

Résumé de soutenance d'habilitation à diriger la recherche de Rozenn Le Berre

INTERET THERAPEUTIQUE DES LACTOBACILLUS PAR VOIE INTRANASALE SUR UN MODELE MURIN DE PNEUMONIE A *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est responsable d'infections respiratoires, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose (CF) ou de broncho-pneumonie chronique obstructive sévère ou sous ventilation mécanique.

Mes premiers travaux de recherche se sont focalisés sur la physiopathologie et le rôle de certains facteurs de virulence de *P. aeruginosa* : l'élastase et la pyocyanine (sous la dépendance du quorum sensing), le système de sécrétion de type III et le lipopolysaccharide. Sur un modèle murin de pneumonie, nous avons pu montrer en analysant les conséquences pulmonaires de 56 souches de *P. aeruginosa* issues de prélèvements respiratoires, la contribution de chacun de ces facteurs de virulence (Le Berre, Clin Microbiol Inf, 2008 ; Le Berre R, Crit Care Med 2011).

La prévalence des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes augmente. Parmi la recherche de thérapeutiques alternatives aux antibiotiques, l'utilisation de bactéries bénéfiques, de probiotiques comme les *Lactobacillus* sont prometteurs. Nous avons testé la capacité de 87 isolats de *Lactobacillus* (isolés de cavités orales de sujets sains et de laits crus) à diminuer l'activité de 2 facteurs de virulence de *P. aeruginosa* : l'élastase et le biofilm. Parmi les 8 souches sélectionnées pour leur performance contre ces 2 facteurs, 5 appartenaient à l'espèce *Lactobacillus fermentum*, une à l'espèce *L. paracasei* et une à l'espèce *L. zae*. (Alexandre et al, BMC Microbiol 2014). Nous avons montré que le mélange de 3 de ces souches les plus actives (*L. fermentum* K.C6.31.E, *L. zae* Od.76 et *L. paracasei* ES.D.88) non seulement ne provoquaient aucune cytotoxicité sur les cellules épithéliales pulmonaires mais en plus diminuaient la cytotoxicité de PAO1 sur ces cellules. Ce résultat nous a conduit à administrer ces 3 souches de manière prophylactique par voie intratrachéale sur un modèle murin de pneumonie à PAO1 : les souris prétraitées avaient une diminution significative de la charge bactérienne de PAO1, quatre heures après l'administration de ce pathogène (Fangous et al, soumis à Beneficial Microbes, 2019).

Afin de poursuivre ces expérimentations sur l'usage prophylactique de *Lactobacillus* pour lutter contre la pneumonie à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose, trois orientations ont été développées :

-Améliorer la détection de *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose en mettant en place un schéma optimal de détection de *P. aeruginosa* par la PCR en temps réel (qPCR, quantitative PCR) basé sur un criblage par la cible *oprL* confirmé par une qPCR multiplexe *gyrB/ecfX* (Le Gall et al, BMC Microbiol, 2013). Une étude prospective multicentrique (PHRC inter-régional PYOMUCO) de 3 ans a été réalisée afin d'établir le gain de temps apporté par la qPCR associée à la culture par rapport à la culture

seule lors du diagnostic de primo-colonisation à *P. aeruginosa* chez les patients CF. Nos résultats ont montré que la qPCR offrait un gain de temps médian de 8 mois (Héry-Arnaud et al, Clin Microbiol Inf, 2017). Ce laps de temps est une période opportune pour proposer d'éventuels traitements prophylactiques.

-Décrire des *Lactobacillus* provenant des expectorations de patients CF afin de cribler des souches adaptées à cet écosystème respiratoire. Sur une période de 8 mois, 199 expectorations issus de 100 patients ont été analysées selon le stade de colonisation à *P. aeruginosa*. 97 prélèvements se sont avérés positifs à au moins une souche de *Lactobacillus*, soit 46%. 137 souches ont été isolées, et 11 espèces identifiées. La prévalence du portage était de 61% tout stade confondu. Il n'a pas été observé de différence de prévalence ou de distribution selon le stade de colonisation (Fangous et al, Res Microbiol 2018).

-Sur un modèle murin de pneumonie à PAO1, administrer par voie intranasale des souches de *Lactobacillus* provenant d'expectoration de patients CF et sélectionnées vis-à-vis de facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (élastase et pyocyanine). L'administration de 3 souches de *Lactobacillus* (*L. paracasei* 9N, *L. salivarius* 20C et *L. brevis* 24C, mélange *L. psb*) par voie nasale, 18 heures avant celle du pathogène, a permis une augmentation significative de la survie des souris 7 jours après l'infection (100%) par rapport à celle des animaux non traités (11,7%). De plus, dans le groupe des animaux traités, la clairance de PAO1 était significativement améliorée et associée à une baisse significative des polynucléaires neutrophiles, des chémokines et des cytokines pro-inflammatoires dans le poumon par rapport au groupe infecté non traité. D'autres études analysant en particulier l'immunomodulation et le microbiote sont nécessaires pour explorer cet effet bénéfique des *Lactobacillus*. (Fangous et al, Eur Res J, 2019 soumis).

Ces données ont été valorisées par un brevet dont une demande d'extension internationale a été déposée (BIO 17555). Nos résultats encourageants nous conduisent donc à explorer 3 axes principaux d'utilisation des *Lactobacillus* :

-Parmi les 3 *Lactobacillus* précédemment sélectionnées, déterminer celui ou les deux ayant la meilleure activité dans la pneumonie aiguë murine à PAO1, rechercher si l'efficacité des *Lactobacillus* inactivés par la chaleur est comparable à celle des *Lactobacillus* vivants, comparer ensuite les effets de l'administration de la voie nasale à la voie orale et comprendre les mécanismes d'action mettant en jeu l'immunité innée et le microbiote pulmonaire.

-Rechercher si le ou les 2 *Lactobacillus* sélectionnés pourront prévenir d'une pneumonie à *P. aeruginosa* issue de patient CF, d'une pneumonie à VRS et d'une co-infection VRS-*P. aeruginosa*

-Sélectionner à partir de notre collection de *Lactobacillus* issus de prélèvements respiratoires, ceux ayant une activité contre le biofilm de *P. aeruginosa* puis tester leur efficacité sur un modèle murin de pneumonie chronique à *P. aeruginosa* multirésistant sécréteur de carbapénémases. Afin

d'élucider les mécanismes d'action, des études *in vitro* des interactions entre *Lactobacillus*, *P. aeruginosa* et cellules immunitaires et épithéliales seront réalisées.