriocins: developing innate immunity for food”. *Nature reviews. Microbiology*, 3 (10), pp. 777–88.
- Cox, M. J., M. Allgaier, B. Taylor, M. S. Baek, Y. J. Huang, R. A. Daly, U. Karaoz, G. L. Andersen, R. Brown, K. E. Fujimura, B. Wu, D. Tran, J. Koff, M. E. Kleinhenz, D. Nielson, E. L. Brodie, and S. V. Lynch (2010). “Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients.” *PloS One*, 5 (6), e11044.
- Crouch Brewer, S., R. G. Wunderink, C. B. Jones, and K. V. Leeper (1996). “Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*.” *Chest*, 109 (4), pp. 1019–29.
- Dal Bello, F. and C. Hertel (2006). “Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli.” *Systematic and applied microbiology*, 29 (1), pp. 69–76.

- Danielsen, M. and A. Wind (2003). “Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents.” *International journal of food microbiology*, 82 (1), pp. 1–11.
- Davey, M. E. and G. A. O’toole (2000). “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.” *Microbiology and molecular biology reviews*, 64 (4), pp. 847–67.
- Davies, D. (2003). “Understanding biofilm resistance to antibacterial agents.” *Nature reviews. Drug discovery*, 2 (2), pp. 114–22.
- Delavenne, E., J. Mounier, F. Déniel, G. Barbier, and G. Le Blay (2012). “Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period.” *International journal of food microbiology*, 155 (3), pp. 185–90.
- Delavenne, E., R. Ismail, A. Pawtowski, J. Mounier, G. Barbier, and G. Le Blay (2013). “Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures”. *Food Control*, 30 (1), pp. 206–13.
- Delden, C. van and B. H. Iglewski (1998). “Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections.” *Emerging infectious diseases*, 4 (4), pp. 551–60.
- Derrien, M., M. W. van Passel, J. H. van de Bovenkamp, R. G. Schipper, W. M. de Vos, and J. Dekker (2010). “Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract.” *Gut microbes*, 1 (4), pp. 254–68.
- Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai, and D. A. Relman (2007). “An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease.” *Nature*, 449 (7164), pp. 811–8.
- Dewhirst, F. E., T. Chen, J. Izard, B. J. Paster, A. C. R. Tanner, W.-H. Yu, A. Lakshmanan, and W. G. Wade (2010). “The human oral microbiome.” *Journal of bacteriology*, 192 (19), pp. 5002–17.

Bibliographie

- Dheilly, A., E. Soum-Soutéra, G. L. Klein, A. Bazire, C. Compère, D. Haras, and A. Dufour (2010). “Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6.” *Applied and environmental microbiology*, 76 (11), pp. 3452–61.
- Diaz, P. I., A. K. Dupuy, L. Abusleme, B. Reese, C. Oberfell, L. Choquette, A. Dongari-Bagtzoglou, D. E. Peterson, E. Terzi, and L. D. Strausbaugh (2012). “Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities.” *Molecular oral microbiology*, 27 (3), pp. 182–201.
- Döring, G., S. P. Conway, H. G. Heijerman, M. E. Hodson, N. Høiby, A. Smyth, and D. J. Touw (2000). “Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus.” *The European respiratory journal*, 16 (4), pp. 749–67.
- Dušková, M., O. Šedo, K. Kšicová, Z. Zdráhal, and R. Karpíšková (2012). “Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS.” *International journal of food microbiology*, 159 (2), pp. 107–14.
- Ekmekci, H., B. Aslim, and S. Ozturk (2009). “Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*.” *Microbiology and immunology*, 53 (2), pp. 59–65.
- European Centre for Disease Prevention and Control and Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012 (2012). *Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Tech. rep. Stockholm, pp. 33–45.
- Evrard, B., S. Coudeyras, A. Dosgilbert, N. Charbonnel, J. Alamé, A. Tridon, and C. Forestier (2011). “Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35.” *PloS One*, 6 (4), e18735.

- Falagas, M. E., G. I. Betsi, and S. Athanasiou (2007). "Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis." *Clinical microbiology and infection*, 13 (7), pp. 657–64.
- Farrell, P. M. (2008). "The prevalence of cystic fibrosis in the European Union." *Journal of cystic fibrosis*, 7 (5), pp. 450–3.
- Faure, K., R. Le Berre, and B. Guery (2006). "*Pseudomonas aeruginosa* and surfactant-associated proteins A and D." *Médecine et maladies infectieuses*, 36 (2), pp. 63–71.
- Faure, K., T. Sawa, T. Ajayi, J. Fujimoto, K. Moriyama, N. Shime, and J. P. Wiener-Kronish (2004). "TLR4 signaling is essential for survival in acute lung injury induced by virulent *Pseudomonas aeruginosa* secreting type III secretory toxins." *Respiratory research*, 5, p. 1.
- Finley, R. L., P. Collignon, D. G. J. Larsson, S. A. McEwen, X.-Z. Li, W. H. Gaze, R. Reid-Smith, M. Timinouni, D. W. Graham, and E. Topp (2013). "The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment." *Clinical infectious diseases*, 57 (5), pp. 704–10.
- Fleming, H. P., J. L. Etchells, and R. N. Costilow (1975). "Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines." *Applied microbiology*, 30 (6), pp. 1040–2.
- Forbes, B., A. Shah, G. P. Martin, and A. B. Lansley (2003). "The human bronchial epithelial cell line 16HBE14o- as a model system of the airways for studying drug transport". *International journal of pharmaceutics*, 257 (1-2), pp. 161–167.
- Forestier, C., C. De Champs, C. Vatoux, and B. Joly (2001). "Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties." *Research in microbiology*, 152 (2), pp. 167–73.

Bibliographie

- Forestier, C., D. Guelon, V. Cluytens, T. Gillart, J. Sirot, and C. De Champs (2008). “Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients.” *Critical care*, 12 (3), R69.
- Forsythe, P. (2011). “Probiotics and lung diseases.” *Chest*, 139 (4), pp. 901–8.
- Frimmersdorf, E., S. Horatzek, A. Pelnikevich, L. Wiehlmann, and D. Schomburg (2010). “How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach.” *Environmental microbiology*, 12 (6), pp. 1734–47.
- Fujitani, S., H.-Y. Sun, V. L. Yu, and J. A. Weingarten (2011). “Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source.” *Chest*, 139 (4), pp. 909–19.
- Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J. M. Clarke, D. L. Topping, T. Suzuki, T. D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori, and H. Ohno (2011). “Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate.” *Nature*, 469 (7331), pp. 543–7.
- Gaynes, R. and J. R. Edwards (2005). “Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli.” *Clinical infectious diseases*, 41 (6), pp. 848–54.
- Ghafoor, A., I. D. Hay, and B. H. A. Rehm (2011). “Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture.” *Applied and environmental microbiology*, 77 (15), pp. 5238–46.
- Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, and W. P. Parks (1973). “*In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.” *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5), pp. 1417–23.

- Goldin, B. R. and S. L. Gorbach (2008). “Clinical indications for probiotics: an overview.” *Clinical infectious diseases*, 46 (Suppl 2), S96–100.
- Grabig, A., D. Paclik, C. Guzy, A. Dankof, D. C. Baumgart, J. Erckenbrecht, B. Raupach, U. Sonnenborn, J. Eckert, R. R. Schumann, B. Wiedenmann, A. U. Dignass, and A. Sturm (2006). “*Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways.” *Infection and immunity*, 74 (7), pp. 4075–82.
- Grinstead, D. A. and S. F. Barefoot (1992). “Jensenin G, a heat-stable bacteriocin produced by *Propionibacterium jensenii* P126.” *Applied and environmental microbiology*, 58 (1), pp. 215–20.
- Guglielmetti, S., V. Taverniti, M. Minuzzo, S. Arioli, I. Zanoni, M. Stuknyte, F. Granucci, M. Karp, and D. Mora (2010). “A dairy bacterium displays *in vitro* probiotic properties for the pharyngeal mucosa by antagonizing group A streptococci and modulating the immune response.” *Infection and immunity*, 78 (11), pp. 4734–43.
- Guss, A. M., G. Roeselers, I. L. G. Newton, C. R. Young, V. Klepac-Ceraj, S. Lory, and C. M. Cavanaugh (2011). “Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria associated with cystic fibrosis.” *The ISME journal*, 5 (1), pp. 20–9.
- Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley (2009). “Evolving concepts in biofilm infections.” *Cellular microbiology*, 11 (7), pp. 1034–43.
- Han, M. K. M., Y. J. Y. Huang, J. J. J. J. Lipuma, H. A. Boushey, R. C. Boucher, W. O. Cookson, J. L. Curtis, J. Erb-Downward, S. V. Lynch, S. Sethi, G. B. Toews, V. B. Young, M. C. Wolfgang, G. B. Huffnagle, and F. J. Martinez (2012). “Significance of the microbiome in obstructive lung disease.” *Thorax*, 67 (5), pp. 456–63.
- Hancock, R. E. W. and D. P. Speert (2000). “Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment.” *Drug resis-*

Bibliographie

- tance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 3 (4), pp. 247–255.
- Hanniffy, S. B., A. T. Carter, E. Hitchin, and J. M. Wells (2007). “Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection.” *The Journal of infectious diseases*, 195 (2), pp. 185–93.
- Hao, Q., Z. Lu, B. R. Dong, C. Q. Huang, and T. Wu (2011). “Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections.” *The Cochrane database of systematic reviews*, (9), p. CD006895.
- Harata, G., F. He, N. Hiruta, M. Kawase, A. Kubota, M. Hiramatsu, and H. Yausi (2010). “Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses.” *Letters in applied microbiology*, 50 (6), pp. 597–602.
- Hartemink, R., V. Domenech, and F. Rombouts (1997). “LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces”. *Journal of microbiological methods*, 29 (2), pp. 77–84.
- Haug, M. C., S. A. Tanner, C. Lacroix, M. J. A. Stevens, and L. Meile (2011). “Monitoring horizontal antibiotic resistance gene transfer in a colonic fermentation model.” *FEMS microbiology ecology*, 78 (2), pp. 210–9.
- Hentzer, M., H. Wu, J. B. Andersen, K. Riedel, T. B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M. A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J. W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Høiby, and M. Givskov (2003). “Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors.” *The EMBO journal*, 22 (15), pp. 3803–15.
- Herbst, T., A. Sichelstiel, C. Schär, K. Yadava, K. Bürki, J. Cahenzli, K. McCoy, B. J. Marsland, and N. L. Harris (2011). “Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization.” *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184 (2), pp. 198–205.

- Héry-Arnaud, G., N. Rouzic, A. Doloy, G. Le Lay, M. Garré, C. Payan, and C. Poyart (2011). “*Streptococcus australis meningitis*.” *Journal of medical microbiology*, 60 (Pt 11), pp. 1701–4.
- Hilty, M., C. Burke, H. Pedro, P. Cardenas, A. Bush, C. Bossley, J. Davies, A. Ervine, L. Poulter, L. Pachter, M. F. Moffatt, and W. O. C. Cookson (2010). “Disordered microbial communities in asthmatic airways.” *PloS One*, 5 (1), e8578.
- Hodges, K. and R. Gill (2010). “Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms.” *Gut microbes*, 1 (1), pp. 4–21.
- Høiby, N., O. Ciofu, H. K. Johansen, Z.-J. Song, C. Moser, P. Ø. Jensen, S. Molin, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, and T. Bjarnsholt (2011). “The clinical impact of bacterial biofilms.” *International journal of oral science*, 3 (2), pp. 55–65.
- Husni, R. N., S. M. Gordon, J. A. Washington, and D. L. Longworth (1997). “*Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases.” *Clinical infectious diseases*, 25 (5), pp. 1048–55.
- Izumo, T., T. Maekawa, M. Ida, A. Noguchi, Y. Kitagawa, H. Shibata, H. Yasui, and Y. Kiso (2010). “Effect of intranasal administration of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 on influenza virus infection in mice.” *International immunopharmacology*, 10 (9), pp. 1101–6.
- Jefferson, K. K. (2004). “What drives bacteria to produce a biofilm?” *FEMS microbiology letters*, 236 (2), pp. 163–73.
- John, G., A. O. Yildirim, B. K. Rubin, D. C. Gruenert, and M. O. Henke (2010). “TLR-4-mediated innate immunity is reduced in cystic fibrosis airway cells.” *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 42 (4), pp. 424–31.
- Kida, Y., Y. Higashimoto, H. Inoue, T. Shimizu, and K. Kuwano (2008). “A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-

Bibliographie

- αB through protease-activated receptors.” *Cellular microbiology*, 10 (7), pp. 1491–504.
- Kim, H. G., N.-R. Kim, M. G. Gim, J. M. Lee, S. Y. Lee, M. Y. Ko, J. Y. Kim, S. H. Han, and D. K. Chung (2008). “Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* inhibits lipopolysaccharide-induced TNF-α production in THP-1 cells and endotoxin shock in mice.” *Journal of immunology*, 180 (4), pp. 2553–61.
- Klarin, B., G. Molin, B. Jeppsson, and A. Larsson (2008). “Use of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 299 to reduce pathogenic bacteria in the oropharynx of intubated patients: a randomised controlled open pilot study.” *Critical care*, 12 (6), R136.
- Klausen, M., A. Aaes-Jørgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen (2003). “Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms”. *Molecular microbiology*, 50 (1), pp. 61–8.
- Klein, G., C. Hallmann, I. A. Casas, J. Abad, J. Louwers, and G. Reuter (2000). “Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods.” *Journal of applied microbiology*, 89 (5), pp. 815–24.
- Kluytmans, J. A. J. W. and H. F. L. Wertheim (2005). “Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections.” *Infection*, 33 (1), pp. 3–8.
- Knapp, C. W., J. Dolfing, P. a. I. Ehlert, and D. W. Graham (2010). “Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940.” *Environmental science & technology*, 44 (2), pp. 580–7.
- Knight, D. J. W., D. Gardiner, A. Banks, S. E. Snape, V. C. Weston, S. Bengmark, and K. J. Girling (2009). “Effect of synbiotic therapy on the

- incidence of ventilator associated pneumonia in critically ill patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial.” *Intensive care medicine*, 35 (5), pp. 854–61.
- Koenig, S. M. and J. D. Truwit (2006). “Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention.” *Clinical microbiology reviews*, 19 (4), pp. 637–57.
- Kollef, M. H. (2004). “Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia”. *Critical Care Medicine*, 32 (6), pp. 1396–1405.
- Kon, Y., H. Tsukada, T. Hasegawa, K. Igarashi, K. Wada, E. Suzuki, M. Arakawa, and F. Gejyo (1999). “The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model.” *FEMS immunology and medical microbiology*, 25 (3), pp. 313–21.
- Kotzampassi, K., E. J. Giamarellos-Bourboulis, A. Voudouris, P. Kazamias, and E. Eleftheriadis (2006). “Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte) in critically ill trauma patients: early results of a randomized controlled trial.” *World journal of surgery*, 30 (10), pp. 1848–55.
- Kuramitsu, H. K., X. He, R. Lux, M. H. Anderson, and W. Shi (2007). “Interspecies interactions within oral microbial communities.” *Microbiology and molecular biology reviews*, 71 (4), pp. 653–70.
- Lazdunski, A. M., I. Ventre, and J. N. Sturgis (2004). “Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria.” *Nature reviews. Microbiology*, 2 (7), pp. 581–92.
- Le Berre, R., K. Faure, S. Nguyen, M. Pierre, F. Ader, and B. Guery (2006). “Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*?” *Médecine et maladies infectieuses*, 36 (7), pp. 349–57.
- Le Berre, R., S. Nguyen, E. Nowak, E. Kipnis, M. Pierre, F. Ader, R. Courcol, B. P. Guery, and K. Faure (2008). “Quorum-sensing activity and related

Bibliographie

- virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.” *Clinical microbiology and infection*, 14 (4), pp. 337–43.
- Le Berre, R., S. Nguyen, E. Nowak, E. Kipnis, M. Pierre, L. Quenee, F. Ader, S. Lancel, R. Courcol, B. P. Guery, and K. Faure (2011). “Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.” *Critical care medicine*, 39 (9), pp. 2113–20.
- Lemon, K. P., V. Klepac-Ceraj, H. K. Schiffer, E. L. Brodie, S. V. Lynch, and R. Kolter (2010). “Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx.” *mBio*, 1 (3), pp. 4–6.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier (2002). “Lung infections associated with cystic fibrosis”. *Clinical microbiology reviews*, 15 (2), pp. 194–222.
- Ma, L., M. Conover, H. Lu, M. R. Parsek, K. Bayles, and D. J. Wozniak (2009). “Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix.” *PLoS pathogens*, 5 (3), e1000354.
- Mack, D. R., S. Michail, S. Wei, L. McDougall, and M. A. Hollingsworth (1999). “Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression.” *The American journal of physiology*, 276 (4 Pt 1), G941–50.
- Maeda, N., R. Nakamura, Y. Hirose, S. Murosaki, Y. Yamamoto, T. Kase, and Y. Yoshikai (2009). “Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice.” *International immunopharmacology*, 9 (9), pp. 1122–5.
- Magiorakos, A. A.-P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet (2012). “Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal

- for interim standard definitions for acquired resistance.” *Clinical microbiology and infection*, 18 (3), pp. 268–81.
- Man, J. C. de, M. Rogosa, and M. E. Sharpe (1960). “A medium for the cultivation of lactobacilli”. *Journal of Applied Bacteriology*, 23 (1), pp. 130–5.
- Mariencheck, W. I., J. F. Alcorn, S. M. Palmer, and J. R. Wright (2003). “*Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D.” *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 28 (4), pp. 528–37.
- Matsumoto, T., H. Ishikawa, K. Tateda, T. Yaeshima, N. Ishibashi, and K. Yamaguchi (2008). “Oral administration of *Bifidobacterium longum* prevents gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice.” *Journal of applied microbiology*, 104 (3), pp. 672–80.
- Maukonen, J., J. Mättö, M.-L. Suihko, and M. Saarela (2008). “Intra-individual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota.” *Journal of medical microbiology*, 57 (Pt 12), pp. 1560–8.
- Medellin-Peña, M. J., H. Wang, R. Johnson, S. Anand, and M. W. Griffiths (2007). “Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157 : H7.” *Applied and environmental microbiology*, 73 (13), pp. 4259–67.
- Medina, M., J. Villena, E. Vintiñi, E. M. Hebert, R. Raya, and S. Alvarez (2008). “Nasal immunization with *Lactococcus lactis* expressing the pneumococcal protective protein A induces protective immunity in mice.” *Infection and immunity*, 76 (6), pp. 2696–705.
- Mellmann, A., J. Cloud, T. Maier, U. Keckevoet, I. Ramminger, P. Iwen, J. Dunn, G. Hall, D. Wilson, P. Lasala, M. Kostrzewa, and D. Harmsen (2008). “Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to *16S rRNA* gene sequencing

Bibliographie

- for species identification of nonfermenting bacteria.” *Journal of clinical microbiology*, 46 (6), pp. 1946–54.
- Merritt, J. H., D. E. Kadouri, and G. A. O’Toole (2005). “Growing and analyzing static biofilms.” *Current protocols in microbiology*, Chapter 1 (S 22), Unit 1B.1.
- Messaoudi, S., A. Madi, H. Prévost, M. Feuilleley, M. Manai, X. Dousset, and N. Connil (2012). “*In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51.” *Anaerobe*, 18 (6), pp. 584–9.
- Miake, S., K. Nomoto, and T. Yokokura (1985). “Protective effect of *Lactobacillus casei* on *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice.” *Infection and immunity*, 48 (2).
- Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001). “Quorum sensing in bacteria.” *Annual review of microbiology*, 55, pp. 165–99.
- Mizgerd, J. P. and S. J. Skerrett (2008). “Animal models of human pneumonia.” *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 294 (3), pp. L387–98.
- Montalto, M., M. Vastola, L. Marigo, M. Covino, R. Graziosetto, V. Curigliano, L. Santoro, L. Cuoco, R. Manna, and G. Gasbarrini (2004). “Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study.” *Digestion*, 69 (1), pp. 53–6.
- Morissette, C. and E. Skamene (1995). “Endobronchial inflammation following *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible strains of mice.” *Infection and immunity*, 63 (5), pp. 1718–24.
- Morrow, L. E., M. H. Kollef, and T. B. Casale (2010). “Probiotic prophylaxis of ventilator-associated pneumonia: a blinded, randomized, controlled trial.” *American journal of respiratory and critical care medicine*, 182 (8), pp. 1058–64.

- Mullard, A. (2008). “Microbiology: the inside story.” *Nature*, 453 (7195), pp. 578–80.
- Nardone, L. L. and S. B. Andrews (1979). “Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte. Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors.” *Biochimica et biophysica acta*, 573 (2), pp. 276–95.
- Naser, S. M., F. L. Thompson, B. Hoste, D. Gevers, P. Dawyndt, M. Vancanneyt, and J. Swings (2005). “Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes.” *Microbiology (Reading, England)*, 151 (Pt 7), pp. 2141–50.
- Njoroge, J. and V. Sperandio (2009). “Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases.” *EMBO molecular medicine*, 1 (4), pp. 201–10.
- Noverr, M. C. and G. B. Huffnagle (2004). “Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?” *Trends in microbiology*, 12 (12), pp. 562–8.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). “Mechanisms of probiotic actions - A review.” *International journal of medical microbiology*, 300 (1), pp. 57–62.
- Osset, J., R. M. Bartolomé, E. García, and A. Andreu (2001). “Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells.” *The Journal of infectious diseases*, 183 (3), pp. 485–91.
- O’Sullivan, B. P. and S. D. Freedman (2009). “Cystic fibrosis.” *Lancet*, 373 (9678), pp. 1891–904.
- O’Toole, G., H. B. Kaplan, and R. Kolter (2000). “Biofilm formation as microbial development.” *Annual review of microbiology*, 54, pp. 49–79.
- Paster, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst (2001). “Bacterial diversity

Bibliographie

- in human subgingival plaque.” *Journal of bacteriology*, 183 (12), pp. 3770–83.
- Peeters, E., H. J. Nelis, and T. Coenye (2008). “Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates.” *Journal of microbiological methods*, 72 (2), pp. 157–65.
- Pérez-Cano, F. J., H. Dong, and P. Yaqoob (2010). “*In vitro* immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk.” *Immunobiology*, 215 (12), pp. 996–1004.
- Petrof, E. O. (2009). “Probiotics and gastrointestinal disease: clinical evidence and basic science.” *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*, 8 (3), pp. 260–269.
- Racedo, S., J. Villena, M. Medina, G. Agüero, V. Rodríguez, and S. Alvarez (2006). “*Lactobacillus casei* administration reduces lung injuries in a *Streptococcus pneumoniae* infection in mice.” *Microbes and infection*, 8 (9-10), pp. 2359–66.
- Ramphal, R., V. Balloy, J. Jyot, A. Verma, M. Si-Tahar, and M. Chignard (2008). “Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin.” *Journal of immunology*, 181 (1), pp. 586–92.
- Raoust, E., V. Balloy, I. Garcia-Verdugo, L. Touqui, R. Ramphal, and M. Chignard (2009). “*Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells.” *PloS One*, 4 (10), e7259.
- Reid, G., J. Jass, M. T. M. Sebulsky, and J. K. McCormick (2003). “Potential uses of probiotics in clinical practice”. *Clinical Microbiology Reviews*, 16 (4), pp. 658–72.

- Resta-Lenert, S. and K. E. Barrett (2003). “Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC).” *Gut*, 52 (7), pp. 988–97.
- Rizzo, A., A. Losacco, C. R. Carratelli, M. D. Domenico, and N. Bevilacqua (2013). “*Lactobacillus plantarum* reduces *Streptococcus pyogenes* virulence by modulating the IL-17, IL-23 and Toll-like receptor 2/4 expressions in human epithelial cells.” *International immunopharmacology*, 17 (2), pp. 453–61.
- Roger, P., J. Delettre, M. Bouix, and C. Béal (2011). “Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva.” *Journal of applied microbiology*, 111 (3), pp. 631–41.
- Römling, U. and C. Balsalobre (2012). “Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies.” *Journal of internal medicine*, 272 (6), pp. 541–61.
- Rumbaugh, K. P., J. A. Griswold, and A. N. Hamood (2000). “The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.” *Microbes and infection*, 2 (14), pp. 1721–31.
- Rust, L., C. R. Messing, and B. H. Iglewski (1994). “Elastase assays.” *Methods in enzymology*, 235, pp. 554–62.
- Sadikot, R. T., T. S. Blackwell, J. W. Christman, and A. S. Prince (2005). “Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.” *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171 (11), pp. 1209–23.
- Salva, S., J. Villena, and S. Alvarez (2010). “Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections.” *International journal of food microbiology*, 141 (1-2), pp. 82–9.

Bibliographie

- Sansonetti, P. (2013). *Of Microbes and Men. War and Peace on the Mucosal Surfaces*. Ed. by Collège de France. Paris.
- Santos, L. M. dos, M. M. Santos, H. P. de Souza Silva, R. M. E. Arantes, J. R. Nicoli, and L. Q. Vieira (2011). “Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection.” *Medical microbiology and immunology*, 200 (1), pp. 29–38.
- Schillinger, U., F. K. Lücke, and F.-k. Lucke (1989). “Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat.” *Applied and environmental microbiology*, 55 (8), pp. 1901–6.
- Schlee, M., J. Harder, B. Köten, E. F. Stange, J. Wehkamp, and K. Fellermann (2008). “Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2.” *Clinical and experimental immunology*, 151 (3), pp. 528–35.
- Schröder, J. M. and J. Harder (1999). “Human beta-defensin-2.” *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31 (6), pp. 645–51.
- Schurr, M. J. (2013). “Which bacterial biofilm exopolysaccharide is preferred, Psl or alginate?” *Journal of bacteriology*, 195 (8), pp. 1623–6.
- Schuster, M., C. P. Lostroh, T. Ogi, and E. P. Greenberg (2003). “Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis”. *Journal of Bacteriology*, 185 (7), pp. 2066–2079.
- Segata, N., S. K. Haake, P. Mannon, K. P. Lemon, L. Waldron, D. Gevers, C. Huttenhower, and J. Izard (2012). “Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples.” *Genome biology*, 13 (6), R42.
- Shida, K., M. Nanno, and S. Nagata (2011). “Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible

- mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities”. *Gut Microbes*, 2 (2), pp. 109–14.
- Shimazu, T., J. Villena, M. Tohno, H. Fujie, S. Hosoya, T. Shimosato, H. Aso, Y. Suda, Y. Kawai, T. Saito, S. Makino, S. Ikegami, H. Itoh, and H. Kitazawa (2012). “Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the Toll-like receptor signaling pathway.” *Infection and immunity*, 80 (1), pp. 276–88.
- Shotton, D. (1970). “Elastase”. *Methods in enzymology*, 19, pp. 113–40.
- Siempos, I. I., T. K. Ntaidou, and M. E. Falagas (2010). “Impact of the administration of probiotics on the incidence of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of randomized controlled trials.” *Critical care medicine*, 38 (3), pp. 954–62.
- Silby, M. W., C. Winstanley, S. A. C. Godfrey, S. B. Levy, and R. W. Jackson (2011). “*Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable.” *FEMS microbiology reviews*, 35 (4), pp. 652–80.
- Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg (2000). “Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms.” *Nature*, 407 (6805), pp. 762–764.
- Smet, A. M. G. A. de, J. A. J. W. Kluytmans, H. E. M. Blok, E. M. Mascini, R. F. J. Benus, A. T. Bernards, E. J. Kuijper, M. A. Leverstein-van Hall, A. R. Jansz, B. M. de Jongh, G. J. van Asselt, I. H. M. E. Frenay, S. F. T. Thijsen, S. N. M. Conijn, J. A. Kaan, J. P. Arends, P. D. J. Sturm, M. C. J. Bootsma, and M. J. M. Bonten (2011). “Selective digestive tract decontamination and selective oropharyngeal decontamination and antibiotic resistance in patients in intensive-care units: an open-label, clustered

Bibliographie

- group-randomised, crossover study.” *The Lancet infectious diseases*, 11 (5), pp. 372–80.
- Smith, R. S. and B. H. Iglewski (2003). “*Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target.” *The Journal of clinical investigation*, 112 (10), pp. 1460–5.
- Snydman, D. R. (2008). “The safety of probiotics.” *Clinical infectious diseases*, 46 Suppl 2 (Suppl 2), S104–11.
- Spindler-Vesel, A., S. Bengmark, I. Vovk, O. Cerovic, and L. Kompan (2007). “Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients.” *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 31 (2), pp. 119–26.
- Sze, M. A., P. A. Dimitriu, S. Hayashi, W. M. Elliott, J. E. McDonough, J. V. Gosselink, J. Cooper, D. D. Sin, W. W. Mohn, and J. C. Hogg (2012). “The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease.” *American journal of respiratory and critical care medicine*, 185 (10), pp. 1073–80.
- Tam, M., G. J. Snipes, and M. M. Stevenson (1999). “Characterization of chronic bronchopulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible inbred mouse strains.” *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 20 (4), pp. 710–9.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar (2011). “MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.” *Molecular biology and evolution*, 28 (10), pp. 2731–9.
- Tanaka, A., M. Seki, S. Yamahira, H. Noguchi, K. Kosai, M. Toba, Y. Morinaga, T. Miyazaki, K. Izumikawa, H. Kakeya, Y. Yamamoto, K. Yanagihara, T. Tashiro, N. Kohda, and S. Kohno (2011). “*Lactobacillus pentosus*

- strain b240 suppresses pneumonia induced by *Streptococcus pneumoniae* in mice.” *Letters in applied microbiology*, 53 (1), pp. 35–43.
- Tannock, G. W. (1987). “Conjugal transfer of plasmid pAM beta 1 in *Lactobacillus reuteri* and between lactobacilli and *Enterococcus faecalis*.” *Applied and environmental microbiology*, 53 (11), pp. 2693–5.
- Teanpaisan, R. and G. Dahlén (2006). “Use of polymerase chain reaction techniques and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for differentiation of oral *Lactobacillus* species.” *Oral microbiology and immunology*, 21 (2), pp. 79–83.
- Tenover, F. C. (2006). “Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.” *American journal of infection control*, 34 (5 Suppl 1), S3–10.
- Valdéz, J. C., M. C. Peral, M. Rachid, M. Santana, and G. Perdigón (2005). “Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment.” *Clinical microbiology and infection*, 11 (6), pp. 472–9.
- Valle, J., S. Da Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert, and J.-M. Ghigo (2006). “Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (33), pp. 12558–63.
- Varma, P., K. R. Dinesh, K. K. Menon, and R. Biswas (2010). “*Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens.” *Journal of food science*, 75 (9), pp. M546–51.
- Villena, J., M. Medina, E. Vintiñi, and S. Alvarez (2008). “Stimulation of respiratory immunity by oral administration of *Lactococcus lactis*.” *Canadian journal of microbiology*, 54 (8), pp. 630–8.
- Vrese, M. de and P. R. Marteau (2007). “Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea.” *The Journal of nutrition*, 137 (3 Suppl 2), 803S–11S.

Bibliographie

- Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks, and B. H. Iglewski (2003). “Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment.” *Journal of bacteriology*, 185 (7), pp. 2080–95.
- Wang, J., Y. Dong, T. Zhou, X. Liu, Y. Deng, C. Wang, J. Lee, and L.-H. Zhang (2013). “*Pseudomonas aeruginosa* cytotoxicity is attenuated at high cell density and associated with the accumulation of phenylacetic acid.” *PloS One*, 8 (3), e60187.
- Weiss, B., Y. Bujanover, Y. Yahav, D. Vilozni, E. Fireman, and O. Efrati (2010). “Probiotic supplementation affects pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study.” *Pediatric pulmonology*, 45 (6), pp. 536–40.
- Wenzel, R. P. (2004). “The antibiotic pipeline—challenges, costs, and values.” *The New England journal of medicine*, 351 (6), pp. 523–6.
- Wertheim, H. F. L., D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh, and J. L. Nouwen (2005). “The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections.” *The Lancet infectious diseases*, 5 (12), pp. 751–62.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman, and W. J. Wiebe (1998). “Prokaryotes: the unseen majority.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (12), pp. 6578–83.
- Willner, D., M. Furlan, M. Haynes, R. Schmieder, F. E. Angly, J. Silva, S. Tammadoni, B. Nosrat, D. Conrad, and F. Rohwer (2009). “Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals.” *PloS One*, 4 (10), e7370.
- Wilson, R., R. Dowling, and A. Jackson (1996). “The biology of bacterial colonization and invasion of the respiratory mucosa”. *The European respiratory journal*, 9 (7), pp. 1523–30.

- Winans, S. C. (2002). "Bacterial esperanto." *Nature structural biology*, 9 (2), pp. 83–4.
- Wölbeling, F., A. Munder, T. Kerber-Momot, D. Neumann, C. Hennig, G. Hansen, B. Tümmler, and U. Baumann (2011). "Lung function and inflammation during murine *Pseudomonas aeruginosa* airway infection." *Immunobiology*, 216 (8), pp. 901–8.
- Wong, S.-S., Z. Quan Toh, E. M. Dunne, E. K. Mulholland, M. L. K. Tang, R. M. Robins-Browne, P. V. Licciardi, and C. Satzke (2013). "Inhibition of *Streptococcus pneumoniae* adherence to human epithelial cells *in vitro* by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG." *BMC research notes*, 6 (135).
- Wozniak, D. J., T. J. O. Wyckoff, M. Starkey, R. Keyser, P. Azadi, G. A. O'Toole, and M. R. Parsek (2003). "Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (13), pp. 7907–12.
- Younes, J. A., H. C. van der Mei, E. van den Heuvel, H. J. Busscher, and G. Reid (2012). "Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli." *PloS One*, 7 (5), e36917.
- Yu, H., M. Hanes, C. E. Chrisp, J. C. Boucher, and V. Deretic (1998). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: pulmonary clearance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and inflammation in a mouse model of repeated respiratory challenge." *Infection and immunity*, 66 (1), pp. 280–8.
- Zaura, E., B. J. F. Keijser, S. M. Huse, and W. Crielaard (2009). "Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities." *BMC microbiology*, 9 (259).
- Zihler, A., G. Le Blay, T. de Wouters, C. Lacroix, C. P. Braegger, A. Lehner, P. Tischler, T. Rattei, H. Hächler, and R. Stephan (2009). "*In vitro* inhibition activity of different bacteriocin-producing *Escherichia coli* against

Bibliographie

- Salmonella strains isolated from clinical cases.” *Letters in applied microbiology*, 49 (1), pp. 31–8.
- Zyrek, A. A., C. Cichon, S. Helms, C. Enders, U. Sonnenborn, and M. A. Schmidt (2007). “Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair.” *Cellular microbiology*, 9 (3), pp. 804–16.

Développement d'une application oropharyngée de lactobacilles pour lutter contre les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa*

Résumé : *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable de pneumonies. Il est particulièrement impliqué dans la mortalité des patients sous ventilation mécanique et des patients atteints de la mucoviscidose. Ces infections sont difficiles à traiter en raison de l'existence de nombreuses résistances aux antibiotiques chez cette bactérie et des alternatives thérapeutiques s'avèrent donc nécessaires. Nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'une application oropharyngée de lactobacilles pourrait permettre de limiter les infections à *P. aeruginosa* et leurs effets chez les patients concernés.

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer les effets d'un mélange de lactobacilles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa*. Les effets de lactobacilles isolés dans les cavités orales de volontaires sains sur la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 ont été mesurés *in vitro*. Les effets des lactobacilles sélectionnés ont ensuite été évalués dans un modèle d'infection de cellules épithéliales respiratoires (A549) par *P. aeruginosa* PAO1 puis dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa* PAO1. Les effets de 87 lactobacilles sur la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1 ont été déterminés *in vitro*, aboutissant à la sélection de 3 et 5 souches ayant respectivement inhibé la formation de biofilm et l'activité élastolytique de *P. aeruginosa* PAO1. Parmi ces souches, *L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 et *L. zeae* Od.76, qui étaient les souches les plus actives contre la formation de biofilm ou l'activité élastolytique et les plus acidifiantes lors de croissances dans une salive artificielle, ont été associées dans un mélange testé dans un modèle cellulaire d'infection à *P. aeruginosa* PAO1. Ce mélange n'a pas eu d'effet cytotoxique et a démontré un effet cytoprotecteur vis-à-vis de l'infection à *P. aeruginosa* PAO1. *In vivo*, l'administration intratrachéale de ces mêmes bactéries de façon prophylactique a permis d'une part de réduire les charges pulmonaires en *P. aeruginosa* PAO1 et d'autre part de réduire ses effets pro-inflammatoires au niveau pulmonaire (IL-6, TNF- α). Ces résultats prometteurs laissent entrevoir la possibilité de nouvelles applications thérapeutiques pour les probiotiques.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus*, infections respiratoires, pneumonies, probiotiques, modèle animal, antibiorésistance, biofilm, élastase.

Development of an oropharyngeal application of lactobacilli to fight pulmonary infections with *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract : *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes pneumonia and which is involved in the mortality of mechanically-ventilated or cystic fibrosis patients. These infections are difficult to treat because of the existence of many antibiotic resistances in *P. aeruginosa* and therapeutic alternatives are needed. Our hypothesis was that the use of probiotics could be an alternative to antibiotic therapy in order to reduce *P. aeruginosa* infections and its injurious and pro-inflammatory effects in lungs. The main goal of this work was to evaluate the effects of lactobacilli in a murine model of *P. aeruginosa* pneumonia. The first step of this work was to screen lactobacilli isolated from oral cavities of healthy volunteers against biofilm formation and elastolytic activity of *P. aeruginosa* PAO1. The effects of selected lactobacilli were then evaluated in a model of infection of lung epithelial cells by *P. aeruginosa* PAO1 and in a murine model of *P. aeruginosa* PAO1 pneumonia. Eighty-seven lactobacilli were tested *in vitro*, leading to the selection of 3 and 5 strains respectively active against biofilm formation and elastolytic activity. The most active strains (*L. fermentum* K.C6.3.1E, *L. paracasei* ES.D.88 and *L. zeae* Od.76) toward biofilm formation and elastolytic activity were chosen to be tested *in vitro*, in a cell model of *P. aeruginosa* PAO1 infection. This mix showed cytoprotective effect against *P. aeruginosa* PAO1. Finally, the prophylactic intratracheal administration of the mix of lactobacilli in mice allowed to reduce the pulmonary loads in *P. aeruginosa* PAO1. In the same time, the pro-inflammatory effects (IL-6 and TNF- α) of the infection were reduced. These promising results suggest the possibility of new therapeutic applications for probiotics.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus*, respiratory infections, pneumonia, probiotics, animal model, antibiotic resistance, biofilm, elastase.