

Thèse de Doctorat

Marie-Ange DAGNELIE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie - Santé*

Discipline : *Biologie, Médecine, Santé*

Spécialité : *Biologie de la peau*

Unité de recherche : *CRCINA U1232, équipe INSERM n°2, Recherche clinique et translationnelle sur le cancer de la peau*

Soutenue le *17 octobre 2018*

Etude d'acquisition de connaissances sur l'acné nodulaire du dos

Impact du microbiote cutané et de l'immunité innée dans la
physiopathologie de l'acné sévère du dos

JURY

Président du jury :	Stéphane CORVEC , Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Rapporteurs :	Olivier JOIN-LAMBERT , Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Université de Caen Marie-Thérèse LECCIA , Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Université de Grenoble
Examineurs :	Séverine ALLEGRA , Maître de Conférences des Universités, Université de Saint-Etienne
Directeur de Thèse :	Brigitte DRENO , Professeur d'Université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	Amir KHAMMARI , Docteur en Biologie, Université de Nantes

谢谢 – Remerciements – Acknowledgements

Je voudrais tout d'abord remercier ma maître de Thèse, le Professeur Brigitte Dréno, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour m'avoir transmis une partie de son savoir sur ce domaine passionnant qui est la Dermatologie, pour m'avoir soutenue dans les étapes clefs de ma Thèse, pour m'avoir toujours encouragé à rédiger des articles, pour m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même, et pour m'avoir permis de présenter mes travaux à tous ces congrès à travers le monde. Madame le Professeur Dréno, soyez assurée de mon admiration, de mon estime, et de mon profond respect. Cela a été un honneur pour moi de réaliser ma Thèse sous votre supervision.

Je remercie le Docteur Amir Khammari pour avoir codirigé ce travail de Thèse et pour tous ses précieux conseils qui m'ont accompagné au cours de ces trois années. Soyez assuré de mon profond respect.

Je voudrais adresser mes remerciements au Docteur Stéphane Corvec, pour m'avoir soutenue, conseillé, guidé, et surtout pour avoir partagé ses connaissances pointues sur la Bactériologie. Je vous remercie pour votre écoute, votre rigueur, votre patience, et votre bienveillance à mon égard durant ces trois années. Soyez assuré de mon admiration et de mon profond respect.

J'exprime ici ma profonde gratitude au Professeur Marie-Thérèse Leccia et au Professeur Olivier Join-Lambert, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette Thèse, de même que pour leur participation au Jury. Leurs remarques et suggestions ont largement contribué à l'amélioration de ce manuscrit.

Je remercie le Docteur Séverine Allegra, pour avoir accepté de participer à ce Jury et d'apporter son enrichissant jugement scientifique. Vous êtes l'une des premières à m'avoir transmis la passion de la Bactériologie, avec le Professeur Serge Riffard et le Docteur Françoise Girardot, en première année de DUT. Je n'oublie pas cette période de ma vie, où grâce à vos enseignements rigoureux, j'ai pu forger un esprit scientifique et un sens critique qui m'a accompagné tout au long de mon cursus universitaire. Soyez assurée de ma reconnaissance et de tout mon respect.

Mes remerciements à l'ensemble du Département d'Evaluation Cutis-R&D du laboratoire Galderma pour leur financement, leur collaboration et pour les échanges scientifiques qui ont jalonné ce travail de Thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe n°2 INSERM/U1232, du laboratoire d'Immuno-Dermatologie, du service d'Onco-Dermatologie du CHU de Nantes, ainsi que toute l'équipe de

l'UTCG. Parmi toutes ces personnes, je remercie tout particulièrement le Docteur Anne-Chantal Knol, pour son accueil et son écoute tout au long de ce travail de Thèse, et également le Docteur Judith Lorant, pour nos échanges fructueux autour de nos projets respectifs et du partage d'idées scientifiques. Je remercie également l'interne en Dermatologie Sarah Le Naour ainsi que le Docteur Barbara Brégeon pour leur bonne humeur et pour les discussions passionnantes autour de la médecine.

Je voudrais remercier les techniciennes du Service de Bactériologie et Hygiène Hospitalière du CHU de Nantes : Ghislaine Le Gargasson, Julie Marraillac, Elodie Belliot, et Nathalie Defosse pour leur aide précieuse dans les manipulations de Biologie Moléculaire.

Mes remerciements au Docteur Emmanuel Montassier, pour m'avoir formé aux analyses métagénomiques et à l'utilisation du pack Qiime, ainsi qu'au Docteur Jean-Michel Nguyen pour son implication dans la partie statistique.

Je remercie également toute l'équipe du Département des Brûlés et Chirurgie Plastique Adultes-Enfants du CHU de Nantes et en particulier, le Professeur Pierre Perrot et le Docteur Perrine Ridet, pour avoir mis à ma disposition les prélèvements de peau.

Je remercie mes amis de Lyon et Saint-Etienne pour leur soutien constant, pour les weekends « remontage de moral de la thésarde », les discussions sur « comment relativiser lorsqu'un protocole ne fonctionne pas après 50 essais » : Abu H., Marina C., Selma D., Charlou J., Grég. G., Maxime L., Adrien F., Adrien L., Pierre-Alexis G., merci à vous pour votre amitié et votre soutien. J'ai également une pensée pour Sofiane B., qui nous a quittés le 23 août 2017, qui était comme la plupart de ma promotion 2015, en deuxième année de Thèse, et qui était un étudiant brillant. Repose en paix.

I would like to thank all my friends from the Stem Cell Center of Renji's Hospital in Shanghai, and the others from Shanghai Jiao Tong University : Doctor Fu, Kai Qin, Chen Lu, Zhong Zhong, Yong Hui, Mary, Pamela, Zhao Hui Fang, Li, Pan, Ping, and ccp. I am also grateful to my previous mentor, Professor H. H. Zhu. You stay as one of the important person in my student-life that helped me to build a researcher's way of thinking and taught me essential skills to achieve a PhD Thesis. I thank all of you for your friendship, your advice, and for your warmed welcome everytime I am going back to China. See you soon guys.

Je remercie mes amis de Nantes, pour leur soutien et pour leur présence bienveillante : Arthur A., Doris, Djemila, Romain V., Léa M., Grégory K., Hurmelle, Charles-Louis A. Un chaleureux merci à Madame Jeannette Delaby, pour sa présence et son écoute bienveillante.

Je remercie chaleureusement mon frère Romain, alias Carnaval, Karnal, Curcuma, Curry... Je te remercie pour toutes ces discussions et tes questions titilleuses sur la science. Pour ces débats sans fins

sur « pourquoi le virus n'est pas un organisme vivant ». Moment inoubliable où, par un samedi soir tard, tu as débogué mon Macbook Air tombé en panne à cause des analyses bioinformatiques réalisées sur Qiime... ☺. Merci pour ces heures passées au téléphone à discuter de bactéries, de champignons, de virus, de cellules, de boutons, et à rigoler sur la galère des manip de la Thèse qui ne marchent pas. Je remercie également ma sœur Laurence.

Je voudrais terminer par remercier mes parents, Jean-Paul et Maryse, pour leur soutien, leurs efforts et pour avoir cru en moi depuis ces 8 années passées dans les études supérieures, et sans qui je ne serai pas arrivée aussi loin. Merci pour votre constante confiance, pour votre constant optimisme, pour votre constante aide dans toutes les situations imaginables, pour ces conversations téléphoniques quotidiennes. C'est un honneur pour moi de vous dédier cette Thèse, elle est l'illustration de vos sacrifices, de vos efforts, et de votre confiance en moi. Merci.

Sommaire

谢谢 – Remerciements – Aknowledgements	1
Introduction	16
I. La structure de la peau et ses fonctions	20
A. Structure de la peau	21
A.1 L'épiderme	22
A.2 Le derme.....	25
A.3 L'hypoderme	26
A.4 Les annexes cutanées.....	26
B. Les six fonctions de la peau.....	29
B.1 Fonction de protection.....	29
B.2 Fonction de thermo-régulation	30
B.3 Fonction de réception sensorielle	30
B.4 Fonction métabolique	31
B.5 Fonction de réservoir de sang.....	32
B.6 Fonction d'excrétion.....	32
II. Le microbiote cutané et l'immunité innée de la peau.....	33
A. Microbiote cutané et niches écologiques.....	34
A.1 Généralités.....	34
A.2 La notion de microbiote.....	35
A.3 Les notions de microbiome et de métagénome	37
A.4 Différentes espèces pour différentes localisations.....	38
A.5 Les techniques d'échantillonnage du microbiote cutané	41
B. Le microbiote cutané	45
B.1 Présentation et taxonomie de <i>C. acnes</i>	45
B.2 Typage et phylogénie de <i>C. acnes</i>	46
B.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	50

C.	Immunité innée de la peau saine	52
C.1	Les acteurs de l'immunité innée cutanée.....	52
C.2	Rôle de <i>C. acnes</i> dans l'activation de l'immunité innée cutanée	55
D.	Microbiote cutané et dermatoses inflammatoires.....	57
D.1	Microbiote cutané et acné.....	57
D.2	Microbiote cutané et dermatite atopique	60
D.3	Microbiote cutané et psoriasis	63
D.4	Microbiote et folliculites du cuir chevelu.....	64
D.5	Microbiote cutané et hypomélanose maculeuse progressive.....	65
D.6	Microbiote cutané et cancers	65
D.7	Les liens entre les différents microbiotes	66
D.8	La communication cellule hôte-bactéries commensales.....	66
III.	Objectifs	70
IV.	Matériels et Méthodes	73
A.	Etude immuno-dermatologique.....	74
A.1	Inclusion des patients dans l'étude	74
A.2	Echantillonnage des patients	75
A.3	Origines des explants de peau saine	76
A.4	Manipulations de cocultures entre <i>C. acnes</i> et les explants de peau humaine.....	77
A.5	Préparation des échantillons avant réalisation d'une immunohistochimie.....	78
A.6	Immunohistochimies	79
A.7	Dosage protéiques dans les surnageants de cultures d'explants, par la méthode ELISA ..	83
A.8	Statistiques.....	83
B.	Etude microbiologique	84
B.1	Obtention des souches de <i>C. acnes</i> et culture.....	84
B.2	Lysats bactériens	84
B.3	Caractérisation génétique des souches de <i>C. acnes</i>	88
B.4	Etude de la capacité de production de biofilm par les souches de <i>C. acnes</i>	92

B.5	Etude du microbiote cutané des patients atteints d'acné sévère <i>versus</i> sujets sains.....	93
V.	Résultats	95
A.	Etude microbiologique	96
A.1	Résultat de la mise au point d'une méthode pour créer des lysats bactériens	96
A.2	Caractérisation moléculaire des souches de <i>C. acnes</i> issue des patients inclus	104
A.3	Etude de la capacité de production de biofilm par les souches de <i>C. acnes</i>	113
A.4	Analyses métagénomiques des populations bactériennes.....	115
B.	Etude immuno-dermatologique	117
B.1	Données cliniques.....	117
B.2	Marqueurs de l'immunité innée dans les lésions inflammatoires d'acné sévère du dos .	117
B.3	Les marqueurs de l'immunité innée chez les patients atteints d'acné sévère du dos	119
B.4	Les profils inflammatoires des explants mis en contact avec des extraits de <i>C. acnes</i> ...	120
B.5	Résolutions des problèmes rencontrés et limites	128
VI.	Discussion et perspectives.....	131
	Annexes.....	117
	Références.....	120

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé

ARNr 16S : Acide RiboNucléique ribosomal 16S

ARNm : ARN messenger

ATCC : American Type Culture Collection

β -DEF2 : β -défensine-2

BCA : Bicinchoninic acid Assay

BCC : Bouillon Cœur-Cervelle

BHI : Brain Heart Infusion

CC : Complexe Clonal

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CLRs : C-type Lectin Receptors

CPP : Comité de Protection des Personnes

dNTP : mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy-adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy-cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy-guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy-thymine tri-phosphate).

DO : Densité Optique

DMSO : DiMethyl SulfOxide

ECLA : Echelle de Cotation des Lésions d'Acné

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ITS1 : Espaceur Transcrit Interne 1

GehA : Glycérol-ester hydrolase A

GEA : Groupe Expert Acné

GPI : GlycosylPhosphatidyInositol

GP : Glycoprotéines

6-HAP : 6-N-HydroxyAminoPurine

IgE : Immunoglobuline E

IL-10 : Interleukine-10

IL-17 : Interleukine-17

IL-1 β : Interleukine-1 β

IFN- γ : Interféron-gamma

IPAF : Ice Protease-Activating Factor

LP : LipoProtéines

LPS : LipoPolySaccharide

LPA ou LTA : Lipoteichoïc Acide, acide lipotéichoïque

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated gene 5

MLST : Multi-Locus Sequence Typing

NALP3 : NACHT, LRR and PYD domains-containing Protein 3

NOD2 : Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2

NLRs : Nucleotide Oligomerisation Receptors

NLS : Non-Lesional Skin (peau non lésionnelle)

NK : cellule immunitaire de type « Natural Killer »

OTUs : Operationnal Taxonomic Units

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PG : PeptidoGlycanes

PKR : Protein Kinase R

PRRs : Pattern Recognition Receptors

R&D : Recherche et Développement

RIG-I : Retinoic acid-Inducible Gene I

RLRs : RIG-1 like Receptors

rpm : round per minute (tour par minute)

TGF- β : Tumor Growth Factor β

TLRs : Toll-Like Receptor

TLR-2 : Toll-Like Receptor-2

SLST : Single-Locus Sequence Typing

ST : Sequence Type

UV : rayons Ultra-Violet

Liste des tableaux

Tableau 1 : Données cliniques des patients atteints d'acné sévère inclus dans l'étude. GEA: Groupe Expert Acné; ECLA: Echelle de Cotation des Lésions d'Acné.	75
Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés au cours des immunohistochimies réalisées dans le cadre de cette Thèse.....	80
Tableau 3 : Récapitulatif des paramètres des différents protocoles d'obtention de lysats testés. Ø : l'étape considérée n'est pas réalisée dans le protocole étudié.....	87
Tableau 4 : Tableau répertoriant les amorces permettant de réaliser la PCR multiplex dans le cadre de la détermination du phylotype de <i>C. acnes</i> (Barnard <i>et al.</i> , 2015).....	89
Tableau 5 : Tableau répertoriant les amorces permettant de réaliser les neuf PCR réalisées dans le cadre du schéma MLST9 (Lomholt and Kilian, 2010).....	90
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR SLST (Scholz <i>et al.</i> , 2014).....	91

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentatif de la structure globale de la peau, adapté de l'étude Kong <i>et al.</i> (Kong, 2011).....	21
Figure 2 : Les différents types de cellules retrouvés dans la peau. Extrait et adapté de Pearson Education, Inc. 2012.....	22
Figure 3 : Schéma représentatif des différentes glandes retrouvées dans la peau humaine. Extrait de www.sfdermato.org	28
Figure 4 : Schéma des récepteurs de la peau (Idé pour I-marginal / CNRS).....	31
Figure 5 : Diversité bactérienne du microbiote humain selon le site anatomique. Chaque part de camembert représente l'abondance relative de chacun des six phyla principaux. Extrait de (Cattoir, 2016).....	34
Figure 6 : Aperçu de géloseensemencée à partir d'un écouvillonnage, réalisé sur la peau d'un patient atteint d'acné sévère du dos (dos). A 5 jours, la culture permet ici la visualisation de <i>C. acnes</i> , <i>S. epidermidis</i> et <i>Bacillus spp</i> . Photographie prise par le Dr S. Corvec.....	36
Figure 7 : Technique de visualisation des communautés bactériennes cutanées. L'amplification de gènes cibles (à gauche) <i>versus</i> le séquençage métagénomique shotgun (à droite). Extrait de (Byrd <i>et al.</i> , 2018).	37
Figure 8 : Schéma représentatif d'une coupe histologique avec les localisations des différents microorganismes dans les couches de la peau et les annexes cutanées, extrait de (Byrd <i>et al.</i> , 2018).....	38
Figure 9 : Répartition des différentes bactéries retrouvées à la surface de la peau, en fonction des zones du corps. Extrait de (Grice and Segre, 2011).	39
Figure 10 : Vue d'ensemble des différentes couches de la peau, et des différentes possibilités d'échantillonnages pour récupérer la flore cutanée. Extrait de (Grice <i>et al.</i> , 2008).....	41
Figure 11 : Les trois techniques d'échantillonnages : (a) un e-swab ; (b) un écouvillon COPAN classique ; (c) un strip ; (d) une lame de scalpel utilisée pour la technique du « scrape ».	42
Figure 12 : Représentation schématique des trois niveaux de caractérisation existant actuellement pour le typage moléculaire de <i>C. acnes</i> . Photographie centrale extraite de (Dekio <i>et al.</i> , 2015).	46
Figure 13 : Aperçu des grands clones circulants au sein de la population de <i>C. acnes</i> . Analyses eBURST réalisées d'après le schéma MLST d'Aarhus (voir ci-après). Les souches dérivées de prostatectomie sont associées avec les ST encadrés en rouge. Extrait de (Mak <i>et al.</i> , 2013).	48
Figure 14 : Répartition des gènes utilisés pour le typage moléculaire selon le schéma d'Aarhus (MLST9, le gène <i>zno</i> ne figurant pas dans le schéma présenté) ou le schéma de Belfast (MLST7). Extrait de (Kilian <i>et al.</i> , 2011).....	49
Figure 15 : Reconnaissance des PAMPs provenant de différentes classes de pathogènes microbiens. Extrait de (Mogensen, 2009). Glycoproteins : GP ; LipoProteins : LP ; PeptidoGlycanes : PG ;	

LipoTeichoic Acid : LTA ; LipoPolySaccharides : LPS ; GlycosylPhosphatidylInositol : GPI ; NACHT, LRR and PYD domains-containing Protein 3 : NALP3 ; Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2 : NOD2 ; Ice Protease-Activating Factor : IPAF ; Retinoic acid-Inducible Gene I : RIG-I ; MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated gene 5 ; PKR : Protein Kinase R.	53
Figure 16 : Les différents niveaux et composants de la barrière cutanée. FAA : acides gras libres; ILC : cellule lymphoïde innée; iNKT : cellule tueuse naturelle invariante; Trm : cellule de mémoire résidant dans le tissu. Extrait de (Eyerich <i>et al.</i> , 2018).	54
Figure 17 : Représentation schématique de toutes les cellules immunitaires innées et adaptatives de la peau. Extrait de (SanMiguel and Grice, 2015).	54
Figure 18 : Photographie d'un patient de 18 ans atteint d'acné conglobata au niveau du visage, avant (gauche) et après (droite) six mois de traitement par isotrétinoïne à 1 mg/kg/jour (dose cumulative 144 mg/kg). Extrait de (Orfanos and Zouboulis, 1998).	57
Figure 19 : Photographie d'un patient de 18 ans atteint d'acné fulminans au niveau du dos, présentant des lésions nodulaires et nécrotiques. Extrait de (Saint-Jean <i>et al.</i> , 2015).	58
Figure 20 : Analyses de l'abondance relative des espèces bactériennes retrouvées dans les follicules pileux de patients atteints d'acné versus sujets sains (Barnard <i>et al.</i> , 2016b).	59
Figure 21 : Photographie montrant un <i>infundibulum</i> dilaté, dans lequel sont visibles des <i>Demodex</i> , prise par microscopie confocale. Extrait de (Muguet Guenot <i>et al.</i> , 2018).	60
Figure 22 : Photographie de lésions inflammatoires prurigineuses typiques observées chez deux patients atteints de dermatite atopique. Extrait de (Bieber, 2008).	61
Figure 23 : Les différentes voies menant à la sensibilisation et l'inflammation causées par <i>S. aureus</i> , extrait de (Bieber, 2008). TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin, CLA : Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen.	62
Figure 24 : Photographie d'une patiente atteinte d'un psoriasis. Extrait de (Togni <i>et al.</i> , 2014).	64
Figure 25 : Photographie d'une patiente atteinte de folliculite decalvante. Alopécie cicatricielle avec papules inflammatoires, pustules, croûtes et poils touffus. Extrait de (Wolff <i>et al.</i> , 2016).	64
Figure 26 : Photographie de la dépigmentation typique observée chez un patient atteint d'hypomélanose maculeuse progressive (Kim <i>et al.</i> , 2012).	65
Figure 27 : Exemple de vésicule extracellulaire produite par <i>C. acnes</i> , vue par microscopie électronique à transmission (Jeon <i>et al.</i> , 2017).	67
Figure 28 : Exemple de vésicule extracellulaire produite par <i>Echinostoma caproni</i> , montrée par la flèche blanche (Coakley <i>et al.</i> , 2015).	67
Figure 29 : Exemple de vésicule extracellulaire provenant du produit de sécrétion de <i>Heligmosomoides polygyrus</i> , l'échelle indique 0,5 µm. (Buck <i>et al.</i> , 2014).	68
Figure 30 : Liste des molécules que peuvent contenir les vésicules extracellulaires issues de bactéries (Kaparakis-Liaskos and Ferrero, 2015).	68

Figure 31 : Photographie d'un morceau de peau issue d'une plastie abdominale et utilisée pour les manipulations de cocultures dans ce travail de Thèse.....	78
Figure 32 : Photographie d'une plaque 24-puits contenant les explants de peau en contact avec les lysats bactériens de <i>C. acnes</i> , après incubation de 6h au cours de ce travail de Thèse.....	78
Figure 33 : Schéma des quatre étapes suivant l'incubation de l'anticorps primaire, dans le système ABC (Vector, cat. #PK-7200) utilisé dans le cadre des travaux de cette Thèse (Guide utilisateur Vector Laboratories, distribué par Clinisciences). (1) L'incubation de l'anticorps primaire ; (2) L'ajout de l'anticorps secondaire biotinylé ; (3) Formation du complexe avidine/biotine suite à l'ajout du réactif de Vectastain ; (4) Réaction enzymatique entre l'enzyme HRP et son substrat Novared, donnant lieu à un produit de dégradation chromogène, permettant la localisation des protéines d'intérêt.	81
Figure 34 : Protocole d'obtention de deux extraits de <i>C. acnes</i> , qui a été notre point de départ pour la mise au point du protocole final. Inspiré du schéma disponible dans la Thèse d'O. Isard (Isard, 2010).	85
Figure 35 : Les profils obtenus lors de l'identification des phylotypes par la méthode de PCR multiplex (Barnard <i>et al.</i> , 2015).	89
Figure 36 : Schéma représentatif des différentes étapes menées pour l'analyse de l'alpha et bêta diversité, ainsi que l'abondance relative des communautés bactériennes retrouvées dans les échantillons.....	94
Figure 37 : Résultats des premiers tests du protocole d'obtention de lysats de <i>C. acnes</i> (souche ATCC 6919).....	97
Figure 38 : (a) Concentration en protéines mesurées après protocole de création de lysats membranaires à partir d'une souche de <i>C. acnes</i> isolée chez un patient (A11) et deux souches de références (ATCC 6919 et ATCC 11827). Résultats obtenus après reprise du culot de lysats dans 5 mL ou 10 mL. Les concentrations en protéines ont été déterminées par BCA assay. (b) Photographie du culot contenant la fraction membranaire de <i>C. acnes</i> , à l'issue du protocole testé.	98
Figure 39 : Résultats de concentrations en protéines totales obtenus par méthode du BCA. Deux souches de <i>C. acnes</i> ont été utilisées : ATCC 11827 et ATCC 6919.....	99
Figure 40 : Dosage de la cytokine IL-8 dans les surnageants de culture lors du test des protocoles n°3, 4, 7, 8 et 9. Les résultats sont présentés sous la forme de ratio en prenant comme référence le contrôle négatif.....	100
Figure 41 : Photographies de lames d'IHC pratiquées sur des explants de peau après contact avec différents lysats créés avec le protocole n°7 d'obtention d'extraits membranaires de <i>C. acnes</i> . La barre d'échelle représente 300 µm.....	101
Figure 42 : Exemple de profil de migration obtenu après PCR multiplex, sur huit souches de <i>C. acnes</i>	104
Figure 43 : Détermination des phylotypes pour toutes les souches de <i>C. acnes</i> retrouvées lors de notre étude (n=68).	105

Figure 44 : Détermination des complexes clonaux pour toutes les souches de <i>C. acnes</i> retrouvées lors de notre étude (n=68).	107
Figure 45 : Détermination des types SLST pour toutes les souches de <i>C. acnes</i> retrouvées lors de notre étude (n=68).	108
Figure 46 : Algorithme de décision de la technique de typage moléculaire en fonction du niveau de caractérisation requis, extrait de (Dagnelie <i>et al.</i> , 2018b).	109
Figure 47 : Photographie d'une plaque où le biofilm bactérien vient d'être coloré avec du crystal violet, l'excès de crystal violet ayant été lavé. Chaque colonne correspond à une souche.	114
Figure 48 : Capacité de production de différentes souches de <i>Cutibacterium spp.</i> Résultats obtenus par la technique du Biofilm RingTest, après n=3 essais indépendants, la BFI étant prise après 3h et 6h d'incubation.	114
Figure 49 : Analyses métagénomiques des communautés bactériennes présentes à la surface de la peau des deux groupes inclus dans l'étude, sur le dos (droite) et le visage (gauche).	116
Figure 50 : Niveau d'expression des six marqueurs étudiés dans les lésions inflammatoires d'acné (nodule et papule), en comparaison au contrôle négatif. Le contrôle négatif était la peau non-lésionnelle biopsiée sur chaque patient et prise en tant que référence. Les résultats sont exprimés sous forme de ratio, en prenant la peau non-lésionnelle comme référence.	118
Figure 51 : Expression de six marqueurs de l'immunité innée dans la peau cliniquement saine de patient sain, comparée à de la peau cliniquement saine de patient atteint d'acné sévère. Les résultats sont exprimés soit (a) en résultats bruts, par les scores d'intensité de marquage (moyennes des deux lecteurs), soit (b) en ratio d'expression groupe acné comparé au groupe sain. Les tests statistiques ont été réalisés par l'utilisation du General Linear Model par le Dr Jean-Michel Nguyen. Niveau de significativité * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, et *** $p \leq 0.001$	120
Figure 52 : Résultats des marquages réalisés sur les explants après incubation avec IA1, II, III ou la combinaison IA1+II+III (n=3). Les scores sont donnés en fonction de l'intensité du marquage observé, par deux lecteurs indépendants. L'échelle utilisée a été publiée précédemment (Jasson <i>et al.</i> , 2013). Statistiques réalisées en utilisant le General Linear Model, en comparant les niveaux d'expression des marqueurs dans les explants après incubation des phylotypes IA1, II, ou III aux niveaux d'expressions dans les explants incubés avec la combinaison IA1+II+III. Niveau de significativité * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, et *** $p \leq 0.001$	122
Figure 53 : Photographies des IHC pratiquées sur les explants après coculture avec différentes combinaisons de sous-types de <i>C. acnes</i> pendant 6 h. La barre d'échelle représente 300 μm	123
Figure 54 : Mesures des concentrations en cytokines libérées par les explants cutanés après 6 h d'incubation avec les phylotypes de <i>C. acnes</i> IA1, II ou III, en comparaison avec la combinaison des phylotypes IA1+II+III (n = 3). (a) concentration en IL-8 (pg/mL), (b) concentration en IL-10 (pg/mL), (c) concentration en IL-6 (pg/mL), (d) concentration en IL-17 (pg/mL), (e) concentration en TGF- β (ng/ml). Ces expériences de cocultures ont été réalisées sur trois donneurs indépendants de peau saine. Niveau de significativité * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, et *** $p \leq 0.001$	124

Figure 55 : Intensité de marquage obtenue après immunohistochimie réalisée sur les explants de peau après incubation avec différentes combinaisons de phylotypes de *C. acnes* (n=3)..... 127

Introduction

L'acné est une maladie inflammatoire commune, qui atteint 85 % de la population âgée de 11 à 30 ans (Wood AJ, 1997). Cette pathologie touche les glandes pilo-sébacées dont les lésions inflammatoires apparaissent surtout sur le dos, le visage, le cou, le tronc et les bras. La gravité de l'acné diffère d'un patient à l'autre et peut être évaluée grâce à plusieurs échelles, notamment : l'échelle GEA (Global Acne Severity Scale) (Dréno *et al.*, 2011) et ECLA (Echelle de Cotations des Lésions d'Acné) (Dréno *et al.*, 1999). Trois facteurs majeurs jouent un rôle clef dans le développement de l'acné : une hyperseborrhée, des anomalies de la prolifération et de la différenciation kératinocytaires au niveau du canal infundibulaire et la colonisation de la peau par *Cutibacterium acnes* (anciennement *Propionibacterium acnes*), connue pour intervenir dans le développement et le maintien du processus inflammatoire local cutané (Dréno *et al.*, 2015; Gollnick *et al.*, 2003). Ces cinq dernières années, deux nouveaux facteurs ont commencé à être mis en évidence dans le développement de l'acné : l'activation anormale de l'immunité innée qui induit la libération de différents médiateurs de l'inflammation au niveau du follicule et du derme adjacent ; et le déséquilibre du microbiote cutané, qui conduit à la production de signaux pro-inflammatoires capables d'alerter les effecteurs immunitaires cutanés (Dréno *et al.*, 2015; Dréno *et al.*, 2016a; Gollnick and Dréno, 2015).

L'acné sévère nodulaire est caractérisée par un érythème intense, des nodules inflammatoires rouges et douloureux, des kystes et des cicatrices (Newman *et al.*, 2011). Actuellement, peu de données épidémiologiques sont disponibles dans la littérature scientifique, en particulier pour l'acné sévère du dos. En revanche, une étude récente réalisée aux Etats-Unis sur 9417 enfants âgés de 0 à 17 ans a permis de mettre en évidence une augmentation linéaire de ce type d'acné entre 11 et 17 ans (Silverberg and Silverberg, 2014). Par ailleurs, il a été décrit que l'acné sévère atteignait 18 % des patients acnéiques (Pawin *et al.*, 2007). De plus, le dos fait partie des sites extrafaciaux les plus communément affectés par cette maladie (52 %) (Vos *et al.*, 2012). Sur le plan thérapeutique, l'acné sévère a longtemps été prise en charge en première intention par des antibiotiques oraux (principalement les tétracyclines), mais il a été constaté que les patients ne répondaient pas ou rechutaient rapidement (Dréno *et al.*, 2016b; Fan *et al.*, 2015). Depuis 1982, l'isotrétinoïne *per os* est devenue le traitement de première intention pour traiter cette dermatose (Gollnick *et al.*, 2003). L'isotrétinoïne est un rétinoïde (dérivé de la vitamine A) capable d'atrophier les

glandes sébacées et ainsi de diminuer leur activité de synthèse de sébum (Melnik, 2017). Malheureusement, malgré une efficacité reconnue, l'isotrétinoïne n'est pas toujours bien tolérée par les patients, notamment en raison d'un risque important de tératogénicité, d'anomalies métaboliques, et un risque potentiel de troubles psychiatriques (Le Moigne *et al.*, 2017; Magin *et al.*, 2005; Malvasi *et al.*, 2009; Rodondi *et al.*, 2002). Ainsi, mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques menant à l'acné sévère pourrait conduire au développement de nouveaux outils thérapeutiques et constitue donc un domaine de recherche d'intérêt croissant.

Un acteur majeur et incontournable de l'acné est la bactérie *Cutibacterium acnes* (anciennement *Propionibacterium acnes*). C'est un bacille à Gram positif dont la population est divisée en six sous-types, ou « phylotypes » : IA1, IA2, IB, IC, II et III. Au vue de la littérature scientifique actuelle, il apparaît évident qu'il existe des interactions étroites entre les différents phylotypes de *C. acnes* et le système immunitaire inné cutané (Jasson *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2016), notamment *via* l'activation des Toll-Like Receptors (Jugeau *et al.*, 2005). Comme le démontrent des études récentes, cette communication entre immunité innée et *C. acnes* peut également s'effectuer par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires produites par *C. acnes* (Choi *et al.*, 2018; Jeon *et al.*, 2017).

Dans ce contexte de dermatose inflammatoire chronique multifactorielle, et au regard des éléments de littérature évoqués, il apparaît crucial de décrypter le rôle des communautés bactériennes cutanées et en particulier des sous-groupes de *C. acnes*, dans la physiopathologie de l'acné, et en particulier l'acné sévère du dos pour laquelle peu de données épidémiologiques et physiopathologiques existe (Dréno *et al.*, 2016a; Gollnick and Dréno, 2015). Egalement, le rôle de l'immunité innée dans l'apparition de cette dermatose sera étudié.

Dans un premier temps, ce travail de Thèse s'est axé autour d'une étude de caractérisation des souches de *C. acnes* retrouvées au niveau du visage et du dos de patients atteints d'acné modéré du visage, et d'acné sévère du dos, et de volontaires sains.

Dans un deuxième temps, ce travail s'est axé autour d'une question qui découlait directement de la première partie. En effet, cette première phase a mis en évidence une réduction très significative de la diversité des phylotypes de *C. acnes* sur le dos des patients atteints d'acné sévère du dos comparé aux sujets sains. Le but de cette deuxième partie était

de déterminer si cette perte de diversité des phylotypes était une cause ou une conséquence de la maladie. Pour répondre à cette question, un système *in vitro* de cocultures entre des extraits de bactéries et des explants de peau humaine saine a été mis au point.

Ce mémoire débutera par deux chapitres consacrés à une revue bibliographique en rappelant des éléments de physiologie cutanée, tant sur le plan du microbiote cutané que de ses interactions avec le système immunitaire inné de la peau. Ces deux chapitres permettront d'établir le rationnel scientifique duquel découle ce travail de Thèse et ouvrira sur une partie décrivant les objectifs de ce travail. Ensuite, une section « matériels et méthodes » permettra de faire le point sur les différentes techniques utilisées pour répondre aux objectifs fixés. Cette partie sera divisée selon les deux axes suivis depuis le début de ce projet. D'abord, nous décrirons les techniques utilisées pour l'étude immuno-dermatologique, puis nous présenterons celles utilisées pour la partie bactériologique. Un chapitre « résultats » sera ensuite abordé et divisé en deux parties principales. Dans cette section, nous présenterons les résultats de ce travail de Thèse sous la forme d'articles acceptés ou en cours de soumission, dans un ordre pertinent relatant l'avancé de ce travail. Ils seront chacun précédés d'une présentation et de quelques commentaires.

Enfin, une discussion et une conclusion générales seront réalisées et permettront de discuter l'ensemble des résultats de ce travail de Thèse. Elles permettront d'abord de discuter l'intérêt d'avoir mis au point une technique d'obtention d'extraits membranaires bactériens, au-delà de l'intérêt immédiat de répondre à une problématique rencontrée dans le cadre du travail de Thèse. Elles permettront également de discuter la perte importante de diversité des phylotypes de *C. acnes* observée en contexte d'acné sévère du dos, et les différences d'activation du système immunitaire inné entre les patients atteints d'acné sévère et les individus sains. Egalement, nous discuterons de l'impact de la diversité des phylotypes *in vitro* sur l'inflammation cutanée, et des mécanismes sous-jacents qui pourraient expliquer la baisse de l'activation du système immunitaire inné lorsque la diversité des phylotypes est restaurée. Cette dernière partie permettra de replacer ces résultats de Thèse dans leur contexte actuel et ouvrir la réflexion scientifique en suggérant de nouvelles perspectives d'études.

I. La structure de la peau et ses fonctions

A. Structure de la peau

La peau est l'organe le plus lourd du corps humain, elle pèse en moyenne 3 à 4 kg et couvre une superficie de 1,5 à 2 m² chez un jeune adulte (Peyrefitte, 1995). Son épaisseur est variable selon la zone du corps considérée : 1 mm au niveau des paupières contre 3 mm au niveau des plantes (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). La peau humaine est constituée de trois couches, de la plus superficielle à la plus profonde : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1, p.21) (Kong, 2011).

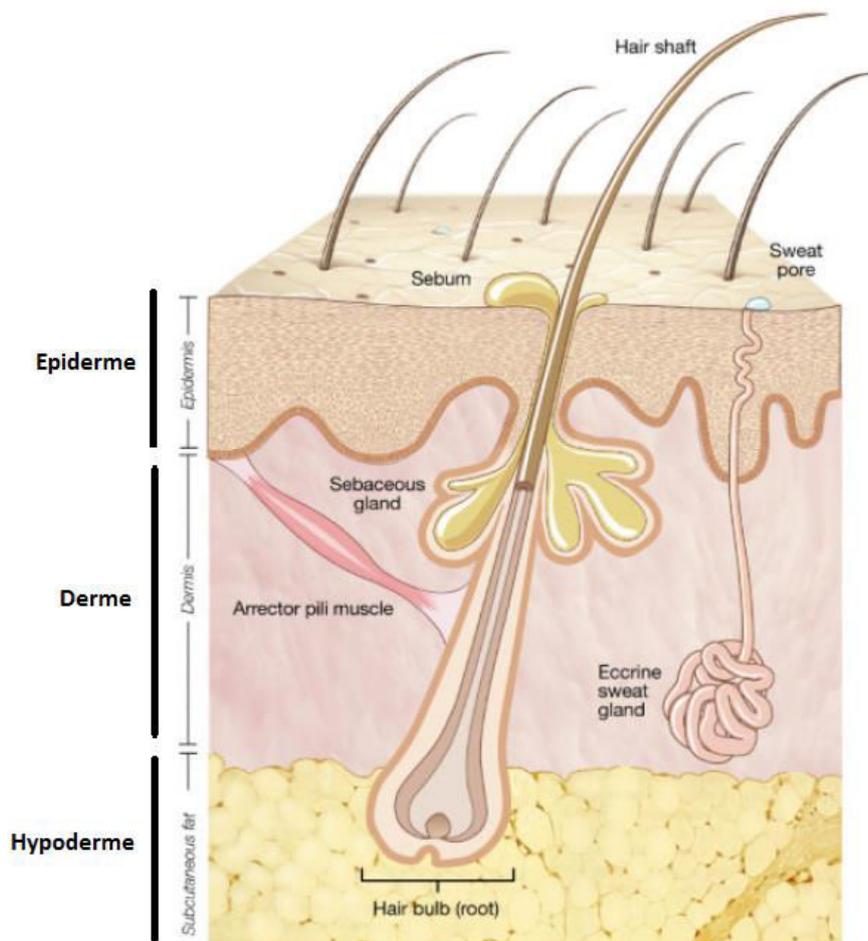


Figure 1 : Schéma représentatif de la structure globale de la peau, adapté de l'étude Kong *et al.* (Kong, 2011).

A.1 L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau, elle est en contact direct avec l'environnement extérieur. Cet épithélium est stratifié et squameux. Il est composé de quatre types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Figure 2, p.22) (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

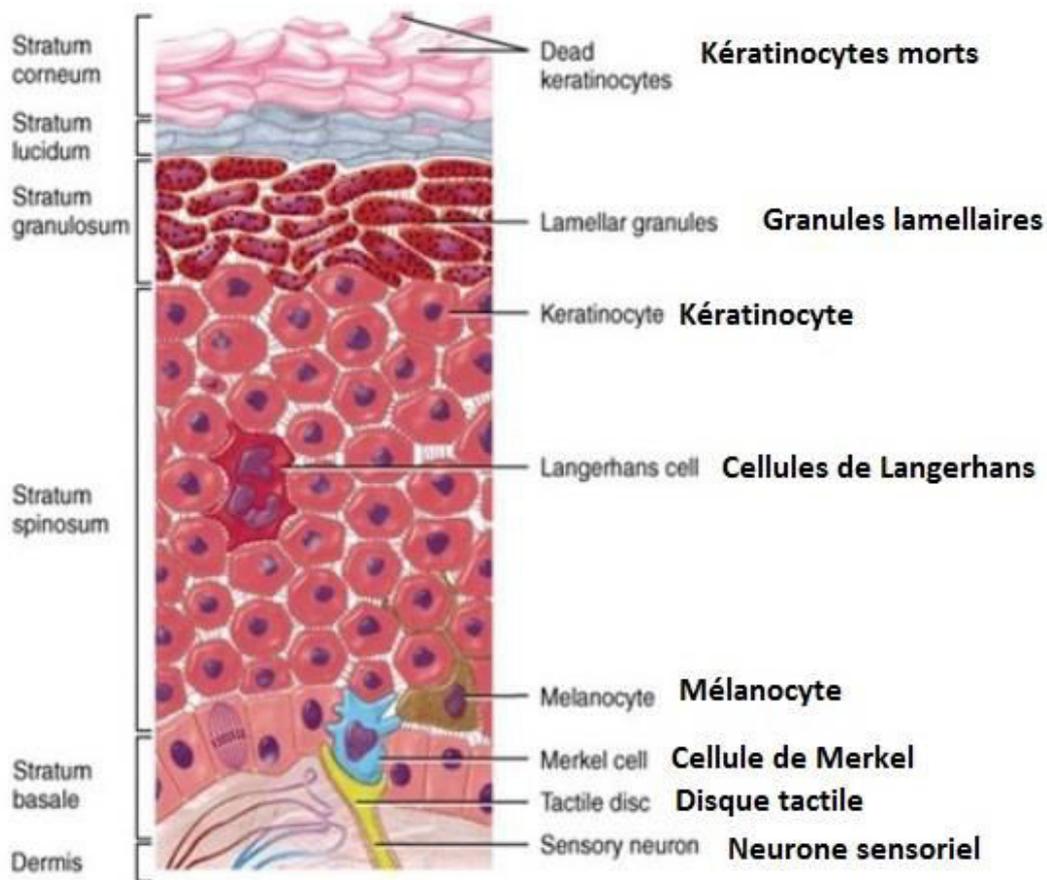


Figure 2 : Les différents types de cellules retrouvés dans la peau. Extrait et adapté de Pearson Education, Inc. 2012.

A.1.a Les kératinocytes

Les kératinocytes représentent une catégorie de cellules majoritaires au sein de l'épiderme, ils constituent 90 % des cellules de cette couche (Isard, 2010). Ils synthétisent la kératine, conférant aux cellules de l'épiderme leur propriété protectrice. Les kératinocytes

situés au niveau de la couche basale (couche la plus profonde de l'épiderme) se divisent de manière continue par mitoses puis, ils migrent vers la surface. Poussés par les nouvelles cellules, ils progressent vers la surface et s'enrichissent en kératine, puis finissent par perdre leur noyau et mourir. En surface, les kératinocytes constituant la couche cornée (couche la plus superficielle de l'épiderme) sont appelés les cornéocytes, et forment une couche squameuse de cellules mortes remplies de kératine (Isard, 2010). Chaque jour, en raison de frottements fréquents que subit la peau, des millions de ces cellules mortes desquament. Ainsi, l'épiderme se renouvelle totalement tous les 25 à 45 jours (Peyrefitte, 1995).

A.1.b *Les mélanocytes*

Les mélanocytes sont localisés dans la couche basale de l'épiderme. Ils sont spécialisés dans la synthèse d'un pigment : la mélanine. La mélanine est produite dans des organites appelés les mélanosomes. Ces cellules possèdent de nombreux prolongements cytoplasmiques, ce qui leur permet d'être en contact avec plusieurs kératinocytes. A mesure qu'elle est produite, la mélanine migre vers les prolongements des mélanocytes et elle est transférée aux kératinocytes de manière périodique. Ensuite, les granules de mélanine s'accumulent à la surface du noyau des kératinocytes qui est orienté vers le milieu extérieur. Ainsi, la mélanine constitue une protection pigmentaire efficace contre les effets dangereux des rayonnements ultraviolets sur l'ADN (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

A.1.c *Les cellules de Langerhans*

Les cellules de Langerhans ou macrophagocytes intra-épidermiques, constituent 3 à 8 % des cellules de l'épiderme. Leurs prolongements cytoplasmiques leur confèrent un aspect étoilé et s'étendent entre les kératinocytes, formant un réseau de prolongements inter-kératinocytaires. Ces cellules constituent une catégorie de cellules présentatrices d'antigènes, produites dans la moëlle osseuse, qui migrent ensuite vers l'épiderme (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

A.1.d *Les cellules de Merkel*

Les cellules de Merkel ou épithélioïdocytes du tact, sont des cellules neuro-épithéliales. Elles ont une morphologie hémisphérique et ne sont pas réparties de manière

homogène à la surface du corps. En effet, elles sont particulièrement retrouvées au niveau des lèvres, de la paume des mains, la pulpe des doigts et le dos des pieds. Chaque cellule de Merkel est reliée à la terminaison d'une neurofibre sensitive en forme de disque. Ce disque est appelé « corpuscule tactile non capsulé » ou disque de Merkel qui forme avec la cellule de Merkel, le récepteur au toucher (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

A.1.e *Les différentes couches de l'épiderme*

Nous venons de voir que l'épiderme était constitué de quatre catégories cellulaires. Par ailleurs, il est organisé en quatre à cinq couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire (uniquement dans les zones où la peau est dite « épaisse »), et la couche cornée (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

La couche basale ou « *stratum basale* »

La couche basale, aussi appelée « *stratum basale* », « *stratum germinativum* » ou encore couche germinative, est fixée au derme *via* la jonction dermo-épidermique et constitue la couche la plus profonde de l'épiderme (Figure 2, p.22). Elle est constituée d'une seule strate de cellules de forme cylindrique et disposées en palissade (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Dix à 25 % des cellules de cette couche sont des mélanocytes qui étendent leurs prolongements jusqu'aux cellules de la couche du dessus (couche épineuse). Des cellules de Merkel sont également retrouvées dans la couche basale (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

La couche épineuse ou « *stratum spinosum* »

La couche épineuse contient plusieurs strates de kératinocytes qui sont de forme polygonale et reliés entre eux par des desmosomes (Figure 2, p.22). Des cellules de Langerhans sont également retrouvées dans la couche épineuse (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

La couche granuleuse ou « *stratum granulosum* »

La couche granuleuse contient trois à cinq strates de cellules (Figure 2, p.22). Au sein de ces strates, les kératinocytes poursuivent leur migration vers la surface en se différenciant. Ils s'aplatissent au fur et à mesure de cette progression, leurs noyaux et organites commencent à se dégrader. Par ailleurs, ces kératinocytes accumulent des granules de kératohyaline et des

granules lamellées contenant des glycolipides (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). La kératohyaline est connue pour favoriser l'accumulation de kératine dans la couche supérieure. Enfin, les glycolipides sécrétés dans l'espace extracellulaire permettent d'imperméabiliser et de limiter la déperdition d'eau (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

La couche claire ou « *stratum lucidum* »

La couche claire n'est retrouvée que dans les zones du corps où la peau est dite « épaisse ». Ces zones sont situées au niveau des paumes de mains et des plantes de pieds. Cette couche est constituée de plusieurs strates de kératinocytes clairs, aplatis et morts (Figure 2, p.22) (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

La couche cornée ou « *stratum corneum* »

La couche cornée est la couche la plus superficielle de l'épiderme, en contact direct avec l'environnement extérieur. Elle est formée par 20 à 30 strates de cellules mortes superposées (Figure 2, p.22). Les cellules qui composent cette couche sont dites « cornées » ou kératinisées de par leur constitution exclusive par des fibrilles de kératine (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

A.2 Le derme

Le derme a une fonction de tissu de soutien et est situé en-dessous de l'épiderme (Figure 1, p.21). Il est constitué de tissu conjonctif aux propriétés de résistance et de flexibilité (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Le derme est principalement constitué de fibroblastes, macrophagocytes, et anecdotiquement de mastocytes et globules blancs. La matrice du derme est formée d'une grande quantité de collagène, élastine, et réticuline qui assurent les propriétés de soutien du derme pour la couche qu'il supporte (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Par ailleurs, de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques mais aussi neurofibres traversent cette couche de la peau. Les annexes de la peau y sont également implantées. Deux zones sont retrouvées dans le derme : la zone papillaire et la zone réticulaire (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

A.2.a *La zone papillaire du derme*

La zone papillaire du derme est la partie supérieure du derme qui est en contact direct avec l'épiderme. C'est une couche de tissu conjonctif mince, lâche, et formée de fibres de collagène et fibronectine enchevêtrées permettant le passage des différents vaisseaux et neurofibres. La partie supérieure de cette zone contient des projections appelées « papilles dermiques », qui sont pourvues de bouquets capillaires, de terminaisons nerveuses libres impliquées dans la perception de la douleur, ainsi que des récepteurs du toucher (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

A.2.b *La zone réticulaire du derme*

La zone réticulaire du derme est la partie la plus profonde et occupe 80 % du derme. Elle est formée de tissu conjonctif dense, qui renferme des faisceaux de fibres de collagène conférant à la peau ses propriétés de résistance et d'élasticité. De plus, ces fibres de collagène fixent l'eau et sont donc impliquées dans l'hydratation de la peau (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

A.3 L'hypoderme

L'hypoderme, également appelé tissu sous-cutané, est constitué de tissu conjonctif lâche et adipeux. Le rôle de l'hypoderme est d'assurer la liaison entre la peau et les structures sous-jacentes, en particulier les muscles. L'hypoderme joue également un rôle important de protection contre les chocs mécaniques, grâce à sa composition principalement grasseuse (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Enfin, l'hypoderme est un réservoir énergétique ainsi qu'un isolant thermique importants (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

A.4 Les annexes cutanées

A.4.a *Les glandes sébacées et les follicules pileux*

Les glandes sébacées sont des glandes exocrines présentes sur tout le corps humain excepté les paumes et les plantes (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Ce sont des glandes

holocrines, ce qui veut dire que la sécrétion s'effectue par le détachement et la mort des cellules qui contiennent les produits de sécrétion. Elles sont responsables de la sécrétion du sébum, constitué de lipides et de débris cellulaires issus de la mort des cellules glandulaires (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Le rôle du sébum est d'assouplir et de lubrifier les poils ainsi que la surface de la peau, et de limiter les pertes d'eau. La production de sébum par les glandes sébacées est stimulée par les androgènes, en particulier au moment de la puberté. La taille et le nombre de ces glandes varient d'une zone à l'autre du corps. Avec le canal excréteur et le muscle érecteur de poil, les glandes sébacées constituent les follicules pilo-sébacés (ou follicules pileux) (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Ces follicules sont présents de la surface de l'épiderme jusqu'au derme et peuvent s'enfoncer jusqu'à l'hypoderme, notamment au niveau du cuir chevelu. Le nombre de follicules pileux varie d'un site à l'autre du corps. Aussi, 292 follicules pileux par cm² sont retrouvés en moyenne sur le front, alors que seul une trentaine par cm² sont présents sur la partie supérieure du dos (Otberg *et al.*, 2004). Au niveau histologique, la paroi du follicule pilo-sébacé est constituée, à l'extérieur, d'une gaine de tissu conjonctif dérivée du derme et, à l'intérieur, d'une gaine de tissu épithélial résultant d'une invagination de l'épiderme. Le bulbe pileux est la zone dans laquelle la matrice du poil est retrouvée et où sont produites, par mitose, des cellules qui accumulent de la kératine et ainsi permettent l'allongement de la tige du poil (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). La kératine composant la majeure partie du poil est dite « dure », elle est différente de celle composant l'épiderme, qui est dite « molle ».

A.4.b *Les glandes sudoripares*

Les glandes sudoripares sont retrouvées sur tout le corps humain, excepté les mamelons et certaines zones des organes génitaux externes (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Deux types de glandes sudoripares existent : les glandes sudoripares eccrines (ou mérocrines), et les glandes sudoripares apocrines (Figure 3, p.28). Les glandes sudoripares eccrines représentent la majorité des glandes sudoripares. Chacune d'elles est une glande simple en forme de tube spiralé, avec une partie sécrétrice située dans le derme et son canal excréteur donnant sur un pore à la surface de l'épiderme. Ces glandes sécrètent la sueur, qui est un filtrat hypotonique issu du sang. A l'inverse, les glandes sudoripares apocrines sont situées dans les régions axillaires et ano-génito-périnéale. Elles sont plus grosses que les glandes

eccrines et leur canal excréteur débouche dans un follicule pileux. La composition des sécrétions des glandes apocrines est proche de celles des glandes eccrines, avec en plus des lipides et des protéines (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Leur fonctionnement débute à la puberté. D'autres exemples de glandes sudoripares sont intéressants à noter : les glandes cérumineuses (sudoripares apocrines), à l'origine de la sécrétion de cérumen au niveau des oreilles (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Enfin, les glandes mammaires qui sont des glandes sudoripares spécialisées dans la production et la sécrétion du lait maternel.

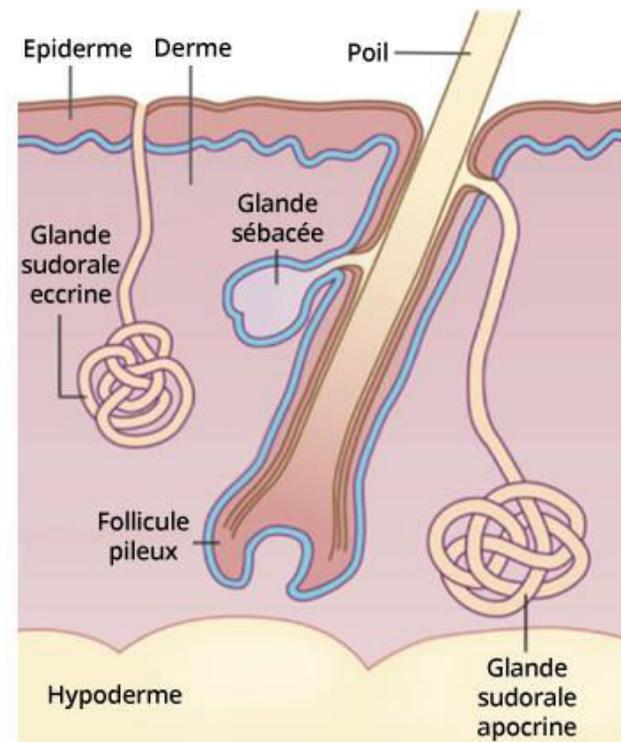


Figure 3 : Schéma représentatif des différentes glandes retrouvées dans la peau humaine. Extrait de www.sfdermato.org.

A.4.c Les ongles

Les ongles sont des modifications écailleuses de l'épiderme. Cette structure kératinisée forme une couverture de protection lisse et translucide qui protège les extrémités des doigts (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

B. Les six fonctions de la peau

La peau et les annexes cutanées ont de nombreuses fonctions impliquées dans le maintien de l'homéostasie de notre organisme. La peau est souvent décrite comme étant la première barrière face aux agressions constantes de notre environnement : mécanique, chimique, mais aussi biologique (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

B.1 Fonction de protection

L'effet de barrière mécanique est possible grâce aux cellules kératinisées de l'épiderme, très résistantes à l'abrasion. Ainsi, la composition des différentes strates de la peau, et notamment la couche graisseuse, en font une protection efficace des structures internes contre les chocs mécaniques. Enfin, la mélanine permet également de protéger la peau des rayonnements ultraviolets dangereux pour l'ADN (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

L'effet de barrière chimique est possible grâce aux sécrétions de la peau et à ses caractéristiques physico-chimiques. En effet, le faible pH du film liquide acide sécrété par la peau, et les substances bactéricides contenues dans le sébum, font de la peau une barrière efficace contre les micro-organismes exogènes. La desquamation perpétuelle ayant lieu au niveau de la couche cornée permet aussi d'éliminer les micro-organismes adhérents, et la sécheresse relative de la peau ralentit le développement microbien (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

Enfin, l'effet de barrière biologique est possible grâce d'une part, au système immunitaire inné représenté par différents effecteurs au niveau de la peau et, d'autre part, à la flore bactérienne « commensale », qui occupe cette niche écologique depuis la colonisation de la peau au cours des premières années de vie (Dominguez-Bello *et al.*, 2010). Les cellules épithéliales sont à l'interface entre la peau et l'environnement extérieur, et représentent la première ligne de défense du système immunitaire inné (Braff and Gallo, 2006). Elles sont porteuses d'une variété importante de structures de détection, comme les Toll-Like Receptors (TLRs) (Trinchieri and Sher, 2007), les lectines de type C, et des protéines de reconnaissance des peptidoglycanes (McGirt and Beck, 2006; Mogensen, 2009). Ces dernières années, au moins dix types de TLRs ont été décrits chez l'Homme, et sont connus pour interagir avec des

épitopes de la paroi cellulaire des bactéries, des fungi, ou des structures virales, ainsi qu'à d'autres structures microbiennes appelés les PAMPS (Pathogen-associated molecular patterns) (Mogensen, 2009). L'activation des cellules épithéliales réalisée par l'intermédiaire des TLRs induit une production de défensines (β -défensines) et de cathélicidines, qui font partie de la famille des peptides antimicrobiens (Braff and Gallo, 2006). La peau produit de la cathélicidine LL-37, des β -défensines (1, 2 et 3) et de la dermicidine (Braff and Gallo, 2006; Mogensen, 2009). D'autres cellules de la peau opèrent une veille immunitaire afin d'assurer la protection de la peau contre les micro-organismes pathogènes, telles que les macrophagocytes intra-épidermiques. Au niveau microbiologique, c'est par l'occupation de cette niche spécifique, que la flore commensale protège la peau des agents pathogènes, qui ne prennent l'avantage qu'en cas de « dysbiose », c'est-à-dire en présence d'un déséquilibre de la flore cutanée, phénomène retrouvé dans plusieurs troubles cutanés comme le psoriasis, la dermatite atopique, ou encore l'hypomélanose maculeuse progressive (Abeck and Mempel, 1998; Barnard *et al.*, 2016a; Salava *et al.*, 2017).

B.2 Fonction de thermo-régulation

La peau assure l'évacuation de la chaleur sous deux formes : dans l'air, par la perspiration, et par évaporation de la sueur à sa surface (transpiration) (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

B.3 Fonction de réception sensorielle

La peau contient une multitude de récepteurs sensoriels qui permettent d'appréhender l'environnement extérieur grâce au sens du toucher (Figure 4, p.31). D'une région à l'autre du corps, le nombre de ces récepteurs varie. Les récepteurs sensoriels cutanés ont pour rôle de capter les stimuli et d'assurer leur transfert jusqu'au cerveau sous la forme d'influx nerveux (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Ils peuvent prendre la forme de terminaisons nerveuses libres, qui pour certaines sont associées aux cellules de Merkel et se prolongent jusqu'à l'épiderme. Ils peuvent aussi prendre la forme de terminaisons nerveuses encapsulées, comme les corpuscules de Meissner, de Pacini, ou de Ruffini (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

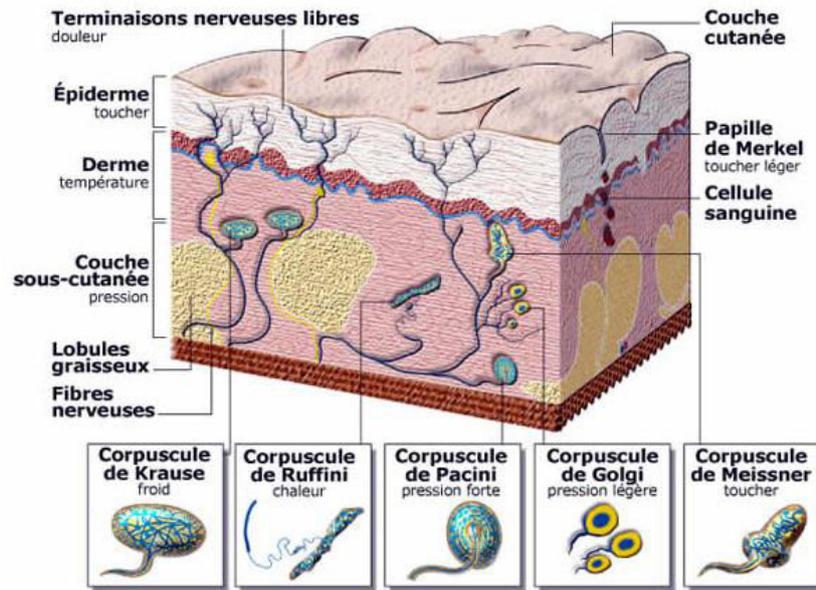


Figure 4 : Schéma des récepteurs de la peau (Idé pour I-marginal / CNRS).

Les corpuscules de Meissner sont situés directement sous l'épiderme et sont particulièrement retrouvés sur la face palmaire des doigts. Ils sont impliqués dans la perception des frôlements et de la vitesse du stimulus (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Les corpuscules de Ruffini, localisés dans le derme et les articulations, sont sensibles aux vibrations et à l'étirement de la peau et des tendons, ainsi qu'à la chaleur. Les corpuscules de Pacini sont quant à eux, des mécanorécepteurs retrouvés dans le derme profond et l'hypoderme. Ils sont impliqués dans la perception des variations rapides d'intensité de déformation. Enfin, les cellules de Merkel répondent à des pressions d'intensité faible et très localisées, et les terminaisons libres des fibres nerveuses perçoivent la douleur et permettent d'envoyer des signaux d'alarmes en cas de dommages cutanés (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995). Les corpuscules de Krause sont impliqués dans la perception du froid, et les corpuscules de Golgi sont quant à eux, impliqués dans la perception des pressions légères (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

B.4 Fonction métabolique

La peau a un rôle métabolique, notamment car elle synthétise une multitude de molécules (hormones, enzymes, protéines...) qui jouent un rôle au niveau local. Ainsi, dans la

peau débute la synthèse de la vitamine D, impliquée dans l'absorption du calcium et du phosphore et, par conséquent, dans la minéralisation des os (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

B.5 Fonction de réservoir de sang

Chez l'Homme, la peau est capable de contenir jusqu'à 5 % de la volémie totale. Lors de besoins spécifiques, le système nerveux provoque une vaso-constriction des vaisseaux situés dans le derme afin que le sang qu'ils contiennent soit réparti dans les autres vaisseaux de la circulation sanguine (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

B.6 Fonction d'excrétion

De par le fonctionnement des glandes sudoripares eccrines, le corps est capable d'éliminer des déchets azotés, notamment de l'ammoniac, de l'urée, et de l'acide urique. Mais ce phénomène reste anecdotique, en effet, la majeure partie des déchets azotés est excrétée par voie urinaire (Isard, 2010; Peyrefitte, 1995).

Points de synthèse

- La peau est l'organe le plus lourd du corps, elle pèse de 3 à 4 kg selon les individus.
- La peau humaine est constituée de trois couches, de la plus superficielle à la plus profonde : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.
- Les cellules constituant la peau sont nombreuses, mais 80 % d'entre elles sont des kératinocytes. Elle contient également des cellules immunitaires lui permettant d'assurer une réponse immunitaire immédiate en cas d'agression par un pathogène exogène.
- La peau assure six fonctions : protection, thermo-régulation du corps, réceptions cutanées, métabolique, réservoir sanguin et excrétion des déchets.

II. Le microbiote cutané et l'immunité innée de la peau

A. Microbiote cutané et niches écologiques

A.1 Généralités

Un article récent a mis en évidence que nous étions constitués de 39 000 milliards de micro-organismes (Sender *et al.*, 2016). En somme, nous comportons autant de cellules qui nous sont propres, que de micro-organismes (Sender *et al.*, 2016). Il apparaît donc évident que des dialogues existent entre les différentes flores (Figure 5, p.34) (intestinale, cutanée, buccale etc) et les cellules qui forment nos tissus et organes, notamment pour éviter des réactions inflammatoires inappropriées en réponse à des bactéries « commensales ». Concernant la peau, deux types de flores existent : l'une est dite « commensale » et l'autre est dite « transitoire ».

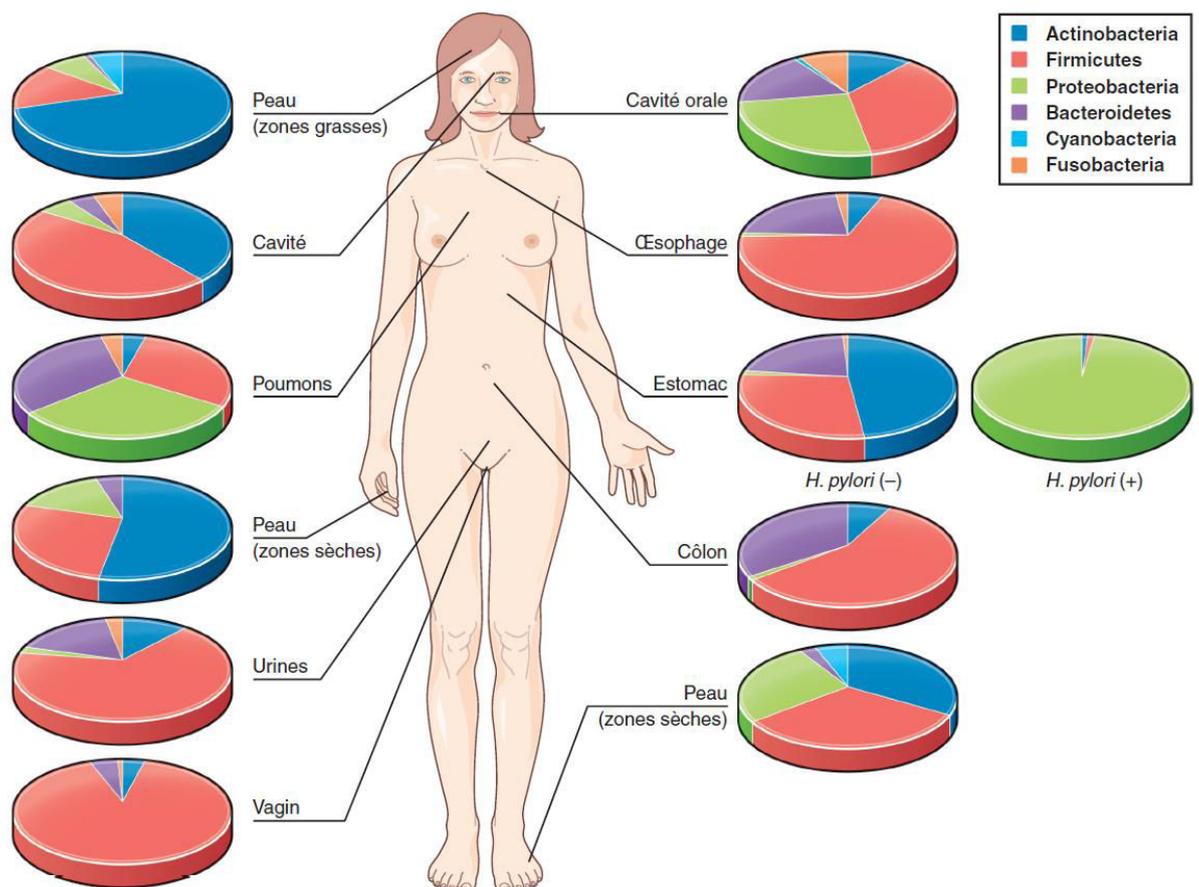


Figure 5 : Diversité bactérienne du microbiote humain selon le site anatomique. Chaque part de camembert représente l'abondance relative de chacun des six phyla principaux. Extrait de (Cattoir, 2016).

Au sein de la peau, différentes « niches écologiques » sont retrouvées, c'est-à-dire des zones cutanées où les paramètres physico-chimiques sont plus favorables au développement de certaines bactéries que d'autres. L'exemple typique est celui de la bactérie *C. acnes*, en effet, étant anaérobie aéro-tolérante et capable de métaboliser les lipides du sébum en acides gras libres, elle est plus particulièrement retrouvée au niveau des glandes sébacées et de l'*infundibulum* de l'unité pilosébacée. Ainsi, le microbiote cutané est constitué de différentes bactéries commensales, toutes retrouvées dans des niches écologiques qui leur sont propres et qui permettent leur persistance dans un milieu avec des paramètres physico-chimiques particuliers (Grice *et al.*, 2009).

Lorsque nous parlons de microbiote cutané, il est important de clarifier la notion de « microbiote » et de « microbiome », car il existe un abus de langage entre ces deux termes. L'ensemble des communautés microbiennes (bactéries, virus, champignons, protozoaires...) présent au niveau d'un environnement défini constitue le « microbiote » (Cattoir, 2016). Quant à lui, le microbiome correspond à l'étude de l'ensemble des génomes des micro-organismes présents, ainsi que leurs interactions avec l'environnement (Cattoir, 2016). Les définitions de ces deux notions sont détaillées dans les parties ci-après.

A.2 La notion de microbiote

L'étude du microbiote a longtemps été réalisée par la culture des échantillons, l'identification et la caractérisation des micro-organismes présents en culture (Figure 6, p.36). Néanmoins, il apparaît que la majorité des bactéries ne sont pas cultivables, par exemple, environ 80 % des bactéries du microbiote intestinal ne sont pas cultivables dans les conditions standards de laboratoire (Cattoir, 2016). A la lumière de ces données, la culture apparaît donc inadaptée pour l'étude du microbiote, bien que l'utilisation optimisée d'un panel de conditions de culture puisse permettre la détection de nombreuses bactéries à priori non cultivables. Cette approche, dénommée « culturomique », correspond à cette diversification de conditions de culture combinée à l'identification de chaque colonie isolée par MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) (Cattoir, 2016).

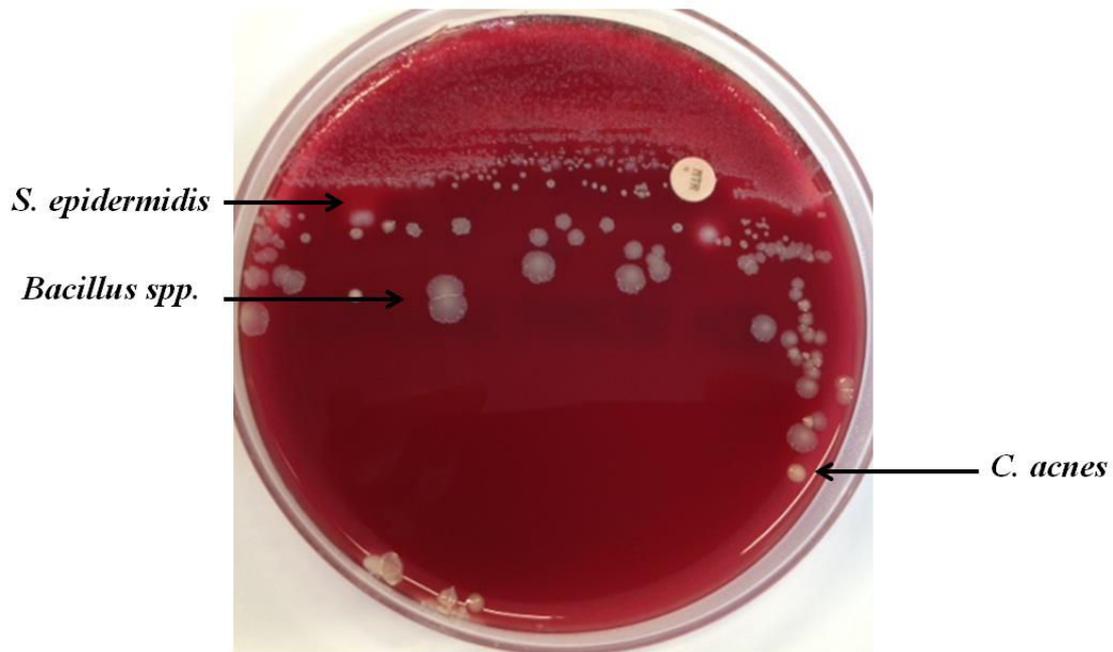


Figure 6 : Aperçu de gélose ensemencée à partir d'un écouvillonnage, réalisé sur la peau d'un patient atteint d'acné sévère du dos (dos). A 5 jours, la culture permet ici la visualisation de *C. acnes*, *S. epidermidis* et *Bacillus spp.* Photographie prise par le Dr S. Corvec.

Avec l'avènement des techniques moléculaires et du séquençage à haut débit, d'autres méthodes ont été développées pour visualiser la diversité bactérienne d'un microbiote, appelée métataxonomie (Cattoir, 2016). Cette technique est basée sur l'amplification, le séquençage et l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S qui est un marqueur bactérien universel (Cattoir, 2016; Marchesi and Ravel, 2015). Un biais important de cette méthode est sa sensibilité. Ce biais est parfaitement illustré dans les études menées sur le microbiote intestinal, qui contient environ 10^{12} bactéries par gramme de selles (Cattoir, 2016). En effet dans ce cas précis, l'analyse métagénomique n'est pas capable de détecter des bactéries présentes à une concentration inférieure à 10^5 par gramme (Cattoir, 2016). Une autre limite non négligeable de cette méthode est l'impossibilité de distinguer les bactéries viables et non viables, ce qui suggère l'intérêt de réaliser une culture des échantillons en parallèle de ces analyses moléculaires.

A.3 Les notions de microbiome et de métagénome

Le microbiome regroupe l'analyse de l'ensemble des gènes (génomés) du microbiote, mais également les produits du microbiote et de l'environnement hôte (Cattoir, 2016; Marchesi and Ravel, 2015; Whiteside *et al.*, 2015). Il est devenu possible de déterminer l'ensemble des génomes et des gènes d'un microbiote en réalisant le séquençage de l'ADN total extrait à partir d'un échantillon, et la comparaison à une base de données. Il s'agit de la « métagénomique », c'est-à-dire l'étude des métagénomés. La méthode shotgun permet cette visualisation métagénomique (Byrd *et al.*, 2018) (Figure 7, p.37). Enfin, l'analyse dynamique des profils d'expression des gènes au sein d'un microbiome est appelée métatranscriptomique, tandis qu'au niveau protéique cela correspond à la méthode de métaprotéomique (Cattoir, 2016).

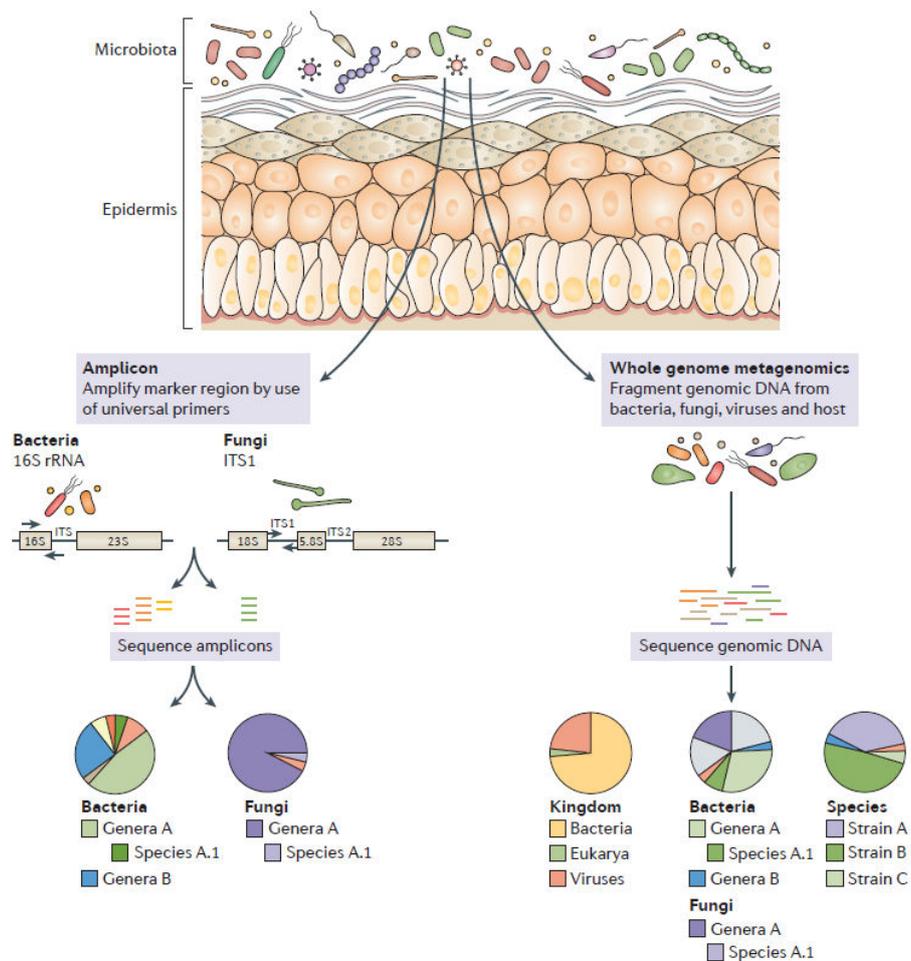


Figure 7 : Technique de visualisation des communautés bactériennes cutanées. L'amplification de gènes cibles (à gauche) *versus* le séquençage métagénomique shotgun (à droite). Extrait de (Byrd *et al.*, 2018).

A.4 Différentes espèces pour différentes localisations

En fonction de la localisation du corps, les paramètres physico-chimiques peuvent varier. Par exemple, la valeur du pH cutané est différente au niveau du visage et au niveau des pieds ou des mains.

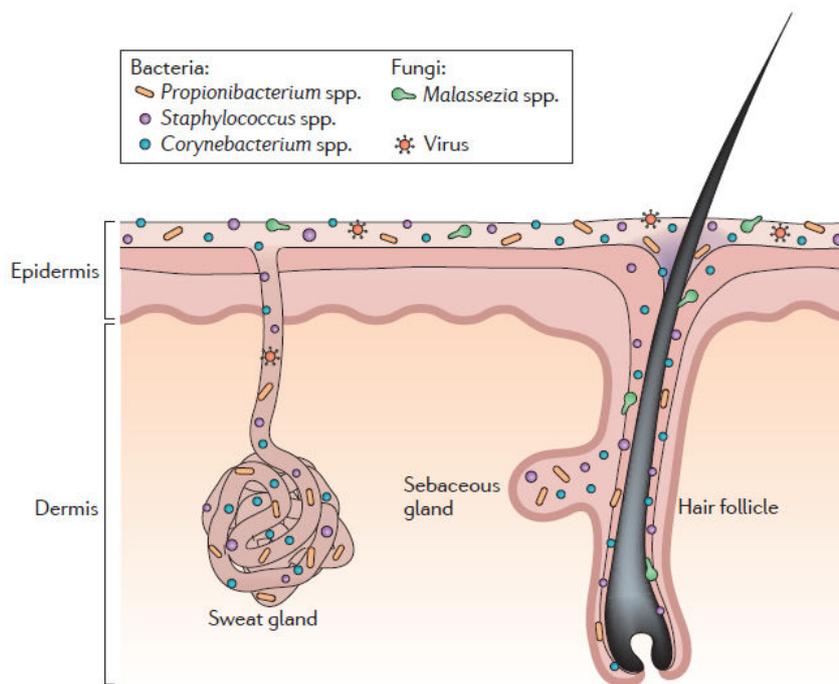


Figure 8 : Schéma représentatif d'une coupe histologique avec les localisations des différents micro-organismes dans les couches de la peau et les annexes cutanées, extrait de (Byrd *et al.*, 2018).

De même, le taux d'humidité est également variable en fonction du site, par exemple entre les aisselles et la paume des mains. Plusieurs zones sont définies : humides (creux comme aisselles), sèches (dos des mains), grasses (zone T du visage) (Byrd *et al.*, 2018). Le nombre de follicules pilosébacés est également différent d'une zone à l'autre du corps, en fonction de la topologie de l'écosystème cutané analysé (Otberg *et al.*, 2004). Par conséquent, l'ensemble de ces paramètres conduit à des spécificités de flore cutanée, en fonction de la localisation sur le corps (Figure 8, p.38).

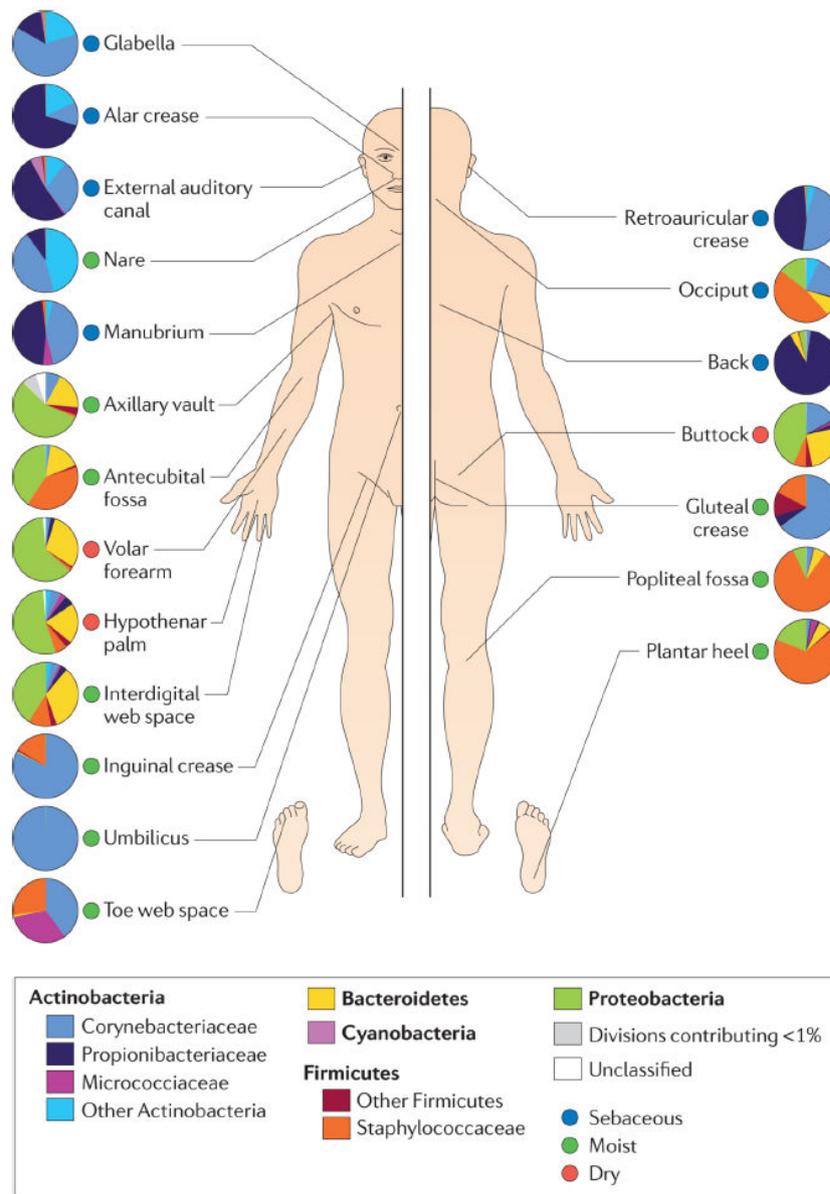


Figure 9 : Répartition des différentes bactéries retrouvées à la surface de la peau, en fonction des zones du corps. Extrait de (Grice and Segre, 2011).

Certaines zones seront plus facilement colonisées par certaines espèces, plus aptes à se maintenir dans des conditions physico-chimiques qui leurs sont favorables (Figure 9, p.39). Par exemple, *C. acnes* est plus particulièrement retrouvé dans les zones riches en sébum car il est capable de métaboliser ses différents lipides en acides gras libres pour produire de l'énergie (Unno *et al.*, 2017; Zouboulis, 2009). De même, *Cutibacterium avidum* est plus

spécifiquement retrouvée dans les zones humides du corps, notamment au niveau des aisselles (Nordstrom and Noble, 1984).

Une autre variable importante de la localisation est constituée par la profondeur cutanée, qu'il faut prendre en compte et intégrée (Figure 8, p.38). En effet, la flore cutanée varie en fonction de la profondeur considérée : surface de la peau, *infundibulum* pilosébacée, derme, intérieur des glandes sudoripares... Plusieurs raisons expliquent ces variations, notamment l'humidité et la concentration en sébum qui diffèrent de la surface de la peau aux couches inférieures. Par exemple, des variations considérables de concentration en oxygène sont observées de la surface de la peau à l'intérieur du follicule pilosébacé (Grice *et al.*, 2009). Or, certaines bactéries démontrent une croissance en aérobiose : *S. epidermidis* ou *C. avidum*. En revanche, d'autres bactéries ont une croissance préférentielle en anaérobiose mais sont tolérantes à de faibles concentrations d'oxygène, comme *C. acnes*. C'est pour cette raison que certaines bactéries seront plus fréquemment retrouvées au sein des couches inférieures de la peau, au niveau du follicule pilosébacé (*C. acnes*). Les conséquences de ces spécificités sont directes sur les modalités de prélèvement et le type d'échantillonnage choisi pour la réalisation d'une étude du microbiote cutané (Figure 10, p.41) (Grice *et al.*, 2008; Omer *et al.*, 2017). Cette question se pose beaucoup moins pour les autres microbiotes, notamment le microbiote intestinal qui a été l'un des premiers et des mieux caractérisés du corps humain. Pour le microbiote intestinal, il s'agit la plupart du temps de récupérer des selles, ou bien de réaliser un écouvillonnage rectal des individus analysés. Pour une étude de l'écosystème cutané, quel qu'il soit, la problématique est un peu plus complexe car elle nécessite de bien clarifier la question scientifique en amont afin de choisir la bonne technique d'échantillonnage. En effet, plusieurs techniques existent et ne donnent pas une visualisation identique de la composition du microbiote cutané (Figure 10, p.41) (Grice *et al.*, 2008).

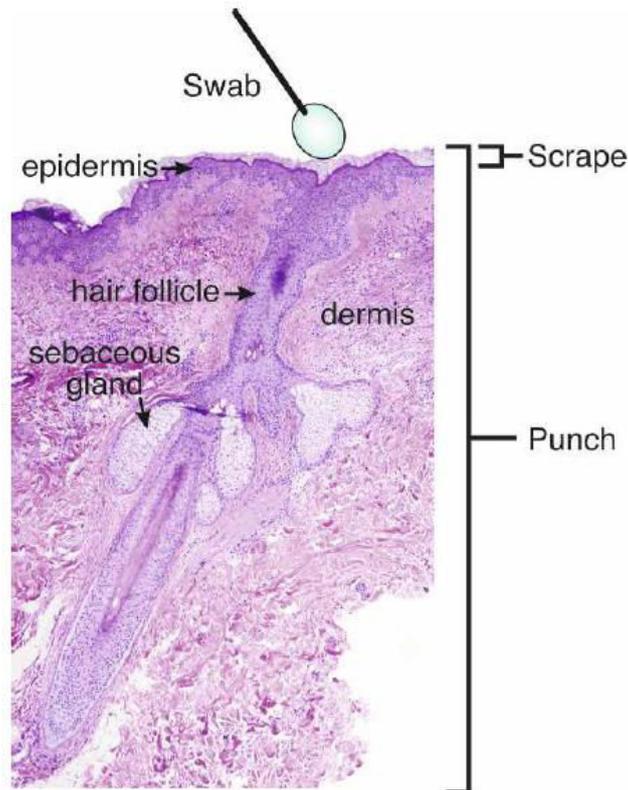


Figure 10 : Vue d'ensemble des différentes couches de la peau, et des différentes possibilités d'échantillonnages pour récupérer la flore cutanée. Extrait de (Grice *et al.*, 2008).

A.5 Les techniques d'échantillonnage du microbiote cutané

A.5.a La technique de l'écouvillonnage

Elle permet de prélever des bactéries se trouvant à la surface de la peau. Cette technique est utilisée depuis plus de 10 ans au CHU de Nantes pour les prélèvements de bactéries de surface. L'écouvillon (COPAN, cat. #COP-ETP) est frotté sur la peau pendant un temps standardisé (45 sec) et déchargé dans 1 mL de BHI. Cette technique permet d'avoir une visualisation de la flore bactérienne de surface de la peau (Figure 8, p.38 et Figure 10, p.41). Notons que depuis peu, en raison de modifications de pratiques professionnelles au sein du service de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière du CHU de Nantes, notamment la mise en place d'une chaîne d'automatisation, les écouvillons COPAN classiques (COPAN, cat. #COP-ETP) ont été remplacés par des e-swabs utilisés avec 1 mL de liquide de transport Amies (COPAN, cat. #LQ AMIES) à partir de Mars 2018 (Figure 11, p.42).

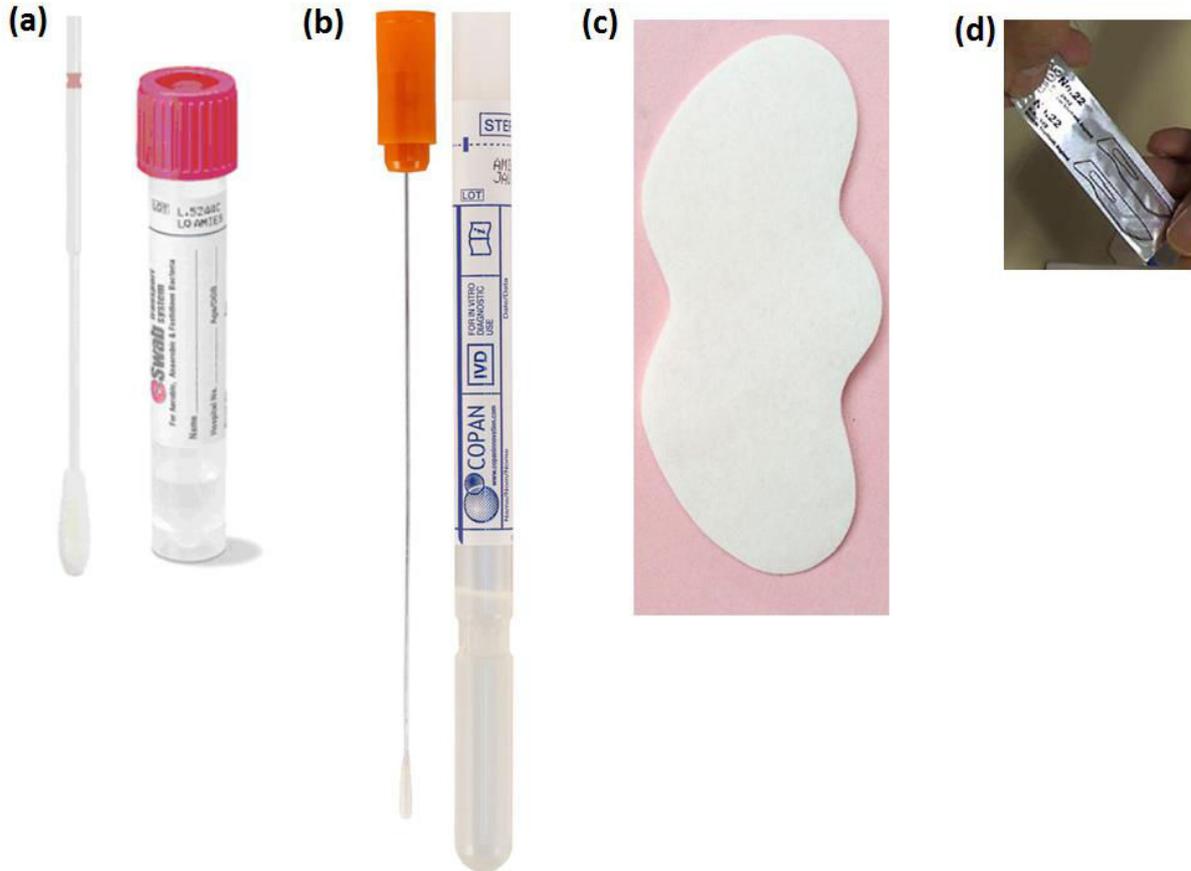


Figure 11 : Les trois techniques d'échantillonnages : (a) un e-swab ; (b) un écouvillon COPAN classique ; (c) un strip ; (d) une lame de scalpel utilisée pour la technique du « scrape ».

A.5.b La technique du strip

Elle permet d'avoir accès à la flore présente en surface mais également à l'intérieur de l'unité pilosébacée principalement. En effet, une fois collé sur la peau, le strip préalablement humidifié va sécher et être arraché, ce qui délogera l'intérieur de l'*infundibulum*, qui restera collé au niveau du strip et pourra être récupéré pour l'analyse des bactéries (Figure 8, p.38 et Figure 11, p.42). Cette méthodologie permet l'accès à un niveau d'information différent concernant les communautés bactériennes observées par rapport à la technique précédente. Ainsi, il est possible d'analyser les communautés présentes dans les couches supérieures et inférieures de la peau.

A.5.c La technique du « scrape »

La technique du « scrape » consiste à gratter la surface de la peau à l'aide d'un scalpel. Ce geste est non-invasif et ne laisse pas de cicatrice. Cette technique permet la collecte de cellules épidermiques et les microbes associés, mais concerne essentiellement la surface de la peau (Figure 10, p.41).

A.5.d La technique de la biopsie

La récupération de bactérie par cette technique, paraît être la plus exhaustive. En effet, elle permet de recouvrir les bactéries présentes à la surface, mais également celles présentes dans les couches inférieures de la peau (Figure 8, p.38 et Figure 10, p.41). Egalement, cette technique permet la récupération d'un nombre beaucoup plus important de bactérie, ce qui est un point clé pour les étapes qui suivent l'échantillonnage (extraction d'ADN...). Par exemple, la technique du swab permet de récupérer environ 10 000 bactéries par cm^2 , celle du « scrape » permet de récupérer 50 000 bactéries par cm^2 , alors que la biopsie permet de récupérer environ 1 000 000 bactéries par cm^2 (Grice *et al.*, 2008). Néanmoins, plusieurs limites peuvent être évoquées à l'utilisation de cette technique. Elle constitue une méthode plus invasive et s'avère impossible éthiquement pour certaines zones sensibles et affichantes (comme le visage). De plus, les bactéries de surface peuvent avoir été éliminées en raison de l'antisepsie pré-opératoire de la zone prélevée et des zones adjacentes, communément réalisée à l'aide de chlorhexidine aqueuse (0,2 %), ce qui induit une perte relative d'informations (Nakase *et al.*, 2018).

Points de synthèse

- La différence entre les notions de « microbiome » et « microbiote » peut être source de confusions.
- Le microbiote correspond à une partie des communautés microbiennes présentes dans un environnement donné, identifiées par culture et/ou par amplification d'une seule séquence spécifique (ARNr 16S pour les bactéries, ITS1 pour les champignons).
- Le microbiome analyse les gènes et les génomes du microbiote, et également les produits du microbiote et de l'environnement hôte.
- Il existe différentes couches cutanées, portant toutes des niches écologiques particulières où résident des micro-organismes différents.
- Pour échantillonner ces différentes zones de la peau, plusieurs techniques existent et ne donnent pas accès aux mêmes niveaux d'informations, principalement : l'écouvillonnage, le strip, le « scrape » et la biopsie.

B. Le microbiote cutané

Le microbiote cutané est constitué de plusieurs micro-organismes dont des bactéries. Plusieurs de ces bactéries, commensales ou non, sont connues pour être impliquées dans l'apparition, la persistance, voire l'aggravation de certaines dermatoses inflammatoires (Abeck and Mempel, 1998; Lomholt and Kilian, 2010; Yamazaki *et al.*, 2017). C'est le cas de *Staphylococcus aureus* dans la dermatite atopique (Abeck and Mempel, 1998), mais aussi de *C. acnes* dans l'acné (Lomholt and Kilian, 2010).

B.1 Présentation et taxonomie de *C. acnes*

Le bacille *Cutibacterium acnes* a été isolé pour la première fois en 1909 par Orla-Jensen. Il fait partie de la flore commensale humaine cutanée. Historiquement, *C. acnes* a été isolé à partir d'un patient souffrant d'une dermatose chronique appelée « *acne vulgaris* » (Orla-Jensen, 1909). A la suite de cette description, la taxonomie des *ex-Propionibacterium* a subi d'importantes modifications qui ont conduit à des changements d'appellations successifs. En effet, *C. acnes* a été classé parmi les espèces de *Bacillus* puis parmi celles des *Corynebacterium* (Cummins and Johnson, 1974; Gilchrist, 1900). Plus tard, Douglas et Gunter ont démontré en 1946, que cette espèce bactérienne était en réalité plus proche du genre *Propionibacterium* en raison de leur capacité à produire de l'acide propionique en fermentant le lactose, sous atmosphère anaérobie (Achermann *et al.*, 2014; Douglas and Gunter, 1946). *Cutibacterium acnes* a depuis longtemps été associé à l'une des plus communes dermatoses, l'acné (Aubin *et al.*, 2014; Paugam *et al.*, 2017). Plus récemment, il a également été associé à d'autres types de maladie de peau comme l'hypomélanose maculeuse progressive (Barnard *et al.*, 2016a; Petersen *et al.*, 2017), et les folliculites du cuir chevelu (Frenard *et al.*, 2018). Plus globalement, *C. acnes* a également été décrit dans des tissus issus de cancer de la prostate (Mak *et al.*, 2013), de sarcoïdose (de Brouwer *et al.*, 2015), et d'infections ostéo-articulaires suite à des poses de prothèses (Aubin *et al.*, 2017a).

Enfin, *Propionibacterium acnes* a récemment changé de nom et s'appelle désormais *Cutibacterium acnes*, après un remaniement taxonomique suite aux travaux de l'équipe de Scholz *et al.* (Scholz and Kilian, 2016).

B.2 Typage et phylogénie de *C. acnes*

Depuis une quinzaine d'année, la description des sous-types de *C. acnes* a été réalisée par plusieurs équipes à travers le monde (Barnard *et al.*, 2015a; Lomholt and Kilian, 2010; McDowell *et al.*, 2005, 2008; Scholz *et al.*, 2014). Actuellement, trois niveaux de caractérisation moléculaire co-existent pour réaliser le typage moléculaire de *C. acnes* (Figure 12, p.46) :

- Le phylotype (avec six types majeurs) ;
- Le complexe clonal (déterminé par la technique du Multi-Locus Sequence Typing, ou MLST) ;
- Le type SLST (déterminé par la technique du Single-Locus Sequence Typing, ou SLST).

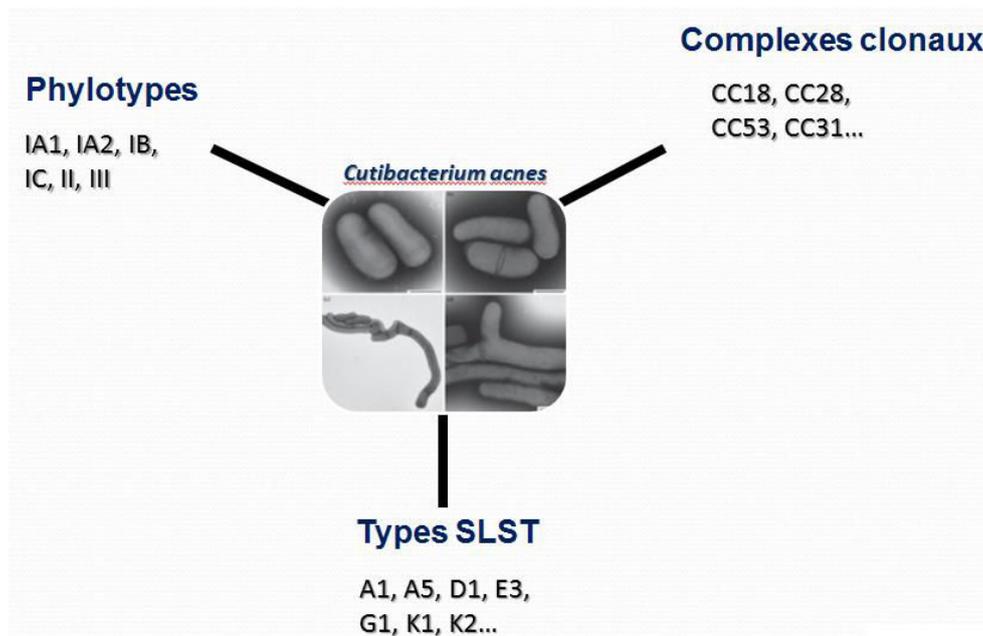


Figure 12 : Représentation schématique des trois niveaux de caractérisation existant actuellement pour le typage moléculaire de *C. acnes*. Photographie centrale extraite de (Dekio *et al.*, 2015).

Présentation des phylotypes de C. acnes

Le premier niveau de caractérisation concerne l'identification du phylotype des souches de *C. acnes*. Au cours de la dernière décennie, plusieurs propositions ont été réalisées par différentes équipes internationales :

- trois grands groupes phylogénétiques : IA, IB et II (McDowell *et al.*, 2005; Valanne *et al.*, 2005) ;
- puis en quatre groupes : IA, IB, II et III (McDowell *et al.*, 2008) ;
- puis en cinq groupes : IA, IB, IC, II et III (McDowell *et al.*, 2012a) ;
- et enfin en six groupes phylogénétiques : IA1, IA2, IB, IC, II et III (McDowell *et al.*, 2012b).

Ainsi, actuellement, les phylotypes de *C. acnes* sont au nombre de six : IA1, IA2, IB, IC, II et III (McDowell *et al.*, 2012b). En 2015, il a été proposé que ces phylotypes définissent des sous-espèces de *C. acnes*. Aussi, sur la base notamment de différences morphologiques, les souches de *C. acnes* appartenant au phylotypes I et II correspondaient à *C. acnes* subsp. *acnes*, et celles appartenant au phylotype III correspondaient à *C. acnes* subsp. *elongatum* (Dekio *et al.*, 2015). Plus récemment, en 2016, McDowell *et al.* ont proposé de renommer les phylotypes I et II, en *Cutibacterium acnes* subsp. *acnes* et *Cutibacterium acnes* subsp. *defendens* respectivement (McDowell *et al.*, 2016). Ces auteurs défendent cette nouvelle taxonomie sur la base de différences phylogénétiques, mais aussi sur un pourcentage d'hybridation ADN-ADN inférieur à 80 % entre les deux types.

Présentation des complexes clonaux (CC) de C. acnes

Le deuxième niveau de caractérisation est basé sur l'identification du complexe clonal (CC) ou des Séquences Types (ST) des souches considérées. Elle est réalisée par la technique de Multi-Locus Sequence Typing (MLST). Cette méthode de typage moléculaire est apparue en 1998 pour *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998). Elle permet de regrouper les sous-types d'une bactérie dans des complexes clonaux (CC), afin d'établir plus aisément des corrélations entre ces derniers et certaines maladies ou certaines épidémies (Lomholt and Kilian, 2010). A noter qu'un complexe clonal est sous-divisé en plusieurs « Sequence Types » (ST) (Figure 13, p.48).

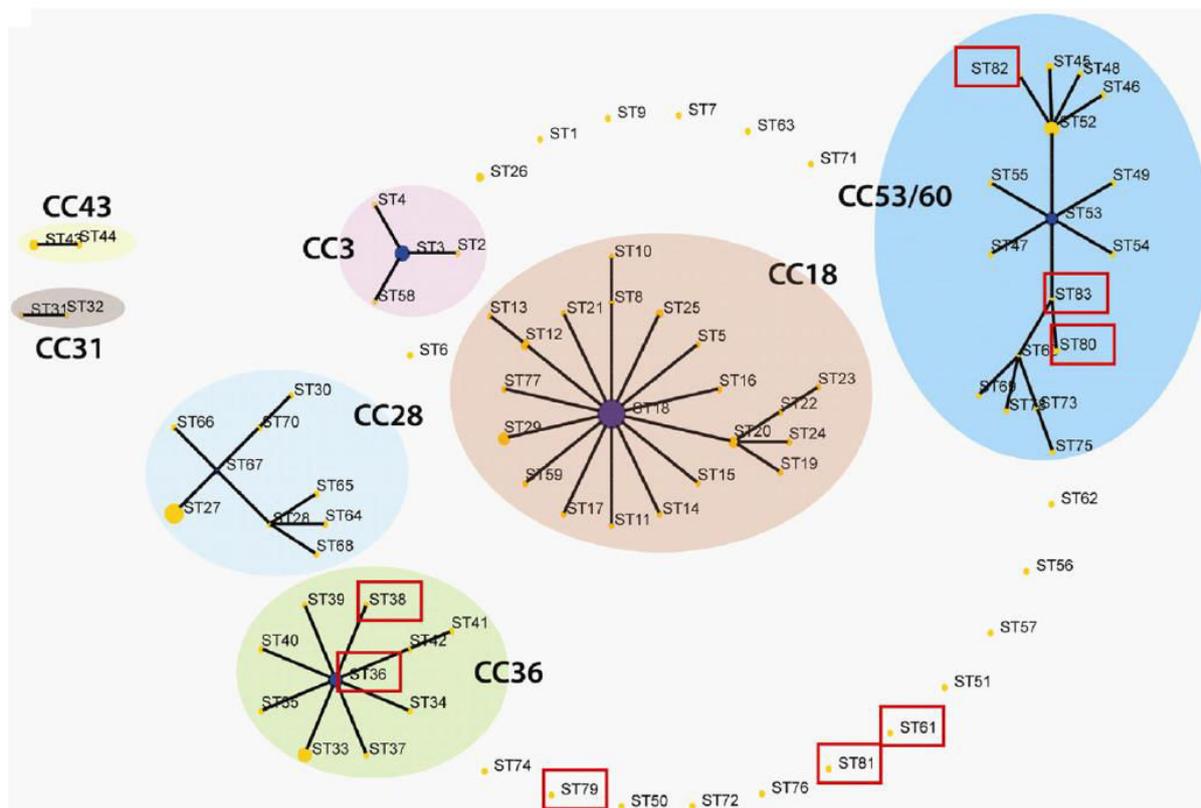


Figure 13 : Aperçu des grands clones circulants au sein de la population de *C. acnes*. Analyses eBURST réalisées d'après le schéma MLST d'Aarhus (voir ci-après). Les souches dérivées de prostatectomie sont associées avec les ST encadrés en rouge. Extrait de (Mak *et al.*, 2013).

Actuellement, plusieurs études ont décrit la fréquence de différents complexes clonaux en association avec un panel de diverses maladies. Par exemple, Mak *et al.* ont décrit un lien entre le cancer de la prostate et une prédominance du CC53/60 et CC53 (Figure 13, p.48) (Mak *et al.*, 2013). Sur le plan cutané, nous pouvons évoquer le lien entre le CC18 et l'acné, décrit selon plusieurs études (Lomholt and Kilian, 2010; Lomholt *et al.*, 2017).

C'est notamment grâce à cette méthode qu'il est possible d'établir un arbre phylogénétique, illustrant les distances génétiques existantes entre chaque souche. Elle est basée sur l'identification des allèles pour chaque gène étudié (sept, huit, ou neuf gènes suivant le schéma MLST choisi). Dans l'ordre chronologique de leur description, les différents allèles de chaque gènes ont été numérotés (1, 2, 3...), et en fonction de la combinaison finale, nous obtenons le profil allélique de la souche considérée. Ainsi, il est possible de déterminer à quel complexe clonal appartient la souche considérée. Plusieurs schémas MLST, tous basés sur un

nombre différent de gènes, ont été proposés par différentes équipes ces dernières années. Le premier schéma MLST existant était basé sur l'analyse et le séquençage partiel de neuf gènes. Il a été mis au point en 2010 (Lomholt and Kilian, 2010). Ce schéma, aussi appelé "schéma d'Aarhus", a été le premier décrit pour *C. acnes*. La base de données consultable sur le site <http://www.mlst.net/> répertorie tous les complexes clonaux connus à ce jour (143 décrits le 07/05/2018, dernière consultation).

A la suite de la description de ce schéma MLST, McDowell *et al.* a également publié un schéma MLST, basé sur l'analyse de sept gènes, un an plus tard (McDowell *et al.*, 2011). Cet article a également donné lieu à une base de données publique, consultable sur le site internet <https://pubmlst.org/pacnes/> et répertorie actuellement 138 ST (dernière consultation le 07/05/2018). Ce schéma basé sur l'analyse de sept gènes est appelé « schéma de Belfast ».

Seul le gène *recA* (la recombinaise A) est commun aux deux schémas décrits. Un article datant de 2011 décrit une comparaison très bien documentée entre ces deux schémas, et a montré que le schéma d'Aarhus est le plus discriminant (Kilian *et al.*, 2011). En effet, dans le schéma d'Aarhus, les séquences génétiques ciblées sont situées tout autour du génome bactérien, avec une distribution équilibrée des cibles. A l'inverse, dans le schéma de Belfast, les séquences ciblées sont concentrées sur une moitié du génome bactérien (Figure 14, p.49) (Kilian *et al.*, 2011).

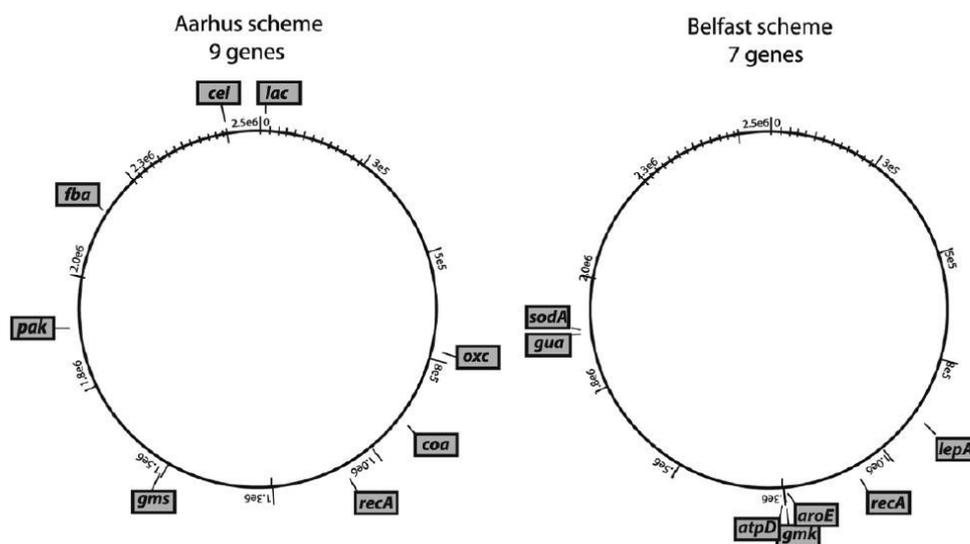


Figure 14 : Répartition des gènes utilisés pour le typage moléculaire selon le schéma d'Aarhus (MLST9, le gène *zno* ne figurant pas dans le schéma présenté) ou le schéma de Belfast (MLST7). Extrait de (Kilian *et al.*, 2011).

Pour augmenter le pouvoir discriminant de son schéma MLST, McDowell *et al.* ont proposé un nouveau schéma MLST basé sur leur précédente proposition, mais avec l'analyse de huit séquences cibles au lieu de sept (McDowell *et al.*, 2012b). Afin de gagner en temps et réduire le coût, la même équipe a développé un schéma MLST réduit, basé uniquement sur l'analyse de quatre gènes, en conservant le même pouvoir discriminant que celui décrit en 2012 (McDowell *et al.*, 2013). En revanche, suite à la première description de ce schéma en 2013, aucune étude clinique n'a étudié la phylogénie et le type de souche de *C. acnes* à l'aide de cette technique. Le pouvoir discriminant de ce schéma n'a donc pas été validé dans la littérature scientifique.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé le schéma d'Aarhus, basé sur le séquençage partiel de neuf gènes de ménage, comprenant un total de 4287 nucléotides.

Présentation des types SLST de C. acnes

La technique de détermination du type SLST a été développée en 2014 par Scholz *et al.* (Scholz *et al.*, 2014). Cette méthode de typage moléculaire est basée sur l'analyse d'un locus unique du génome de *C. acnes*. La portion d'ADN amplifiée permet l'identification du type SLST auquel appartient la souche considérée (A1, A5 etc). Les séquences de référence pour l'alignement et les amorces sont décrites dans l'interface en ligne disponible sur le site <http://medbac.dk/slst/pacnes>. Cette technique étant récente, peu d'articles décrivent actuellement les types SLST retrouvés sur la peau. En 2017, deux études pionnières ont décrit les types SLST de *C. acnes* isolés à partir d'échantillons provenant de patients atteints d'acné modéré à sévère (Nakase *et al.*, 2018; Paugam *et al.*, 2017).

B.3 *Staphylococcus epidermidis*

L'historique de découverte des staphylocoques est caractérisé, comme pour tous les genres bactériens, par de nombreuses reclassifications et changement de noms successifs des espèces. Historiquement, des chirurgiens tels que Billroth, rendant compte de *Coccobacteria septica* en 1874 (Billroth, 1874), et Ogston, qui a ensuite proposé le terme *Staphylococcus* en 1882 (Ogston, 1882), ont été les premiers à relier la présence de staphylocoques avec des infections de plaies (Billroth, 1874; Ogston, 1880, 1882). En 1884, Rosenbach FJ. démontre

leur potentiel pathogène notamment par des cultures et des expériences *in vivo*, récupérant différents micro-organismes à partir d'abcès. Ceux-ci ont été nommés "*Staphylococcus pyogenes aureus*" et "*Staphylococcus pyogenes albus*" (Rosenbach, 1884). Ce n'est qu'en 1891 que le pathologiste Welch WH. décrit *Staphylococcus epidermidis albus*, actuel *S. epidermidis*, comme un résident constant de l'épiderme humain, également retrouvé dans les plaies aseptiques (Welch, 1891). *Staphylococcus epidermidis* appartient au genre staphylocoque et a donc une morphologie en cocci. C'est une bactérie à Gram positif qui se développe principalement en aérobiose. Un schéma MLST existe également pour *S. epidermidis* et a permis de mettre en évidence l'existence de sous-groupes et ainsi les relier à certaines maladies ou certaines épidémies (Mendes *et al.*, 2012). *Staphylococcus epidermidis* est connu pour être très couramment retrouvé à la surface de la peau, et est considéré tout comme *C. acnes*, soit comme une bactérie commensale de la flore cutanée normale humaine, soit comme un contaminant de certains prélèvements (Grice *et al.*, 2008).

Points de synthèse

- *Cutibacterium acnes* et *S. epidermidis* sont deux entités majeures de la flore commensale cutanée humaine.
- *Cutibacterium acnes* peut être sous-divisé en six grands phylotypes connus à ce jour : IA1, IA2, IB, IC, II, et III.
- Deux autres niveaux de caractérisation moléculaire existent concernant *C. acnes*, il s'agit des complexes clonaux et des types SLST.
- Plusieurs complexes clonaux sont contenus dans un phylotype de *C. acnes* (IA1 : CC18, CC28...), et plusieurs types SLST sont contenus dans un complexe clonal (CC18 : A1, A5...).

C. Immunité innée de la peau saine

C.1 Les acteurs de l'immunité innée cutanée

La peau est à l'interface entre le milieu interne de notre organisme et l'environnement extérieur. En contact direct avec cet environnement, elle se trouve constamment agressée par des pathogènes microbiens exogènes (Braff and Gallo, 2006; Eyerich *et al.*, 2018). Aujourd'hui, il est admis que l'un des rôle majeur de la peau est de défendre le corps en assurant une réponse immunitaire innée en cas de blessures et ou d'agressions microbiennes (Dréno *et al.*, 2016a; Pasparakis *et al.*, 2014). Cette barrière immunitaire comprend une réponse innée qui est immédiate, ainsi qu'une réponse adaptative qui met plusieurs jours à s'installer (Cavaillon, 2010).

La présence d'un agent pathogène au niveau de l'épiderme va induire l'activation des PRRs (Pattern Recognition Receptors), qui sont des récepteurs de l'immunité immédiate incluant les TLRs (Eyerich *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2011; Pasparakis *et al.*, 2014). Cette voie de signalisation va induire la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et conduire au recrutement d'effecteurs au niveau du site d'infection, comme des macrophages et des cellules dendritiques (Eyerich *et al.*, 2018; Pasparakis *et al.*, 2014). L'intervention de ces médiateurs pourra également survenir dans le transport d'antigènes au niveau des organes lymphoïdes secondaires afin d'être présentés à des lymphocytes T et ainsi mettre en place une réponse immunitaire adaptative.

Dans ce travail de Thèse, c'est le système immunitaire inné que nous avons plus particulièrement étudié. Le système immunitaire inné cutané est constitué d'effecteurs résidents ou recrutés au niveau de la peau (Figure 16, p.54 et Figure 17, p.54). Ces effecteurs expriment à leurs surfaces des récepteurs spécifiques aux PAMPs, se sont les PRRs (de Koning *et al.*, 2010). Ils sont classifiés en quatre grandes familles (Figure 15, p.53) (de Koning *et al.*, 2010; Mogensen, 2009) :

- les TLRs (Toll-Like Receptors),
- les CLR (C-type Lectin Receptors),

- les NLRs (Nucleotide Oligomerisation Receptors),
- les RLRs (RIG-1 like Receptors).

Les PRRs permettent aux cellules de l'immunité innée de réaliser une veille contre les agents pathogènes (de Koning *et al.*, 2010; Mogensen, 2009). Ces différents récepteurs sont plus ou moins spécifiques de certaines classes de pathogènes microbiens. Aussi, les TLR-2 et TLR-4 semblent être plus spécifiquement impliqués dans la reconnaissance des bactéries (Figure 15, p.53) (Mogensen, 2009).

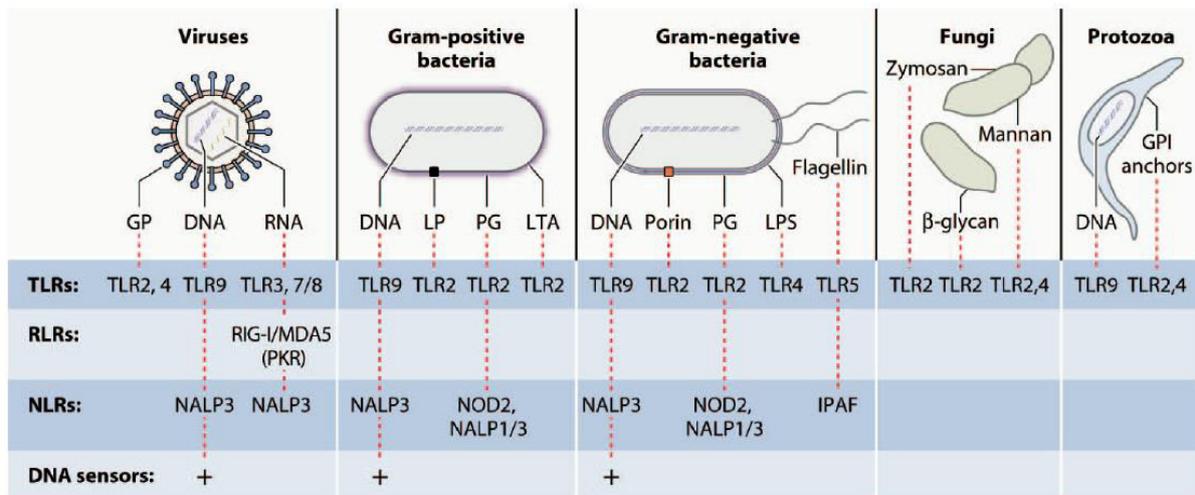


Figure 15 : Reconnaissance des PAMPs provenant de différentes classes de pathogènes microbiens. Extrait de (Mogensen, 2009). Glycoproteins : GP ; LipoProteins : LP ; PeptidoGlycanes : PG ; LipoTeichoic Acid : LTA ; LipoPolySaccharides : LPS ; GlycosylPhosphatidylInositol : GPI ; NACHT, LRR and PYD domains-containing Protein 3 : NALP3 ; Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2 : NOD2 ; Ice Protease-Activating Factor : IPAF ; Retinoic acid-Inducible Gene I : RIG-I ; MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated gene 5 ; PKR : Protein Kinase R.

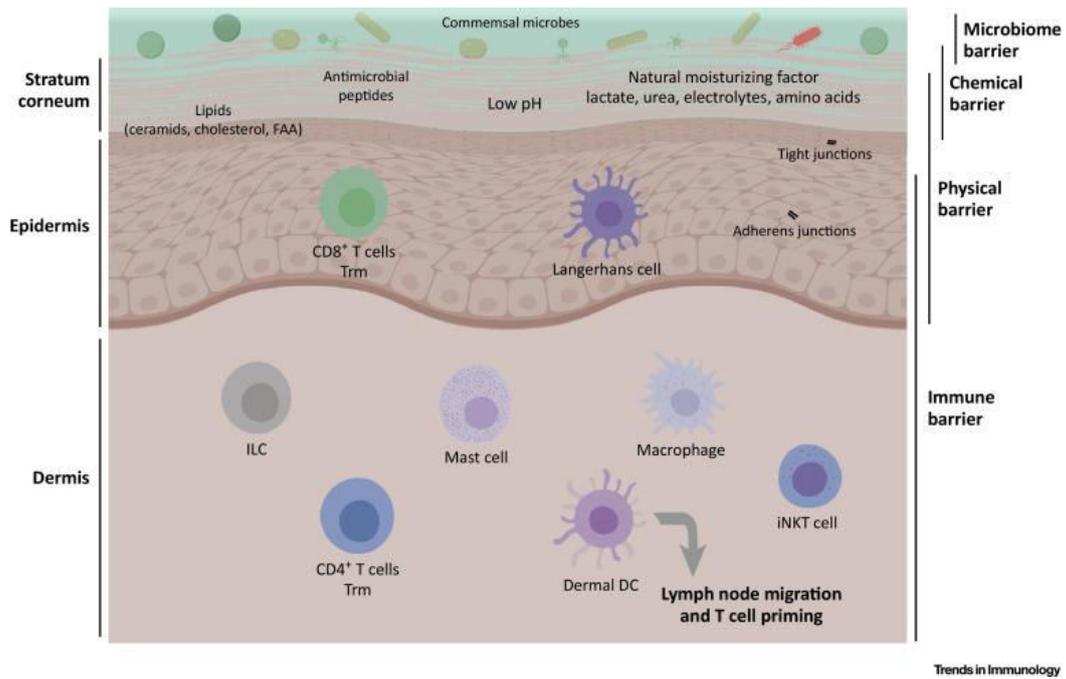


Figure 16 : Les différents niveaux et composants de la barrière cutanée. FAA : acides gras libres; ILC : cellule lymphoïde innée; iNKT : cellule tueuse naturelle invariante; Trm : cellule de mémoire résidant dans le tissu. Extrait de (Eyerich *et al.*, 2018).

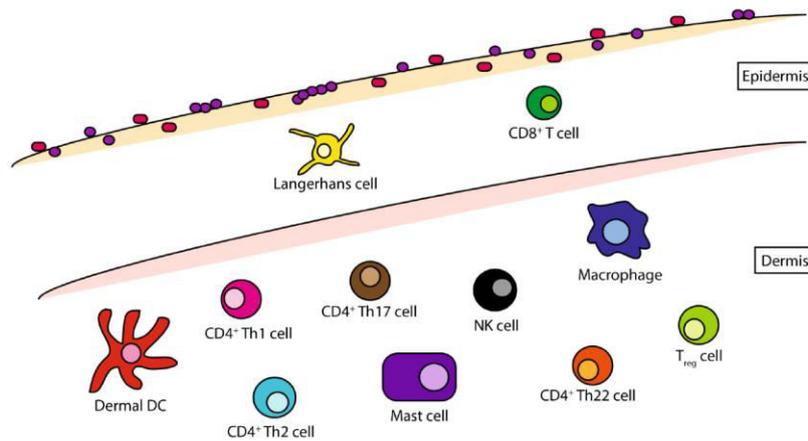


Figure 17 : Représentation schématique de toutes les cellules immunitaires innées et adaptatives de la peau. Extrait de (SanMiguel and Grice, 2015).

Comme décrit par SanMiguel et Grice en 2015, l'épiderme contient principalement des cellules dendritiques de Langerhans et des lymphocytes T CD8+ pour constituer sa veille immunitaire (Figure 17, p.54) (Eyerich *et al.*, 2018; SanMiguel and Grice, 2015). Le derme abrite une population plus variée de cellules immunitaires comme des cellules dendritiques, des cellules Natural Killer (NK), des mastocytes, ainsi que des cellules adaptatives CD4+

Th1, Th2, Th17 et Th22 (Figure 17, p.54) (SanMiguel and Grice, 2015). Ces cellules immunitaires mais aussi les kératinocytes, synthétisent un panel de divers petits peptides présentant une activité antimicrobienne à large spectre contre les bactéries, les champignons et les virus (Braff and Gallo, 2006; Clausen *et al.*, 2018; Gröne, 2002). Ces peptides antimicrobiens agissent également comme effecteurs immunitaires à plusieurs niveaux en stimulant la production de cytokines et de chimiokines, l'angiogenèse et la cicatrisation (Braff and Gallo, 2006; Chronnell *et al.*, 2001; Clausen *et al.*, 2018; Gröne, 2002). Les cathélicidines et les défensines constituent deux familles majeures de peptides antimicrobiens dérivés de la peau, bien que de nombreux autres aient été décrits (Braff and Gallo, 2006). Ces molécules de défense particulières incarnent un nouvel espoir notamment face aux phénomènes d'antibiorésistance grandissants (Fernández and Hancock, 2012).

C.2 Rôle de *C. acnes* dans l'activation de l'immunité innée cutanée

Le rôle de *C. acnes* dans l'activation du système immunitaire inné cutané est maintenant bien documenté. En effet, de nombreuses études ont décrit son potentiel inflammatoire. En 2005, Jugeau *et al.* ont démontré que *C. acnes* était capable d'induire l'expression des Toll-Like Receptors dans un modèle de kératinocytes *in vitro* (Jugeau *et al.*, 2005). Plus spécifiquement, l'expression des TLR-2 et TLR-4 a été observée après incubation de kératinocytes primaires avec des extraits membranaires de *C. acnes* (Jugeau *et al.*, 2005). La même année, Nagy *et al.* ont démontré que différentes souches de *C. acnes* induisaient de manière sélective l'expression de la β -défensine-2 et de l'IL-8, dans un modèle de kératinocytes cultivés *in vitro* (Nagy *et al.*, 2005). *Cutibacterium acnes* est également connu pour stimuler la production d'IL-1 α par les kératinocytes, conduisant à l'augmentation de leur prolifération et potentiellement à la formation du microcomédon (Guy *et al.*, 1996). Dans le cadre de l'acné, l'activation de l'immunité innée par *C. acnes* repose essentiellement sur les TLR-2 et TLR-4, qui jouent un rôle central dans la réponse inflammatoire. En effet, ils permettent la translocation du facteur de transcription NF- κ B et l'induction puis le maintien de la phase inflammatoire. Néanmoins, le maintien de cette phase inflammatoire nécessiterait l'activation conjointe du TLR-9 (Kalis *et al.*, 2005).

Plus récemment, plusieurs études ont démontré que différents sous-groupes de *C. acnes* étaient capable d'induire des réponses immunitaires différentes dans des modèles *in vitro* (Jasson *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2016).

Points de synthèse

- La peau est à l'interface entre le milieu interne de notre organisme et l'environnement extérieur et constitue ainsi notre première ligne de défense face aux pathogènes exogènes.
- Une veille immunitaire est opérée au niveau de la peau par des cellules immunitaires, principalement les lymphocytes CD8+ ainsi que les cellules de Langerhans.
- Cette veille immunitaire garantie une réponse immédiate en cas d'infection par un pathogène, notamment grâce à des récepteurs de l'immunité innée classés en quatre familles : les TLRs, les CLR, les NLRs, et les RLRs.
- *Cutibacterium acnes* est capable d'activer le système immunitaire inné cutané principalement par la reconnaissance des TLR2 et TLR4.

D. Microbiote cutané et dermatoses inflammatoires

De nombreuses études démontrent l'importance d'un bon équilibre entre les différentes communautés microbiennes au sein du microbiote cutané afin de garantir l'homéostasie de la peau et l'intégrité de sa fonction « barrière » (Dréno *et al.*, 2016a). La dysbiose, un déséquilibre des communautés bactériennes au niveau du microbiote cutané, est souvent observée dans les dermatoses inflammatoires, en particulier l'acné (Dréno *et al.*, 2016a). Ainsi, le rôle du microbiote cutané a été mis en évidence dans l'étiologie, la persistance, et la gravité de nombreuses dermatoses. Sa capacité à activer le système immunitaire inné est sans doute un facteur clé, observé dans ces contextes de dermatoses inflammatoires (Dréno *et al.*, 2016a).

D.1 Microbiote cutané et acné

L'acné est une dermatose inflammatoire chronique multifactorielle du follicule pilo-sébacé (Figure 18, p.57 et Figure 19, p.58). Barnard *et al.* ont récemment décrit une comparaison d'abondance relative des espèces bactériennes retrouvées dans les follicules pileux de patients atteints d'acné et d'individus sains (Figure 20, p.59).



Figure 18 : Photographie d'un patient de 18 ans atteint d'acné conglobata au niveau du visage, avant (gauche) et après (droite) six mois de traitement par isotrétinoïne à 1 mg/kg/jour (dose cumulative 144 mg/kg). Extrait de (Orfanos and Zouboulis, 1998).



Figure 19 : Photographie d'un patient de 18 ans atteint d'acné fulminans au niveau du dos, présentant des lésions nodulaires et nécrotiques. Extrait de (Saint-Jean *et al.*, 2015).

Dans cette étude, *Cutibacterium acnes* était la bactérie cutanée dominante chez tous les individus (sauf un). Ainsi, ces analyses des communautés bactériennes n'ont pas démontré de différences importantes entre le groupe atteint d'acné et le groupe sain. De manière surprenante, cette étude a mis en évidence une tendance à l'augmentation de l'abondance relative de *C. acnes* et de *C. granulosum* chez les individus sains comparés aux patients souffrant d'acné (Figure 20, p.59) (Barnard *et al.*, 2016b; Fitz-Gibbon *et al.*, 2013). Ces données suggèrent un rôle protecteur potentiel de *C. acnes* et *C. granulosum* et sous-entendent l'importance d'autres facteurs impliqués dans la physiopathologie de l'acné, notamment l'immunité innée (Barnard *et al.*, 2016b).

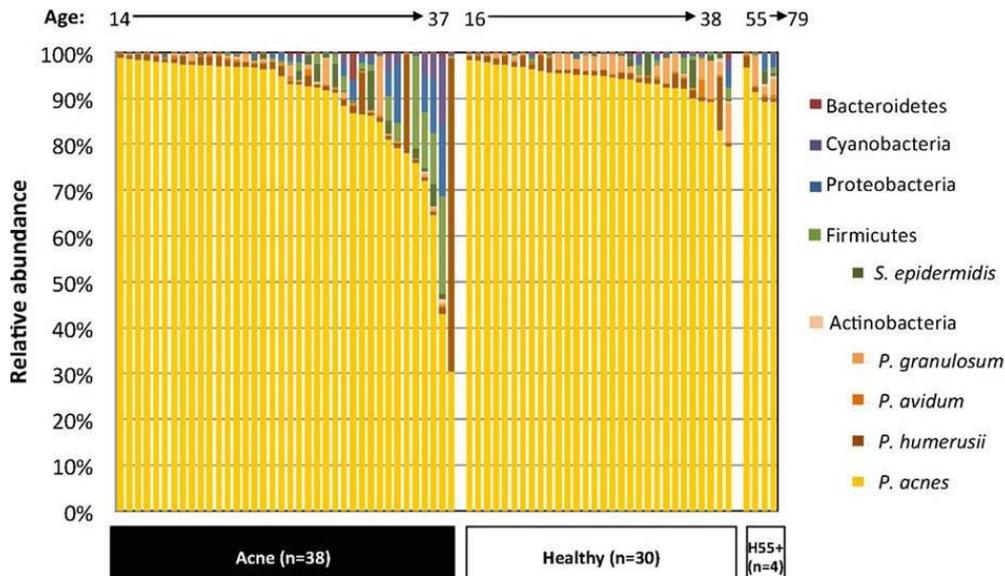


Figure 20 : Analyses de l'abondance relative des espèces bactériennes retrouvées dans les follicules pileux de patients atteints d'acné versus sujets sains (Barnard *et al.*, 2016b).

Ainsi, ces données soulignent l'importance de mener des investigations à une autre échelle, celle des sous-types des bactéries présentes au niveau de la peau, notamment les sous-groupes de *C. acnes* et de *S. epidermidis* (Barnard *et al.*, 2016b; Fitz-Gibbon *et al.*, 2013). Ce type d'investigations a été mené par plusieurs groupes, et le phylotype IA1 appartenant au CC18 apparaît comme le clone prédominant dans l'acné (Lomholt and Kilian, 2010; McDowell *et al.*, 2013). Plus récemment, deux articles ont décrit les types SLST de *C. acnes* retrouvés plus fréquemment sur la peau de patients atteints d'acné modérée à sévère comparé à des individus sains (Nakase *et al.*, 2017; Paugam *et al.*, 2017). Ces études ont démontré que les types SLST A1 et A5, tous deux appartenant au phylotype IA1, sont associés à cette dermatose inflammatoire (Nakase *et al.*, 2017; Paugam *et al.*, 2017). En revanche, aucune étude mécanistique *in vitro* permettant d'évaluer si cette prédominance est une cause ou une conséquence de la maladie, n'est actuellement disponible dans la littérature scientifique. Par ailleurs, malgré la prévalence importante d'un sous-type de *C. acnes* en contexte d'acné, ces études ne semblent pas suffisantes pour expliquer l'apparition des lésions inflammatoires d'acné, notamment parce-que le phylotype IA1 est également retrouvé sur la peau des sujets sains (Scholz *et al.*, 2014), ce qui en fait un sous-type « sélectionné » et prédominant dans l'acné, mais non-étiologique.

De nombreuses études suggèrent l'implication d'autres facteurs dans la physiopathologie de l'acné, notamment l'activation anormale du système immunitaire innée (Paugam *et al.*, 2017; Saint-Jean *et al.*, 2016), mais également la morphologie de la peau qui est propre à chaque individu. En effet, une étude basée sur des analyses de microscopie confocale a montré que des anomalies des follicules pilosébacés étaient présentes sur la peau cliniquement saine des femmes adultes souffrant d'acné, présentant à la fois des signes d'infiltrat inflammatoire et d'hyperkératinisation ainsi qu'une dilatation anormale des *infudibulum* comparé à un groupe sain (Figure 21, p.60) (Muguet Guenot *et al.*, 2018).

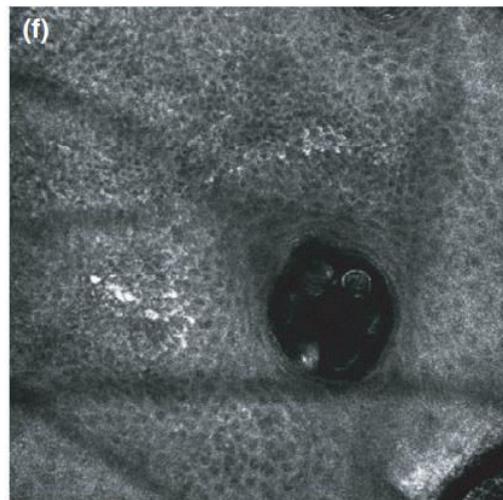


Figure 21 : Photographie montrant un *infundibulum* dilaté, dans lequel sont visibles des *Demodex*, prise par microscopie confocale. Extrait de (Muguet Guenot *et al.*, 2018).

Ainsi, dans ce contexte particulier, la topographie de la peau pourrait représenter un terrain favorisant l'apparition de l'acné (Muguet Guenot *et al.*, 2018).

D.2 Microbiote cutané et dermatite atopique

La dermatite atopique est une dermatose inflammatoire également appelée eczéma, associée à une dysbiose et une colonisation de la peau par *S. aureus* (Bieber, 2008; Yamazaki *et al.*, 2017). C'est une dermatose très fréquente, souvent associée à d'autres maladies atopiques, telles que la rhinite allergique et l'asthme (Bieber, 2008). Elle touche jusqu'à 20 % des enfants et jusqu'à 3 % de la population adulte (Figure 22, p.61) (Nuttan, 2015).



Figure 22 : Photographie de lésions inflammatoires prurigineuses typiques observées chez deux patients atteints de dermatite atopique. Extrait de (Bieber, 2008).

Bieber T. a mis en évidence que les lésions de dermatite atopique étaient fréquemment colonisées par la bactérie *S. aureus*, ou par des fungi tels que *Malassezia*. Les patients avec une dermatite atopique sont également connus pour être prédisposés à d'autres dermatoses telles que l'*eczema herpeticum* et l'*eczema vaccinatum*, en raison d'une faible production de cathélicidine, connue pour son rôle puissant d'antiviral (Bieber, 2010). L'affaiblissement du système immunitaire inné cutané par le microenvironnement régnant au sein d'une peau atteinte de dermatite atopique constitue une hypothèse pour expliquer la colonisation de la peau par *S. aureus*, colonisation touchant plus de 90 % des patients atteints par cette dermatose (Bieber, 2010).

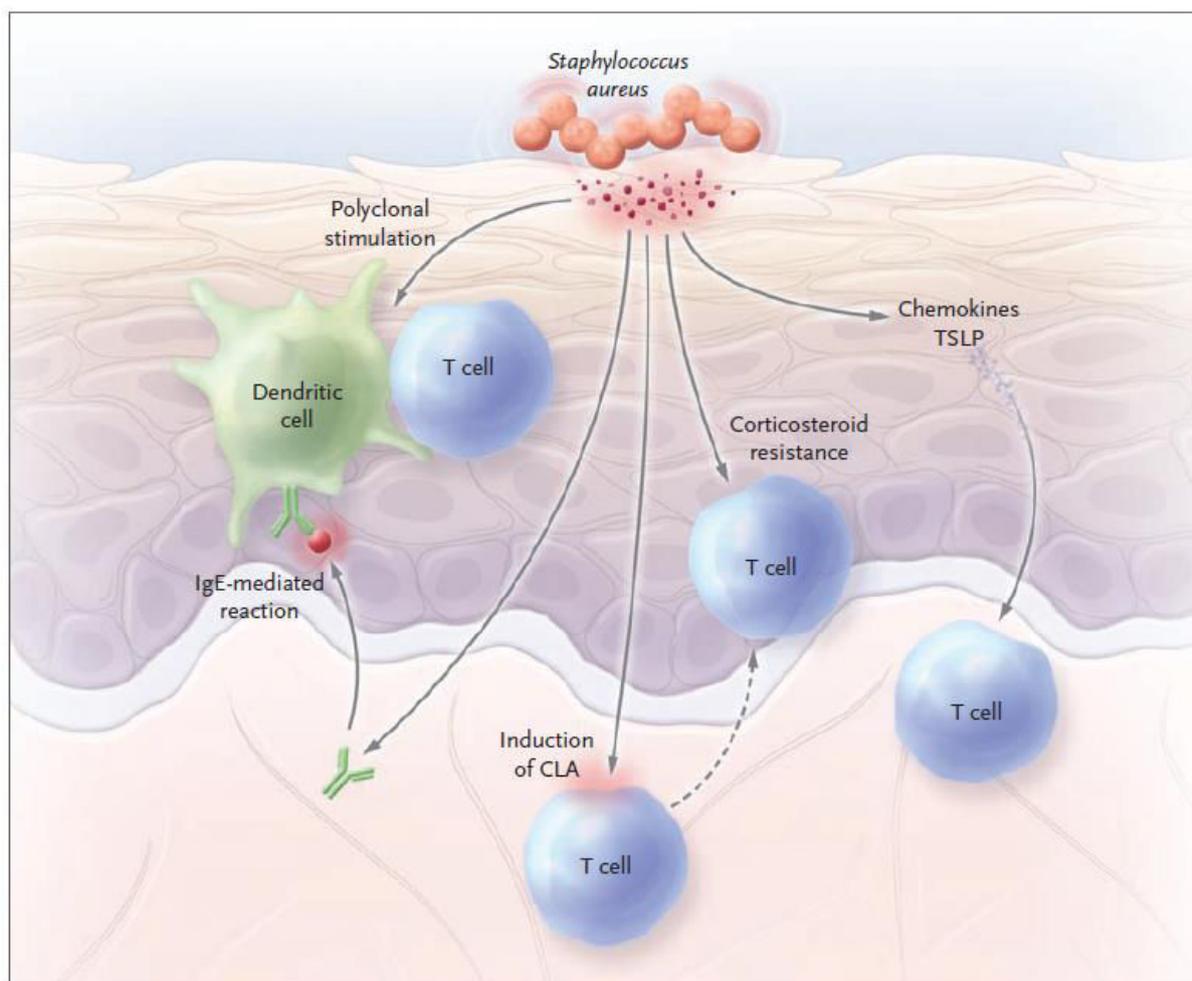


Figure 23 : Les différentes voies menant à la sensibilisation et l'inflammation causées par *S. aureus*, extrait de (Bieber, 2008). TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin, CLA : Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen.

A travers plusieurs mécanismes, *S. aureus* et les molécules qu'il sécrète dans le milieu extracellulaire constituent des signaux qui favorisent la sensibilisation cutanée et l'inflammation. Par exemple, la céramidase dérivée de *S. aureus* augmente la perméabilité de la couche cornée et les entérotoxines synthétisées par 50 à 60 % des souches de *S. aureus* colonisatrices, activent les lymphocytes T (Figure 23, p.62) (Bieber, 2008; Park *et al.*, 2016). D'ailleurs, certaines études évoquent ces entérotoxines comme facteur de virulence possiblement impliqué dans la physiopathologie de cette maladie (Jochmann *et al.*, 2013; Tomi *et al.*, 2005). *Staphylococcus aureus* induit également l'expression de l'antigène cutané lymphocytaire associé au récepteur de la peau (CLA) sur les lymphocytes T. Aussi, deux chimiokines kératinocytaires, la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) et l'IL-31, sont induites et augmentées par les entérotoxines de *S. aureus* (Figure 23, p.62) (Bieber, 2008). Elles contribuent également à la résistance aux corticostéroïdes des lymphocytes T et altèrent

l'activité des lymphocytes T régulateurs. Aussi, les IgE spécifiques de *S. aureus* générées par le système immunitaire peuvent se lier aux récepteurs FcεRI sur les cellules dendritiques et initier une réaction face à cette bactérie, *via* les IgE (Figure 23, p.62) (Bieber, 2008). Ce modèle est un parfait exemple de l'importance de l'équilibre qui règne entre chaque communauté microbienne à la surface de la peau. L'activation anormale du système immunitaire inné a pour conséquence l'apparition d'une inflammation cutanée.

De manière intéressante et plus récemment, Francuzik *et al.* ont mis en évidence que l'abondance de *C. acnes* était inversement corrélée à celle de *S. aureus* en contexte de dermatite atopique (Francuzik *et al.*, 2018). L'hypothèse avancée par ces auteurs est que les produits de fermentation de *C. acnes* seraient capables d'inhiber la croissance de *S. aureus* et de *S. epidermidis*. Ces résultats suggèrent que cette modification sélective du microbiote de la peau pourrait potentiellement être utilisée comme stratégie thérapeutique pour traiter la dermatite atopique (Francuzik *et al.*, 2018). D'autres études décrivent le même type de régulation de croissance, notamment entre *S. epidermidis* et *C. acnes* (Christensen *et al.*, 2016). Dans cette étude, Christensen *et al.* ont décrit une inhibition de croissance réalisée par certaines souches de *S. epidermidis* sur *C. acnes*, et inversement. Ces inhibitions de croissances étaient réalisés par l'intermédiaire de bactériocines, notamment l'épidermine (Christensen *et al.*, 2016).

D.3 Microbiote cutané et psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire auto-immune, chronique, non-contagieuse, récidivante et inflammatoire (Figure 24, p.64). Dans les pays occidentaux, sa prévalence est estimée à 2,8 % (Schön and Boehncke, 2005). En 2013, Alekseyenko *et al.* ont décrit qu'une réduction de la diversité microbienne était observée en contexte de psoriasis, en particulier au sein des lésions psoriasiques (Alekseyenko *et al.*, 2013). Les résultats de cette étude indiquent que le psoriasis induit des changements physiologiques, aussi bien au niveau de la lésion, qu'au niveau systémique, entraînant la sélection d'un microbiote particulier, parmi les types de peaux testés cliniquement dans cet essai. Ces différences de structure de communauté microbienne chez les patients atteints de psoriasis sont potentiellement importantes pour mieux comprendre la physiopathologie et aider au diagnostic de cette dermatose.



Figure 24 : Photographie d'une patiente atteinte d'un psoriasis. Extrait de (Togni *et al.*, 2014).

D.4 Microbiote et folliculites du cuir chevelu

La folliculite decalvante est une alopécie chronique, destructrice, cicatricielle (Figure 25, p.64). La physiopathologie de cette maladie n'est pas connue à ce jour, même si certains micro-organismes appartenant au genre staphylocoque ainsi qu'une réponse inflammatoire excessive dans le cuir chevelu semblent être impliqués (Wolff *et al.*, 2016).

Il a récemment été évoqué que deux types de folliculites du cuir chevelu existeraient, l'une associée à *S. aureus* et l'autre plutôt associée à la présence de *C. acnes* (Frenard *et al.*, 2018). Actuellement, il n'existe pas d'étude décrivant le microbiote cutané présent au niveau des lésions de folliculites du cuir chevelu, et cela reste un domaine de choix pour de futures investigations.



Figure 25 : Photographie d'une patiente atteinte de folliculite decalvante. Alopécie cicatricielle avec papules inflammatoires, pustules, croûtes et poils touffus. Extrait de (Wolff *et al.*, 2016).

D.5 Microbiote cutané et hypomélanose maculeuse progressive

L'hypomélanose maculeuse progressive est une maladie d'étiologie inconnue, caractérisée par des macules asymptomatiques hypopigmentées situées principalement sur le tronc et le dos (Figure 26, p.65) (Kim *et al.*, 2012).



Figure 26 : Photographie de la dépigmentation typique observée chez un patient atteint d'hypomélanose maculeuse progressive (Kim *et al.*, 2012).

Deux études indépendantes récentes démontrent la prédominance du phylotype III de *C. acnes* dans l'hypomélanose maculeuse progressive (Barnard *et al.*, 2016a; Petersen *et al.*, 2017). Cette découverte est une nouvelle preuve qu'un microbiote particulier peut être retrouvé dans un contexte de dermatose. Dans ce cas précis, une sous-espèce bactérienne, le phylotype III de *C. acnes*, est surreprésentée sur la peau lésionnelle (73,9 %) comparé aux individus sains (14,2 %) (Petersen *et al.*, 2017). Ce sous-type particulier prend alors l'avantage sur les autres et, par conséquent, entraîne une perte de la diversité microbienne.

D.6 Microbiote cutané et cancers

Très récemment, une équipe Américaine a démontré une possible implication de *S. epidermidis* dans les cancers cutanés (Nakatsuji *et al.*, 2018). En effet, leur étude démontre un rôle protecteur de cette bactérie dans le développement de néoplasie, dans un modèle murin. D'après cette étude, *S. epidermidis* sécrète une enzyme, la 6-HAP (6-N-HydroxyAminoPurine), capable d'inhiber de manière sélective la prolifération de lignée tumorale, avec aucun effet sur celle des kératinocytes primaires (Nakatsuji *et al.*, 2018). Ce

phénomène antiprolifératif serait dû à la capacité de la 6-HAP d'inhiber spécifiquement l'activité de l'ADN-polymérase des cellules tumorales (Nakatsuji *et al.*, 2018). Par ailleurs, ils démontrent que la résistance à la 6-HAP est associée à l'expression de composés capables de réduire l'amidoxime mitochondrial, enzyme qui n'était pas retrouvée dans les cellules sensibles à ce composé. Pour confirmer leur concept, l'injection intra-veineuse de 6-HAP à des souris a permis de mettre en évidence une inhibition de croissance de la lignée tumorale de mélanome B16F10, sans toxicité systémique observée. Des analyses génétiques *in silico* menées sur des souches issues de 22 sites corporels sur 18 sujets sains, ont permis de souligner que les souches produisant cette enzyme étaient couramment retrouvées au niveau de la peau humaine (Nakatsuji *et al.*, 2018).

D.7 Les liens entre les différents microbiotes

Une théorie émergente de la littérature scientifique décrit un lien potentiel entre les différents microbiotes du corps humain. En effet, dans une revue de 2017, Langan E.A. *et al.* suggèrent que des thérapies innovantes verront le jour très prochainement, basées sur la modulation du microbiote, notamment par l'utilisation d'antibiotiques (topique ou systémique) ou d'antiseptiques, ou encore de transplantation du microbiote cutané intra- ou inter-individuelle. Un autre traitement a été suggéré, notamment basé sur les communications croisées entre le microbiote intestinal et le microbiote cutané (utilisation de pré- ou probiotiques). Ces traitements ont été suggérés dans la prise en charge du psoriasis, mais cette théorie pourrait se développer pour d'autres dermatose inflammatoires telles que la dermatite atopique, ou encore l'acné (Langan *et al.*, 2017; Notay *et al.*, 2017).

D.8 La communication cellule hôte-bactéries commensales

Les signaux qui régissent la communication entre les bactéries de notre corps et notre système immunitaire sont complexes et cette communication constante repose sur un équilibre fragile (Dréno *et al.*, 2016a; Egert *et al.*, 2017). En effet, pour permettre aux bactéries de vivre sur notre corps (*i.e.* la peau), ou même à l'intérieur (*i.e.* l'intestin), et de participer au bon fonctionnement de certains de nos organes, il faut que ces bactéries commensales soient

tolérées par le corps pour éviter des réactions inflammatoires inappropriées et chroniques. De ce fait, nous portons tous des bactéries à la surface de notre corps, sans pour cela que notre peau réagisse par une réaction inflammatoire. Il existe donc une régulation complexe et encore mal connue des communications entre le système immunitaire inné et le microbiote cutané. Plusieurs équipes ont étudié ces voies de signalisation entre cellules hôtes et bactéries commensales. Une des voies d'exploration des plus innovantes, repose sur la sécrétion de vésicules extracellulaires (Jan, 2017; Kaparakis-Liaskos and Ferrero, 2015). Les vésicules extracellulaires sont apparues comme un mécanisme omniprésent pour le transfert d'information entre les cellules et les micro-organismes à travers les trois règnes de la vie (Coakley *et al.*, 2015). De manière intéressante, il a récemment été décrit que *C. acnes* était capable de produire de telles vésicules (Figure 27, p.67) (Jeon *et al.*, 2017).

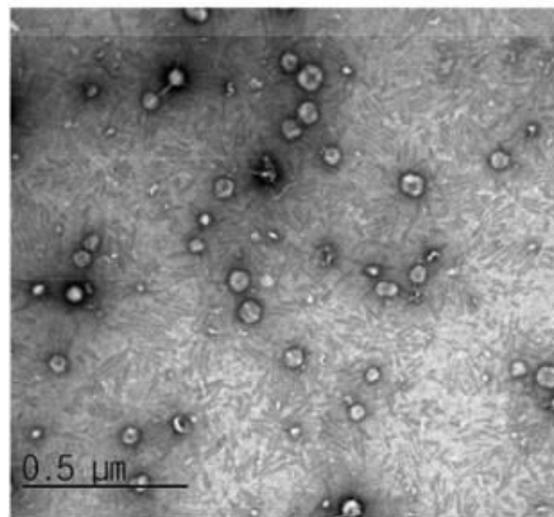


Figure 27 : Exemple de vésicule extracellulaire produite par *C. acnes*, vue par microscopie électronique à transmission (Jeon *et al.*, 2017).

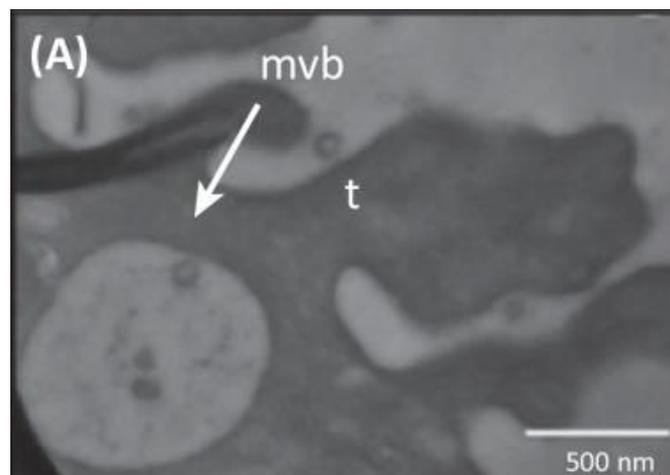


Figure 28 : Exemple de vésicule extracellulaire produite par *Echinostoma caproni*, montrée par la flèche blanche (Coakley *et al.*, 2015).

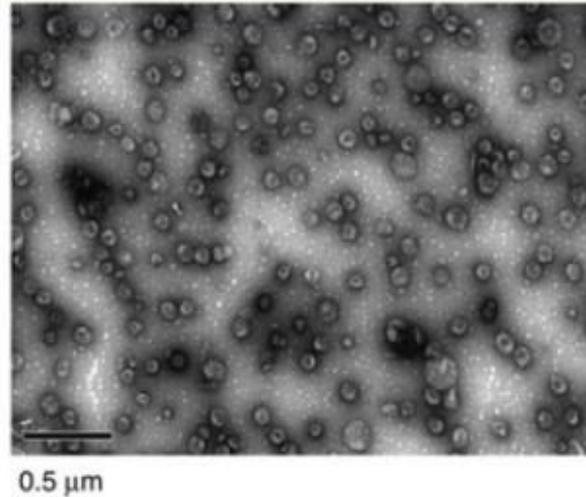


Figure 29 : Exemple de vésicule extracellulaire provenant du produit de sécrétion de *Heligmosomoides polygyrus*, l'échelle indique 0,5 μm. (Buck *et al.*, 2014).

Ces vésicules extracellulaires sont produites par bourgeonnement à la surface de la cellule. Ce phénomène est décrit aussi bien chez les cellules eucaryotes que chez les cellules procaryotes, notamment les bactéries (Figure 27, p.67, Figure 28, p.67, et Figure 29, p.68) (Coakley *et al.*, 2015; Jan, 2017; Kaparakis-Liaskos and Ferrero, 2015). Concernant les vésicules extracellulaires produites par les bactéries, elles peuvent contenir plusieurs types de molécules, y compris des molécules très immunogènes et potentiellement pro-inflammatoires comme du LPS pour les bactéries à Gram négatif, ou encore du LPA (Acide Lipotéichoïque) pour les bactéries à Gram positif (Figure 30, p.68) (Karakis-Liaskos and Ferrero, 2015).

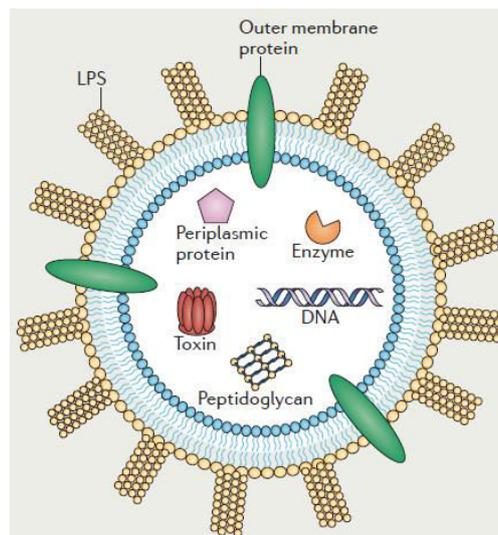


Figure 30 : Liste des molécules que peuvent contenir les vésicules extracellulaires issues de bactéries (Karakis-Liaskos and Ferrero, 2015).

De manière intéressante, des liens entre les vésicules extracellulaires et les dermatoses inflammatoires commencent à être soulignés, notamment entre *S. aureus* et la dermatite atopique (Jun *et al.*, 2017). En effet, dans cette étude, les auteurs suggèrent que les vésicules extracellulaires issues de *S. aureus* seraient capable d'exacerber la dermatite atopique, dans un modèle de dermatite atopique *in vivo* (Jun *et al.*, 2017). Enfin, une étude très récente a montré l'induction d'un phénotype « acné » par des vésicules extracellulaires produites par *C. acnes*, dans un modèle de kératinocytes (Choi *et al.*, 2018). De plus, cette étude montre que la réponse inflammatoire induite par les vésicules extracellulaires de *C. acnes* s'effectue par une signalisation dépendante des TLR-2 (Choi *et al.*, 2018).

L'ensemble de ces données suggèrent que les vésicules extracellulaires bactériennes et leur lien avec l'immunité innée dans les dermatoses inflammatoires représentent un domaine de choix pour de futurs projets de recherche sur *C. acnes* et l'acné sévère, mais également d'autres dermatoses inflammatoires.

Points de synthèse

- Le microbiote cutané apparaît comme un acteur incontournable impliqué dans de nombreuses dermatoses inflammatoires y compris l'acné.
- Des communications constantes permettent aux micro-organismes du microbiote cutané d'échanger avec les cellules hôtes, et ces signaux constituent un fragile équilibre permettant de réguler l'activation du système immunitaire inné.
- Ces communications entre les cellules hôtes et les bactéries commensales de la peau incarnent de nouvelles pistes d'investigations pour expliquer l'activation anormale du système immunitaire inné observée en contexte de dermatoses inflammatoires.

III. Objectifs

L'objectif principal de ce travail de Thèse a été d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes physiopathologiques menant à l'acné sévère nodulaire. Ce travail s'est axé autour de deux domaines complémentaires pour l'étude de l'acné : la bactériologie et l'immunologie. La première partie a concerné l'aspect bactériologique de l'acné, et la deuxième partie a concerné l'immuno-dermatologie en contexte d'acné.

Dans un premier temps, le travail de Thèse a consisté à réaliser la collecte des échantillons à partir de l'inclusion des patients qui a débuté comme la Thèse, en novembre 2015.

Dans un deuxième temps, cette étude a eu pour but de caractériser de manière exhaustive les isolats de *C. acnes* issus de l'étude, retrouvés au niveau du visage et du dos de patients atteints d'acné modéré du visage et d'acné sévère du dos, et de volontaires sains. Il s'agissait ainsi de réaliser le typage moléculaire des souches selon les trois niveaux actuellement connus (phylotype, complexe clonal et type SLST). Par cette étude, l'objectif était de répondre à trois questions :

- Existe-t-il une différence de phylotype de *C. acnes* retrouvé au niveau du visage *versus* le dos d'un patient atteint d'acné ?
- Existe-t-il une différence de phylotype de *C. acnes* retrouvé sur le dos et le visage des patients atteints d'acné comparé à des volontaires sains ?
- Existe-t-il une différence de phylotype de *C. acnes* retrouvé chez des patients atteints d'acné de différente sévérité ? Est-ce qu'un phylotype est spécifique d'une acné sévère ?

A l'issue de cette partie, la prédominance importante du phylotype IA1 (CC18/A1) en contexte d'acné sévère du dos a orienté l'étude sur une nouvelle question.

C'est ainsi que dans un troisième temps, la Thèse a visé à décrypter l'impact de la diversité des phylotypes de *C. acnes* sur le niveau d'activation de l'immunité innée en contexte d'acné. En effet, le typage moléculaire des bactéries issues des patients inclus dans l'étude a orienté les investigations sur un objectif nouveau : déterminer si cette perte de diversité des phylotypes observée en contexte d'acné sévère était une cause ou une conséquence de la maladie. Pour répondre à cette nouvelle question, un système *in vitro* de cocultures entre des bactéries et des explants de peau humaine a été mis au point. En parallèle de ce travail, une caractérisation du niveau d'activation de l'immunité innée de la peau de

patients atteints d'acné sévère en comparaison à des patients sains a été réalisée. Par ailleurs, une caractérisation du niveau d'activation de l'immunité innée a également été réalisée dans deux types de lésions inflammatoires d'acné (papule et nodule) et comparée à de la peau non-lésionnelle de patients atteints d'acné sévère.

Des investigations complémentaires ont découlés du travail de Thèse au fur et à mesure de l'avancée de l'étude. Ils portaient sur la caractérisation plus détaillée des souches de *C. acnes* issues des patients de notre projet et également sur l'étude métagénomique des communautés bactériennes des échantillons collectés au cours de l'inclusion des patients. D'abord, il s'agissait d'évaluer la capacité des souches de *C. acnes* à produire du biofilm. Cette phase avait pour but de déterminer si la production de biofilm était identique d'un sous-groupe de *C. acnes* à l'autre. Elle avait aussi pour but de déterminer si la présence de substances communément utilisées pour la prise en charge des patients atteints d'acné pouvait influencer cette production (adapalène, isotrétinoïne, peroxyde de benzoyle). Ensuite, il s'agissait de réaliser l'étude métagénomique des communautés bactériennes présentes sur le dos et le visage des patients atteints d'acné sévère inclus dans l'étude, en comparaison au groupe sain également inclus dans l'étude.

IV. Matériels et Méthodes

A. Etude immuno-dermatologique

A.1 Inclusion des patients dans l'étude

Dans le cadre du protocole numéroté RD.03.SPR.105704, le recrutement des patients et volontaires sains pour l'étude a débuté dès novembre 2015. Cette étude avait pour dénomination « Etude d'acquisition de connaissance sur la physiopathologie de l'acné sévère nodulaire ». Elle était monocentrique, et enregistrée sous le numéro ID-RCB 2015-A01139-40, sous la coordination du Professeur Brigitte Dréno. A la première visite, les patients présentant de l'acné sévère du dos et respectant les critères d'inclusion étaient sélectionnés. Les critères d'inclusions étaient : l'âge (16-35 ans), au moins deux nodules sur le dos, ayant une période de sevrage d'au moins un mois pour les antibiotiques, six mois pour les rétinoïdes oraux (*i.e.* isotrétinoïne), et deux semaines pour les traitements topiques. Les volontaires sains étaient sélectionnés selon des critères différents, incluant une totale absence d'acné sur le visage et le dos, ainsi qu'une absence de dermatoses actuelles ou passées. Tous les patients ont signé un consentement éclairé et l'étude a été approuvée par l'autorité de santé compétente, l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé), et déposée sous le numéro 151141B-42. L'étude a également été approuvée par un comité d'éthique : le Comité de Protection des Personnes (CPP), sous le numéro 21-15. Pour chaque patient présentant de l'acné, des scores de sévérité ont été établis par un dermatologue expert pour le dos et le visage. Ces scores étaient estimés entre 0 et 5 en fonction de la sévérité de l'acné (mineur à sévère) pour les deux zones considérées. Tous les scores ainsi que les données cliniques ont été répertoriés ci-après (Tableau 1, p.75). Les scores pour l'acné du dos ont été établis en suivant l'Echelle de Cotation des Lésions d'Acné (ECLA) (Dréno *et al.*, 1999). Les scores pour le visage ont été établis en suivant les recommandations du Groupe Expert Acné (GEA) (Dréno *et al.*, 2011).

N° de patient	Score visage (GEA)	Genre	Âge	Score dos (ECLA)
9008	2	F	21	5
9020	1	M	23	5
9001	1	M	24	4
9002	2	M	31	4
9004	2	M	22	4
9006	1	M	33	4
9014	1	M	21	4
9017	1	M	34	4
9021	2	F	24	4
9003	2	M	22	3
9005	1	M	29	3
9007	2	M	28	3
9009	1	M	33	3
9010	2	M	21	3
9011	2	M	22	3
9012	3	M	18	3
9013	3	F	19	3
9015	1	M	31	3
9016	1	M	20	3
9018	1	M	29	3
9019	1	M	21	3
9022	1	M	29	3
9023	1	F	26	3
9024	1	M	25	3

Tableau 1 : Données cliniques des patients atteints d'acné sévère inclus dans l'étude. GEA: Groupe Expert Acné; ECLA: Echelle de Cotation des Lésions d'Acné.

A.2 Echantillonnage des patients

Pour tous les patients inclus, des écouvillonnages ont été réalisés sur le visage et le dos au cours de la même visite, sur une surface de 1 cm englobant une lésion inflammatoire (papule) pour les patients acnéïques, en frottant l'écouvillon pendant 45 secondes. Les échantillons ont été réalisés sur le visage et le dos, dans le groupe sain et le groupe acné. L'écouvillon a été déchargé dans un tube contenant 1 mL de milieu BHI (Brain Heart Infusion) et expédié dans les 30 min au Service de Bactériologie et d'Hygiène Hospitalière du CHU de Nantes. Chaque échantillon a été mis en culture en anaérobiose à 37°C pendant 7 à 10 jours. Les colonies présentant la morphologie typique de *C. acnes* ont été repiquées sur une gélose Schaedler enrichie en vitamine K1 et 5 % de sang de mouton (BD, cat. #254042), pour récupérer la souche prédominante de *C. acnes*. Tous les isolats ont été identifiés par Matrix-

Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry avec un spectromètre de masse Vitek® MS (MALDI-TOF MS) (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). Toutes les souches ont été identifiées avec un indice de certitude d'une valeur supérieure à 99,9 %.

A.3 Origines des explants de peau saine

Les explants ont été réalisés à partir de plasties humaines, à l'aide de punch de 4 mm de diamètres (Kai Medical cat. #LCH-PUK-40). Ces plasties ont été fournies par le Département des Brûlés et Chirurgie Plastique Adultes-Enfants du CHU de Nantes, dirigé par le Pr Pierre Perrot. La collaboration a été amorcée suite à une présentation du projet devant les membres du Département des Brûlés et Chirurgie Plastique Adultes-Enfants du CHU de Nantes, le 3 Octobre 2016.

L'utilisation d'explants de peau issue de déchets de chirurgie plastique constitue un biais dans l'étude des marqueurs de l'immunité innée et de la réaction inflammatoire observée après incubation avec des lysats membranaires de *C. acnes*. En effet, des différences d'activation de l'immunité ont été suggérées d'une région à l'autre du corps humain (Dajnoki *et al.*, 2017), et il n'est donc pas exclu que cela puisse induire des modulations propres au modèle que nous avons choisi d'utiliser.

Néanmoins, nous avons fait ce choix pour trois raisons principales : la prise en compte de la complexité de la peau, la non-utilisation d'animaux de laboratoire, et la cohérence avec les études précédemment publiées par notre groupe (Jasson *et al.*, 2013). D'abord, compte tenu que la peau est un organe complexe, constitué de plusieurs types cellulaires, l'utilisation de plasties permet de prendre en compte l'intégralité de ces cellules et pas uniquement les kératinocytes ou sébocytes, comme ceci aurait été le cas dans un modèle de culture cellulaire monocouche. Ensuite, depuis ces 10 dernières années, une sensibilisation croissante au sort des animaux de laboratoire a encouragé les législateurs à restreindre l'utilisation des animaux pendant les procédures de tests, notamment *via* la mise en place de la règle des trois R (réduction, raffinement et remplacement). De plus, il est décrit que l'utilisation du modèle murin peut induire des confusions et n'incarne pas un modèle parfait pour l'étude des maladies humaines, en particulier quand il s'agit d'immunité (Mestas and Hughes, 2004), ce

qui souligne l'intérêt de trouver des solutions alternatives. L'utilisation de plasties issues de déchets de chirurgie plastique représente une solution, et est actuellement commercialisée par deux laboratoires Français (Genoskin[®] et Episkin[®]), ce qui légitime d'autant plus l'utilisation de ce modèle. Enfin, ce modèle a été précédemment utilisé par notre groupe et publié à plusieurs reprises (Isard *et al.*, 2009; Jasson *et al.*, 2013). L'utilisation d'un modèle similaire permet une comparaison des résultats plus aisée entre des études précédemment publiées et les études actuelles.

A.4 Manipulations de cocultures entre *C. acnes* et les explants de peau humaine

Après le dégraissage et le lavage du morceau de peau réceptionnée (Figure 31, p.78), des punchs de 4 mm de diamètre ont été réalisés comme décrit précédemment (Jasson *et al.*, 2013). Après reconstitution des lysats bactériens (culot membranaire) dans 1 ml de DMEM GlutaMAX[™] (ThermoFisher Scientific, cat. #10569010), les explants cutanés ont été co-cultivés avec des lysats de *C. acnes* pendant 6 h dans des plaques 24-puits (Figure 32, p.78), à une concentration finale en protéines de 5 µg/mL. Les explants ont été co-cultivés soit avec un phylotype de *C. acnes* seul (IA1, II ou III), soit avec une combinaison de phylotypes afin de reproduire la diversité des phylotypes associée à une peau saine *in vitro* (IA1+II+III). Après incubation, les surnageants ont été prélevés, aliquotés et stockés à -80°C jusqu'aux investigations ultérieures. Les explants ont ensuite été rincés deux fois dans du dPBS (Lonza, cat. #BE17-512F), puis retirés du puits et fixés pendant 24 h dans du formaldéhyde à 4 % (QPATH, VWR). La condition de contrôle positif a été réalisée en incubant des explants avec du LPS provenant d'*Escherichia coli* (Sigma Aldrich, L4391-1MG). La condition de contrôle négatif a été réalisée en incubant des explants avec du milieu de culture seul. L'ensemble de ces manipulations de cocultures ont été réalisées trois fois, c'est-à-dire avec trois donneurs de peaux différents (n=3).



Figure 31 : Photographie d'un morceau de peau issue d'une plastie abdominale et utilisée pour les manipulations de cocultures dans ce travail de Thèse.



Figure 32 : Photographie d'une plaque 24-puits contenant les explants de peau en contact avec les lysats bactériens de *C. acnes*, après incubation de 6h au cours de ce travail de Thèse.

A.5 Préparation des échantillons avant réalisation d'une immunohistochimie

Les explants ont été préalablement fixés à l'aide de formaldéhyde 4 % (QPATH, VWR) pendant au moins 24 h. Pour cette étape de fixation dite « chimique », il est nécessaire que le volume de formaldéhyde soit au moins 20 fois supérieur au volume de la pièce à fixer. Pour les fixations réalisées dans le cadre de cette étude, nous avons utilisés les pots de formaldéhyde prêts à l'emploi du service d'Onco-Dermatologie du CHU de Nantes. Les pots de formaldéhyde pré-remplis contenaient 5 mL, ce qui est largement suffisant pour la fixation

des explants qui ont un diamètre de 4 mm. Après l'étape de fixation, les explants subissaient plusieurs séries successives de déshydratation à l'aide de bains d'éthanol, puis d'hydrocarbures (xylène) pour préparer le tissu à recevoir la paraffine. Ces bains successifs ont été réalisés par un automate lancé sur la nuit (ASP300, Leica).

A la sortie de l'automate, les explants étaient inclus en blocs de paraffine pour la coupe. Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un microtome Leica (Leica, RM 2155) à une épaisseur de 5 μm , et étalées sur des lames chargées positivement (VWR, SuperFrost Plus, cat. #631-0108). Après les coupes, les lames étaient séchées dans un sécheur de lames à 70 °C pendant 20 min (Raymond A. Lamb, Section Dryer E285). Puis, l'étape de déparaffinage était réalisée par deux bains successifs de xylène (10 min chacun), puis par deux bains successifs d'éthanol à 100° (5 min chacun). Un dernier bain de rinçage à l'eau distillée était réalisé pendant 5 min. Ensuite, un démasquage des sites antigéniques était réalisé à l'aide d'un tampon EDTA (DAKO, cat. #S2367) ou citrate (DAKO, cat. #S1699) en fonction de l'anticorps concerné. Cette étape était réalisée par micro-ondes pendant 25 à 40 min, la température ayant été mesurée avant de débiter les manipulations, et étant bien de 95 °C. Un rinçage à l'eau distillée était réalisé pendant 20 min. C'est à partir de cette étape que l'immunohistochimie pouvait débiter.

A.6 Immunohistochimies

Les immunohistochimies (IHC) ont été réalisées sur : (i) les explants cutanés stimulés par les extraits de *C. acnes*, (ii) les lésions inflammatoires d'acné (nodule et papule), (iii) les peaux non-lésionnelles issues de patients atteints d'acné sévère du dos et de sujets sains.

Elles ont été réalisées avec des anticorps qui ont nécessité une mise au point préalable. Les mises au point ont été conduites au fur et à mesure de l'avancement de la Thèse et ont nécessité plus ou moins de temps, selon les anticorps : TLR-2, β -défensine-2, IL-1 β , IL-10, IL-17, TGF- β , TIMP-2, MMP-2, MMP-9, PAR-2, et Laminine- α 5. Le tableau suivant récapitule les anticorps utilisés avec les références et les fournisseurs (Tableau 2, p.80) :

Cible	Fournisseur	Référence
β -défensine-2	Abcam	ab63982
IL-1 β	Abcam	ab2105
TLR-2	SantaCruz	sc-10739
IL-10	R&D Systems	AF-217-NA
IL-17	Abcam	ab79056
TGF- β	Serotec	MCA797
TIMP-2	Abcam	ab1828
MMP-9	Abcam	ab58803
MMP-2	Merck Millipore	IM33-100UG
PAR-2	LifeSpan BioSciences	LS-B2321-50
Laminine- α 5	R&D Systems	NBP2-42391

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés au cours des immunohistochimies réalisées dans le cadre de cette Thèse.

La première étape des IHC consistait à sécher les lames et cercler la biopsie à l'aide d'un Dako Pen (Dako Pen, cat. #S2002). Puis, il s'agissait de bloquer les peroxydases endogènes ainsi que les complexes avidine/biotine, pouvant être à l'origine de signal « faux positif ». Ces étapes ont été réalisées grâce à un réactif de blocage commercialisé par Dako, ainsi que le kit ABC (Avidin/Biotin Complex) (Vector, cat. #SP-200 et cat. #PK-7200 ; Dako, cat. #S2023). L'anticorps primaire était ensuite incubé, soit à 4°C pendant une nuit, soit 1 h à température ambiante, selon les conditions identifiées par une mise au point préalable à l'utilisation de chaque anticorps.

Le principe du kit ABC commercialisé par Vector et utilisé dans le cadre de ce travail de Thèse, repose sur l'affinité de l'avidine pour la biotine. La biotine peut être couplée à une grande variété de molécules biologiques comme les anticorps, et plusieurs molécules de biotine peuvent être liées à une protéine. La protéine biotinyllée peut ainsi se lier à plus d'une molécule d'avidine. Dans le cadre des manipulations d'IHC, la particularité de cette affinité va permettre une amplification du signal et ainsi localiser les zones où l'anticorps primaire s'est fixé.

Using the VECTASTAIN® ABC System

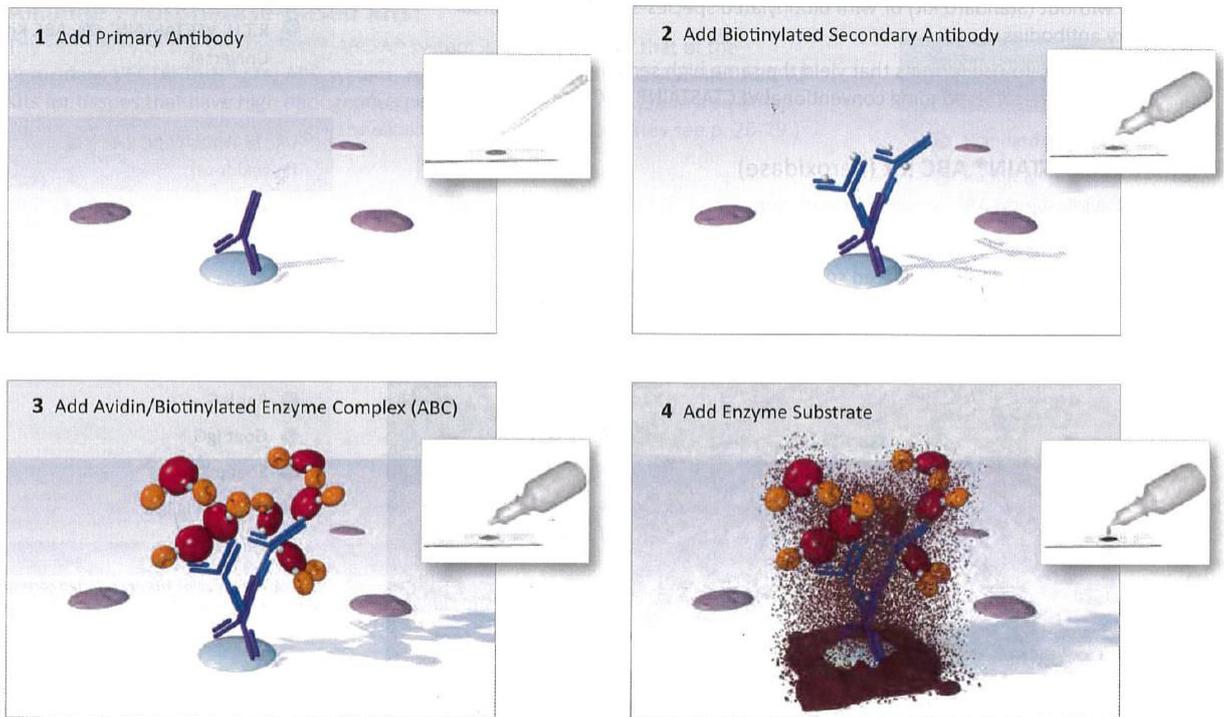


Figure 33 : Schéma des quatre étapes suivant l'incubation de l'anticorps primaire, dans le système ABC (Vector, cat. #PK-7200) utilisé dans le cadre des travaux de cette Thèse (Guide utilisateur Vector Laboratories, distribué par Clinisciences). (1) L'incubation de l'anticorps primaire ; (2) L'ajout de l'anticorps secondaire biotinylé ; (3) Formation du complexe avidine/biotine suite à l'ajout du réactif de Vectastain ; (4) Réaction enzymatique entre l'enzyme HRP et son substrat Novared, donnant lieu à un produit de dégradation chromogène, permettant la localisation des protéines d'intérêt.

A la suite de cette étape, l'anticorps secondaire biotinylé était incubé 30 min à température ambiante en atmosphère humide (Figure 33, p.81). Puis, le réactif Vectastain inclus dans le kit ABC (Vector, cat. #PK-7200), permettant de former le complexe avidine/biotine, était incubé pendant 30 min à température ambiante en atmosphère humide (Figure 33, p.81). Ensuite, le Novared (Vector, cat. #SK-4800) était préparé et incubé pendant 15 min maximum sur les lames afin de réaliser la révélation du marquage. Cette étape de révélation repose sur la réaction enzymatique qui a lieu entre l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxidase), et son substrat (Novared). Le produit de cette dégradation enzymatique est chromogène, et ainsi, la localisation de la protéine d'intérêt est rendu visible.

A la suite de cette étape, les lames ont été rincées à l'eau distillée, puis contre-colorées avec de l'Hémalun de Mayer (RAL Diagnostics, cat. # 320550-1000) pendant 1 min. Puis, les lames ont été montées avec du milieu de montage (Dako, cat. #S3025) et une lamelle, puis

laissées pour sécher avant la prise de photos. La prise de photo s'est effectuée en utilisant un microscope Leitz (Leitz, Aristoplan), et un appareil photo adapté sur le microscope (Nikon D7000).

D'autres marqueurs que ceux impliqués dans l'immunité innée ont été étudiés. En effet, nous avons pratiqué des immunohistochimies en ciblant des marqueurs caractéristiques de la matrice extracellulaire et impliqués dans le remodelage cellulaire. L'objectif était de déterminer l'impact de chacun des phylotypes ainsi que celui d'une combinaison de phylotypes, sur la capacité de la peau à cicatriser, ceci étant en lien avec l'inflammation. Ainsi, nous avons ciblé TIMP-2, MMP-2, MMP-9 et la Laminine- α 5. Les variations d'expression de ces composants de la matrice extracellulaire exercent une myriade d'effets sur les tissus du corps humain (Frantz *et al.*, 2010). Par exemple, les Laminines, une famille de glycoprotéines extracellulaires hétérotrimériques, et en particulier la sous-unité alpha-5 de la Laminine (codée par le gène LAMA5 chez l'Homme), affectent le développement et l'intégrité des tissus dans des organes aussi divers que les reins, les poumons, la peau et le système nerveux (Frantz *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2007; Wegner *et al.*, 2016).

Le choix de l'étude de ces marqueurs dans ce travail de Thèse repose sur l'influence connue de *C. acnes* sur l'expression de ces gènes, notamment sur MMP-9 (Jugeau *et al.*, 2005). Également, *C. acnes* est capable de stimuler la synthèse de la pro-MMP-2 par les fibroblastes dermiques (Choi *et al.*, 2008). Par ailleurs, dans la littérature scientifique, plusieurs articles décrivent l'implication des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) dans plusieurs syndromes complexes dermatologiques, notamment *cutis laxa* (Symoens *et al.*, 2012; Urban *et al.*, 2009), et également dans des lésions de dermatite herpétiforme (Dolcino *et al.*, 2012). De plus, les gènes codant pour les protéines de la MEC sont connus pour être également impliqués dans le remodelage au niveau de la peau, notamment dans le processus de reconstruction et de réparation cutanée (Castaño *et al.*, 2018).

Notre groupe a précédemment publié des études incluant l'analyse de ces marqueurs dans le cadre de plusieurs projets en lien avec l'acné (Jasson *et al.*, 2013; Saint-Jean *et al.*, 2016). Dans la continuité de ces travaux, nous avons donc inclus dans l'étude des profils inflammatoires des explants stimulés par les différentes combinaisons de *C. acnes*, l'étude de ces marqueurs de la MEC. Les anticorps utilisés sont listés en Tableau 2, p.80.

A.7 Dosage protéiques dans les surnageants de cultures d'explants, par la méthode ELISA

La méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a été choisie pour doser les cytokines sélectionnées présentes dans les surnageants des cocultures entre les explants et les lysats bactériens. Toutes les mesures de concentrations en cytokines ont été réalisées en adéquation avec les instructions du fournisseur : IL-1 β (Affymetrix, cat. #88-7261-22), IL-6 (Affymetrix, cat. #88-7066-22), IL-8 (Affymetrix, cat. #88-8086-22), IL-10 (Affymetrix, cat. #88-7106-22), IL-17 (Affymetrix cat. #88-7176-22), et TGF- β (Affymetrix, cat. #88-8350-22).

A.8 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par le biostatisticien de notre équipe INSERM, le Dr Jean-Michel Nguyen. Ces analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le modèle General Linear Model, et également confirmé par des tests non-paramétriques (Wilcoxon test). Ces analyses ont été menées en utilisant le logiciel R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

B. Etude microbiologique

B.1 Obtention des souches de *C. acnes* et culture

Les prélèvements de microbiote cutané à la surface de la peau (visage et dos) des patients inclus ont été réalisés sur une zone de 1 cm avec des écouvillons, puis déchargés dans 1 mL de BHI. La réception des échantillons dans le service de Bactériologie et d'Hygiène du CHU de Nantes a été réalisée dans les 30 min suivant le prélèvement. Après culture de la flore globale en anaérobiose pour chaque prélèvement, la gélose a été lue par un bactériologiste expert, et chaque colonie suspecte a été identifiée par la technique de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight). De fait, pour chaque prélèvement, la souche de *C. acnes* prédominante en culture a été isolée et congelée à -20 °C.

Cutibacterium acnes est un bacille anaérobie aéro-tolérant, c'est-à-dire qu'il a une croissance optimale en l'absence d'oxygène et tolère de faibles concentrations d'oxygène. Pour chaque prélèvement, 30 µL du milieu BHI ont étéensemencés à l'oëse sur gélose au sang Schaedler enrichie avec de la vitamine K1 et 5 % de sang de mouton (BD, cat. #254042), incubée en anaérobiose (GazPak EZ, BD référence 260683) à 37°C. D'autres bactéries ont été utilisées au cours de l'étude : *Cutibacterium namnetense* (souche de patient), *Cutibacterium avidum* (souche de patient), *Cutibacterium granulosum* (souche de patient), *Staphylococcus aureus* (souche de référence ATCC 29213), et *Staphylococcus epidermidis* (souches de référence ATCC 35984 et ATCC 12228).

B.2 Lysats bactériens

B.2.a Ressources existantes

Les lysats bactériens étaient précédemment fournis grâce à une collaboration nationale puis européenne. En l'absence de sa reconduction, nous avons décidé de mettre au point une méthode de création de lysats, à partir d'une culture liquide de *C. acnes*. Les manipulations de mon projet de Thèse incluaient des cocultures entre les explants de peau et les extraits obtenus de *C. acnes*, ce qui ne pouvait pas s'effectuer avec des bactéries vivantes pour des raisons

d'hygiène et sécurité. Toutefois, ce système avec des bactéries viables aurait permis des conditions expérimentales plus proches de la réalité physiologique. De ce fait, il était important de mettre au point une méthode standardisée de création de lysats bactériens, afin de limiter le risque de contamination des cultures voisines aux nôtres dans l'incubateur partagé au sein du laboratoire.

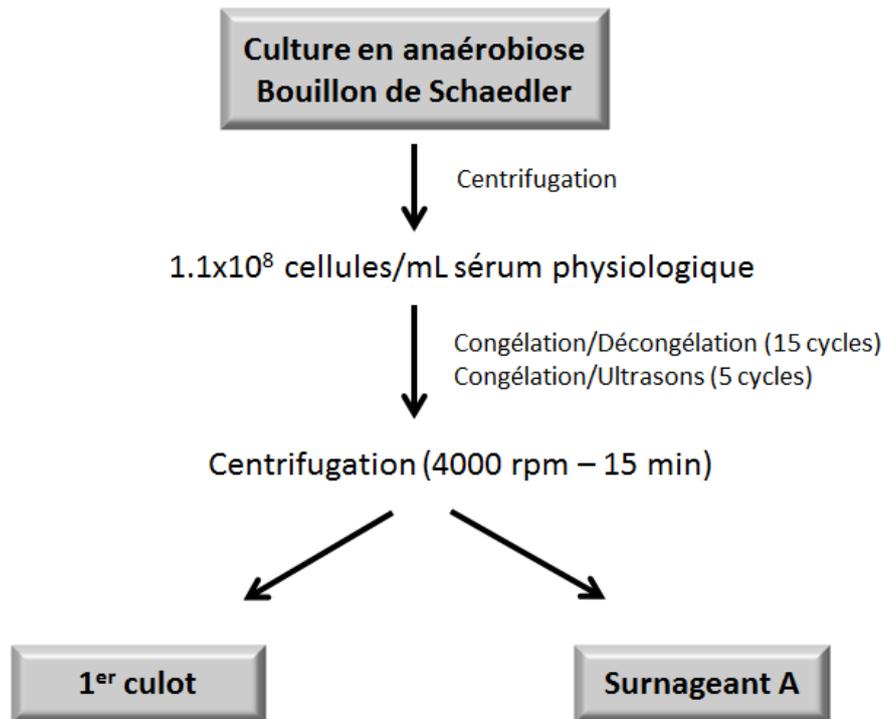


Figure 34 : Protocole d'obtention de deux extraits de *C. acnes*, qui a été notre point de départ pour la mise au point du protocole final. Inspiré du schéma disponible dans la Thèse d'O. Isard (Isard, 2010).

B.2.b Optimisations du protocole et validation

Le développement et la mise au point des différents protocoles présentés se sont inspirés de protocoles partiellement décrits dans les Thèses précédentes du laboratoire. Nous avons alors mis au point un protocole standardisé de création de lysats bactériens. L'optimisation du protocole a été réalisée en faisant varier les paramètres déjà connus (Figure 34, p.85) : le nombre de cycles de congélation/décongélation (37°C/-80°C), le nombre de cycle de congélation/sonication, la durée de sonication, et la durée de congélation à -80°C. Pour sélectionner un protocole, trois paramètres ont été évalués : (i) la concentration en

protéines, (ii) la non-régénération des bactéries à l'issue du protocole, et (iii) l'immunogénicité des lysats obtenus.

Premièrement, la concentration en protéines qui devait être suffisante pour pouvoir réaliser les manipulations de stimulation de l'immunité innée par les cocultures entre les lysats bactériens et les explants de peau. En effet, les conditions de cocultures précédemment établies utilisaient une concentration en lysats égale à 5 µg/mL (Jasson *et al.*, 2013). Ainsi, après chaque protocole réalisé sur les suspensions bactériennes, une quantification des protéines était réalisée afin d'avoir une concentration précise en protéines. La technique du BCA (Bicinchoninic acid Assay) était utilisée, en suivant les instructions du fournisseur (Thermo Fischer Scientific cat. #23227).

Deuxièmement, les bactéries devaient être inactivées, c'est-à-dire ne pas être cultivables sur gélose au sang à l'issue du protocole. Pour faire cette vérification, deux contrôles ont été systématiquement réalisés à la suite des protocoles et pour toutes les souches testées. D'abord, 500 µL de suspension bactérienne étaient étalés au râteau sur une gélose Schaedler afin de vérifier l'absence de croissance bactérienne après une incubation de 7 à 10 jours, en anaérobiose, à 37°C. De plus, une coloration de Gram était réalisée pour visualiser la dégradation mécanique des parois bactériennes.

A noter que ces deux contrôles (cultures et Gram) étaient également systématiquement réalisés avant de débiter chaque protocole, afin de vérifier la pureté des cultures.

Troisièmement, le protocole de réalisation des lysats bactériens sélectionné devait induire une sécrétion d'IL-8 suffisante comparée à un contrôle négatif, dans le modèle d'explant de peau précédemment décrit (Jasson *et al.*, 2013). Ainsi, la réponse inflammatoire des explants a été mesurée en dosant la sécrétion d'IL-8 dans le surnageant, représentative du niveau de réponse inflammatoire de l'explant, comme précédemment indiquée (Lee *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2018). Cette dernière étape a permis de réaliser un choix entre les différents protocoles testés. Les manipulations de création de lysats, de cocultures explants-lysats et d'analyses étant très chronophages, seuls deux essais ont été réalisés avant de sélectionner le protocole n°7 pour la suite de ces travaux de Recherche. Ainsi, certains protocoles ont été éliminés pour plusieurs raisons, soit parce que les bactéries s'avéraient viables à la suite du protocole, soit parce que la concentration en protéines était jugée trop faible pour réaliser une stimulation des explants cutanés.

Lors de cette phase d'optimisation, sept protocoles auront été testés. Toutes les conditions testées sont détaillées dans le Tableau 3 ci-après :

Protocole n°	DO de la suspension bactérienne	Lavages	Choc thermique	Cycles de congélation/décongélation	Cycles de congélation/sonication	Contrôles
1	ajustée à 1.00 ± 0.15	3 fois avec NaCl Centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min	Ø	15 cycles de congélation/décongélation (37°C/-80°C)	5 cycles de congélation/sonication (37°C/soni.1 min/-80°C)	Contrôles Gram et culture avant et après protocole
3	ajustée à 1.00 ± 0.15	3 fois avec NaCl Centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min	Choc thermique 60°C – 30 min	5 cycles de congélation/décongélation (37°C/-80°C)	Ø	Contrôles Gram et culture avant et après protocole
4	ajustée à 1.00 ± 0.15	3 fois avec NaCl Centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min	Choc thermique 60°C – 30 min	Ø	5 cycles de congélation/sonication (37°C/soni.1min/-80°C)	Contrôles Gram et culture avant et après protocole
6	ajustée à 1.00 ± 0.15	3 fois avec NaCl Centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min	Ø	15 cycles de congélation/décongélation (37°C/-80°C)	10 cycles de congélation/sonication (37°C/soni.1min30sec/-80°C)	Contrôles Gram et culture avant et après protocole
7	ajustée à 1.00 ± 0.15	3 fois avec NaCl Centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min	Choc thermique 60°C – 15 min	10 cycles de congélation/décongélation (37°C/-80°C)	5 cycles de congélation/sonication (37°C/soni.1min30sec/-80°C)	Contrôles Gram et culture avant et après protocole
8	ajustée à 1.00 ± 0.15	3 fois avec NaCl Centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min	Choc thermique 60°C – 15 min	Ø	10 cycles de congélation/sonication (37°C/soni.1min30sec/-80°C)	Contrôles Gram et culture avant et après protocole
9	ajustée à 1.00 ± 0.15	3 fois avec NaCl Centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min	Choc thermique 80°C – 10 min	Ø	Ø	Contrôles Gram et culture avant et après protocole

Tableau 3 : Récapitulatif des paramètres des différents protocoles d'obtention de lysats testés. Ø : l'étape considérée n'est pas réalisée dans le protocole étudié.

Après analyse des résultats, le protocole n°7 a été collégalement choisi en se basant sur des critères scientifiques et techniques (cf. partie Résultats). Pour confirmer cette sélection pour la suite des manipulations, des immunohistochimies ciblant les marqueurs de l'immunité innée IL-1 β , TLR-2 et β -défensine-2 ont alors été réalisées sur les explants de peau saine.

B.3 Caractérisation génétique des souches de *C. acnes*

La population de *C. acnes* présente une distribution clonale (Lomholt and Kilian, 2010; McDowell *et al.*, 2013). Elle regroupe plusieurs sous-types décrits dans la littérature et nommés « phylotypes » (Barnard *et al.*, 2015a). Ces phylotypes regroupent différents Complexes Clonaux (CC) (Lomholt and Kilian, 2010), eux-mêmes divisés en différents types SLST (Scholz *et al.*, 2014).

B.3.a Extraction d'ADN

Après décongélation des souches sur un milieu Schaedler enrichi en vitamine K1 et 5 % de sang de mouton pendant 5 jours à 37 °C en anaérobiose, une extraction d'ADN était réalisée en utilisant le kit Instagene Matrix (Bio Rad, cat. #7326030). Des colonies étaient prélevées à l'aide d'une oëse de contenance 1 µL et transférées dans un tube avec 1 mL d'eau distillée stérile. Les bactéries étaient centrifugées à 12 000 rpm pendant 1 min et le surnageant était jeté. Puis, le culot bactérien était repris dans 200 µL de réactif Instagene Matrix et incubé au bain-marie pendant 30 min à 56 °C. Ensuite, le tube était transféré dans un bain à sec à 95,0 °C pendant 8 min. Après refroidissement, le tube était vortexé 10 sec et centrifugé à 12 000 rpm pendant 2 min. Le réactif utilisé dans ce kit était une matrice appelée « résine Chelex ». Cette matrice adsorbe les produits de lyse cellulaire qui interfèrent avec le processus d'amplification de PCR, et ainsi, l'ADN se trouve dans le surnageant après la dernière centrifugation du protocole. Les tubes étaient stockés à -20 °C pour utilisation ultérieure.

B.3.b Détermination du phylotype des souches de *C. acnes*

Le phylotype a été déterminé selon la méthode développée par Barnard *et al.* en 2015 (Barnard *et al.*, 2015a). Brièvement, une PCR était réalisée en utilisant les amorces ciblant les gènes suivants (Tableau 4, p.89) : *ARN 16S* (Encoding gene), *ATPase* (ATP hydrolase), *sodA* (Superoxide dismutase), *Fic* (famille de toxines), *atpD* (ATP synthase beta chain) et *recA* (recombinase A). Après migration des produits de PCR à travers un gel d'agarose à 2 %, le phylotype était déterminé selon le profil de bandes observé (Figure 35, p.89).

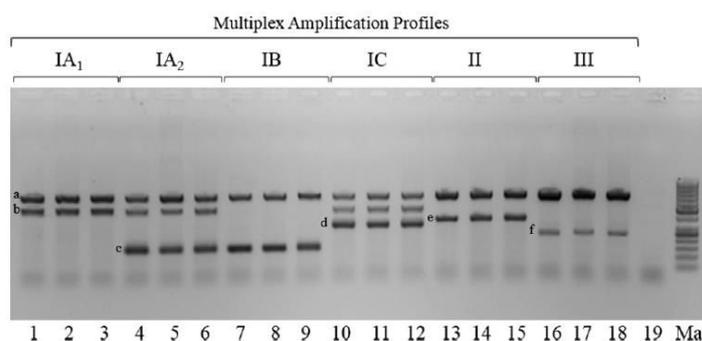


FIG 1 Multiplex PCR analysis of *P. acnes* strains (except lane 19) representing different phylogroups and STs. Lane 1, strain hdn-1 (ST1, type IA₁); lane 2, strain PRP-60 (ST20, type IA₁); lane 3, strain 76793 (ST101, type IA₁); lane 4, strain Pacn33 (ST2, type IA₂); lane 5, strain P.acn17 (ST2, type IA₂); lane 6, strain P. acn31 (ST2, type IA₂); lane 7, strain 6609 (ST5, type IB); lane 8, strain VA3/4 (ST78, type IB); lane 9, strain 74874 (ST43, type IB); lane 10, strain PRP-38 (ST70, type IC); lane 11, strain PV66 (ST85, type IC); lane 12, strain 5/1/3 (ST107, type IC); lane 13, strain ATCC 11828 (ST27, type II); lane 14, strain VA2/9N (ST28, type II); lane 15, strain 6187 (ST30, type II); lane 16, strain 12S (ST32, type III); lane 17, strain Asn12 (ST33, type III); lane 18, strain Asn10 (ST81, type III); lane 19, *Propionibacterium avidum* strain 44067. Ma, molecular size markers. ST is based on the eight-gene MLST scheme of McDowell et al. (21) and the database at <http://pubmlst.org/pacnes/>. Gene amplicons (left to right): a, 16S rRNA; b, ATPase; c, *sodA*; d, toxin; e, *atpD*; f, *recA*.

Figure 35 : Les profils obtenus lors de l'identification des phylotypes par la méthode de PCR multiplex (Barnard *et al.*, 2015).

Cibles	Amorces 5' à 3'
<i>16S rRNA</i>	AAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTA CCACCATAACGTGCTGGCAACAGT
<i>ATPase</i>	GCGTTGACCAAGTCCGCCGA GCAAATTCGCACCGCGGAGC
<i>sodA</i>	CGGAACCATCAACAAACTCGAA GAAGAACTCGTCAATCGCAGCA
<i>Fic</i>	AGGGCGAGGTCCTCTTCTACCAGCG ACCCTCCAAGTCAACTCTCCGCCT
<i>atpD</i>	TCCATCTGGCCGAATACCAGG TCTTAACGCCGATCCCTCCAT
<i>recA</i>	GCGCCCTCAAGTTCTACTCA CGGATTTGGTGATAATGCCA

Tableau 4 : Tableau répertoriant les amorces permettant de réaliser la PCR multiplex dans le cadre de la détermination du phylotype de *C. acnes* (Barnard *et al.*, 2015).

B.3.c Détermination du complexe clonal par la technique MLST des souches de *C. acnes*

Pour identifier le complexe clonal de chaque souche de *C. acnes* isolée, nous avons utilisé la technique MLST9, basé sur le séquençage partiel de neuf gènes de ménage, comprenant un total de 4287 nucléotides. Les neuf gènes de ménage ciblés, tous impliqués dans le métabolisme bactérien, sont les suivants : *cel* (Transcription regulator CelR), *coa* (O-succinylbenzoate-CoA synthase), *fba* (Fructose biphosphate aldolase), *gms* (Glutamyl-tRNA synthetase), *lac* (L-lactate dehydrogenase), *oxc* (Cytochrome c oxidase subunit II), *pak* (Pantothenate kinase), *recA* (Recombinase A), *zno* (Zn-dependant alcohol dehydrogenase). Ainsi, neuf PCR par souches ont été réalisées et les produits des PCR ont été séquencés (Tableau 5, p.90). La base de données publique répertoriant tous les complexes clonaux décrits à ce jour ainsi que les amorces utilisées pour réaliser la technique est régulièrement mise à jour est consultable sur le site internet <http://pacnes.mlst.net/> (dernière consultation le 07/05/2018).

Cibles	Amorces 5' à 3'
<i>cel</i>	GCC GAC GTT TTC TAC AGT GAG C GGC GGT GAG GGT CCA TTC A
<i>coa</i>	GCG GGA ATC GAG GGT GCT A AGG GCC GCC GCT AGA TAA GTA
<i>fba</i>	AGG ACC CGC TAT TTC AAC TCT CA ACG CGG GTC GTA CAT CTT CTT
<i>gms</i>	CCG CCT CAC CGT CCA GCA CAC ATC GAG AAC CGC ATC ACTC
<i>lac</i>	GCC GCA GCC TTG GGA CTC T GAA ATG CTG TCG CCC CGT G
<i>oxc</i>	GTG CTG CCG GAA AAG TCG CAC CGG CGT CAG GAT TGT
<i>pak</i>	CGACGC CTC CAA TAA CTT CC GTC GGC CTC CTC AGC ATC
<i>recA</i>	AGCTCGGTGGGGTTCTCTCATC GCTTCCTCATACTGGTCATC
<i>zno</i>	CGC CGG CAT CAC CAC CTA TT TCT CAC ATC GCC CGC AAC C

Tableau 5 : Tableau répertoriant les amorces permettant de réaliser les neuf PCR réalisées dans le cadre du schéma MLST9 (Lomholt and Kilian, 2010).

B.3.d Détermination du type SLST par la technique SLST des souches de *C. acnes*

Pour l'identification du type SLST de chaque souche de notre étude, nous avons utilisé la technique du SLST, publiée en 2014 par Scholz *et al.* (Scholz *et al.*, 2014). Après une simple PCR amplifiant une séquence cible de l'ADN de *C. acnes* mesurant 484 pb (Tableau 6, p.91), une étape de vérification a été réalisée par migration des produits de PCR dans un gel d'agarose à 2 %.

Cibles	Amorces 5' à 3'
<i>SLST</i>	ATATCGGCCCGTATTTGGGC CGCCATCAAGGCACCAACAA

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la PCR SLST (Scholz *et al.*, 2014).

Enfin, le séquençage de cette portion d'ADN a été réalisé afin d'obtenir une séquence assez discriminante pour conduire des études phylogénétiques (Scholz *et al.*, 2014). Les séquences de référence pour l'alignement et les amorces sont décrites dans l'interface en ligne disponible sur le site <http://medbac.dk/slst/pacnes> (dernière consultation le 07/05/2018).

B.3.e Séquençage

PCR de purification

Avant de réaliser le séquençage des amplicons obtenus, il est nécessaire de réaliser une purification des produits de PCR. Cette étape est effectuée à l'aide d'un kit contenant deux enzymes recombinantes, l'exonuclease I et la phosphatase alcaline de crevette (Biolabs Inc., cat. #E2622L). Elles permettent la dégradation enzymatique rapide et complète des amorces de PCR résiduelles et la déphosphorylation des dNTP après la PCR. Cette réaction a été effectuée dans un thermocycleur ABI 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA) en plaque sécable de 96 puits (AB-0900) et dure 30 min.

PCR de séquençage et purification

Ensuite, la PCR de séquençage d'une durée de 2h, a été réalisée. Elle a été effectuée en suivant les instructions du fournisseur du kit Big Dye Terminator (ThermoFisher Scientific, cat. #4337455). Une deuxième étape de purification a été réalisée à la suite de la PCR de séquençage. Pour se faire, un bio-gel G50 « Fine » hydraté (Sigma Aldrich, cat. #GE17-0042-

01) ainsi que des microplaques de 96 puits à filtres (Millipore MultiScreen, cat. #MAHVN4550) ont été utilisés. Les produits de PCR ont été déposés à la surface du G50 et centrifugés à 2000 rpm pendant 4 min. Les produits de PCR purifiés ont été récupérés dans une plaque de séquence (Applied Biosystems, ABGENE Thermo-Fast 96, cat. #AB-1100) et 10 µL de formamide ont été ajoutés dans chaque puit. Cette étape de purification était la dernière étape avant le séquençage final.

Etape de séquençage

Le séquençage était réalisé sur un Hitachi 3130xl-1 (Applied Biosystems, Foster City, USA). A la suite de chaque séquençage (séquences pour schéma MLST9 ou SLST), chaque séquence a été analysée une par une, sur le logiciel Seqscape v2.5 (Applied Biosystems) avant d'être comparée à la base de données en ligne et conclure sur l'identification recherchée (complexe clonal à la suite de la technique MLST ou le type SLST à la suite de la technique SLST).

B.4 Etude de la capacité de production de biofilm par les souches de *C. acnes*

La capacité de production de *C. acnes* est connue au travers de la littérature scientifique (Bayston *et al.*, 2007; Okuda *et al.*, 2018; Spittaels and Coenye, 2018). En revanche, la production de biofilm en fonction des différents sous-groupes de *C. acnes* n'est pas décrite. Ainsi, plusieurs questions intéressantes avec un impact certain sur la prise en charge des patients, restent à explorer. Par exemple, le phylotype IB de *C. acnes*, qui est connu pour être impliqué plus particulièrement dans le développement d'infection ostéo-articulaire de l'épaule, est-il plus producteur de biofilm qu'un phylotype IA1, connu pour être impliqué plus particulièrement dans l'acné ? Cette investigation a d'abord été menée grâce à la technique du crystal violet, qui a longtemps été utilisée comme méthode standard pour l'étude de la production du biofilm bactérien (Coenye *et al.*, 2007; Stepanović *et al.*, 2007). La technique du crystal violet repose sur la coloration de la biomasse totale ayant adhéré à la surface plastique du puit, à un temps donné. La biomasse ainsi colorée contient aussi bien les bactéries vivantes, mortes, et l'exopolysaccharide produit. Pour cette coloration, nous avons utilisé un réactif nommé Violet de Gentiane (ou crystal violet) (Sigma Aldrich, cat. # V5265-500ML). Néanmoins, cette procédure est fastidieuse, chronophage, et génère un volume

important de déchets toxiques. Après plusieurs essais pour tenter de mettre au point cette technique, nous avons donc décidé d'utiliser une autre technique, celle développée par la société BioFilm Control®.

La méthode d'étude des biofilms développée par Biofilm Control est appelé BioFilm RingTest. Cette méthode ne donne pas la même information que celle du crystal violet. Le Biofilm RingTest indique en effet la capacité d'adhérence, dans les premières phases d'adhérence de la bactérie, à la surface de la plaque où elle a été incubée. A l'inverse, la méthode du crystal violet donne une indication à un temps donné, de la production de biofilm au bout de 24, 48, ou 72h. Le BioFilm RingTest donne un score appelé « BFI », et indique ainsi le niveau de production de biofilm de la bactérie. Un BFI proche de 0.00 indique un niveau de production de biofilm élevé, alors qu'un BFI proche de 20,00 indique un niveau de production de biofilm faible.

B.5 Etude du microbiote cutané des patients atteints d'acné sévère *versus* sujets sains

Les échantillons de flore cutanée réalisés à la surface de la peau des patients atteints d'acné sévère du dos et des sujets sains, sur le dos et le visage, ont été exploités par le département R&D de Galderma. A la suite de leurs analyses, un partage des données a été réalisé et nous avons procédé à des analyses plus détaillées du microbiote cutané grâce à une collaboration avec le Dr E. Montassier (CHU de Nantes). Pour se faire, nous avons utilisé le logiciel Qiime (<https://qiime2.org/> dernière consultation le 26/04/2018). Cette expérience m'a permis de me former à l'analyse métagénomique des communautés bactériennes grâce à un logiciel d'analyses validé par la littérature scientifique (McDonald *et al.*, 2018). Ces analyses bioinformatiques complexes ont été réalisées en suivant cinq étapes principales (Figure 36, p.94) :

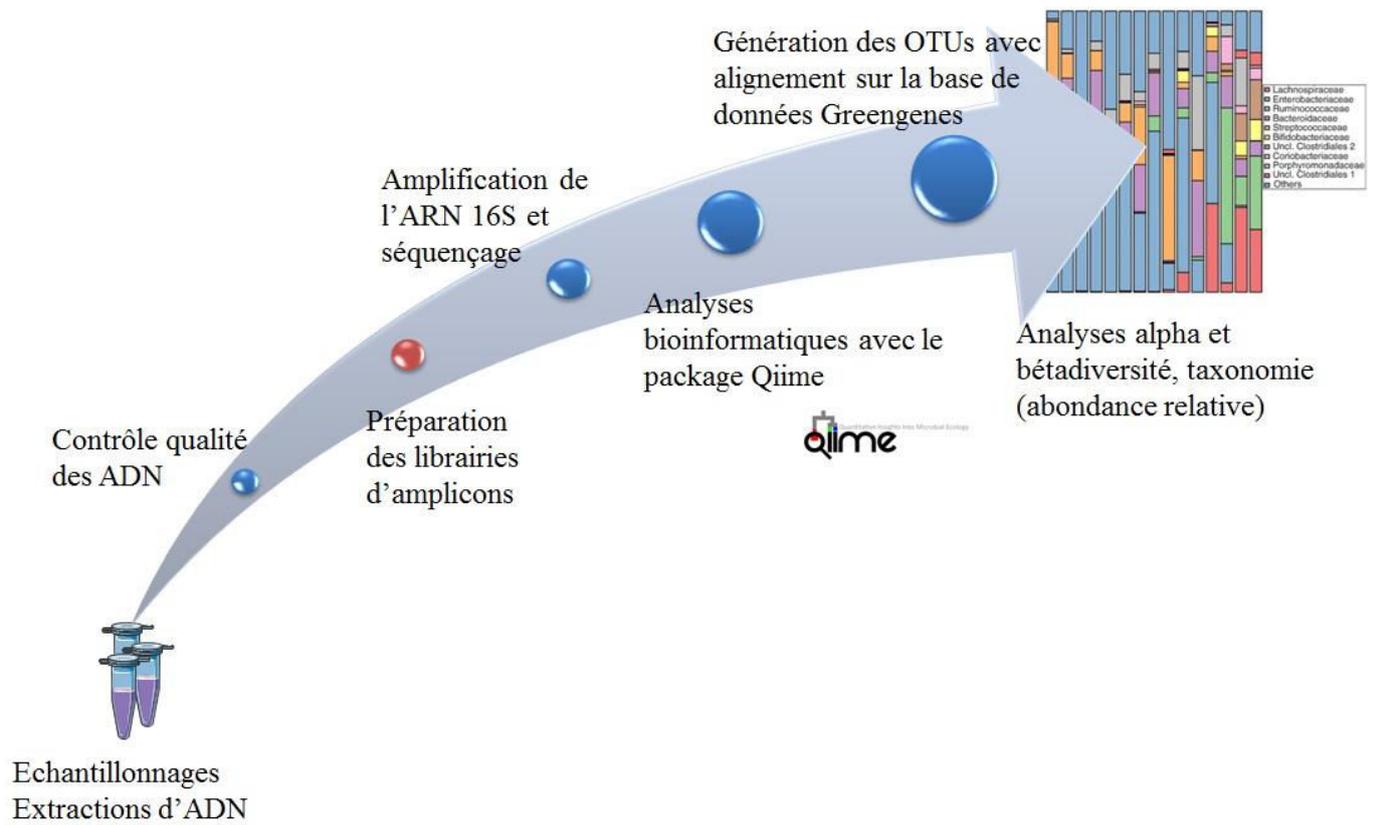


Figure 36 : Schéma représentatif des différentes étapes menées pour l'analyse de l'alpha et bêta diversité, ainsi que l'abondance relative des communautés bactériennes retrouvées dans les échantillons.

V. Résultats

A. Etude microbiologique

Sur le plan microbiologique, ce travail de la Thèse a consisté à réaliser une caractérisation moléculaire exhaustive des isolats de *C. acnes* retrouvés chez les 24 patients atteints d'acné sévère du dos, ainsi que chez les 12 volontaires sains inclus dans l'étude, au niveau du dos et du visage. Sur les 72 échantillonnages réalisés, nous avons obtenu des bactéries en culture pour 100 % des échantillons, et 68 souches de *C. acnes*.

Le deuxième travail a consisté à mettre au point une procédure standardisée pour l'obtention d'extraits membranaires de *C. acnes* à partir d'une suspension bactérienne homogène.

A.1 Résultat de la mise au point d'une méthode pour créer des lysats bactériens

Les premiers lysats ont été générés en utilisant la souche ATCC6919. Malheureusement, ils présentaient des concentrations en protéines très faibles, de l'ordre de 30 µg/mL (Figure 37, p.97). Cette valeur n'était pas cohérente avec les dosages en protéines des lysats précédemment utilisés au laboratoire. Les protocoles concernés ont donc été exclus pour la poursuite de la mise au point. Un autre problème s'est très vite présenté, la viabilité des bactéries lors des contrôles que nous faisons après le protocole, incompatible avec nos cultures dans les incubateurs partagés du laboratoire. Ces protocoles ont donc été également exclus pour la poursuite de la mise au point.

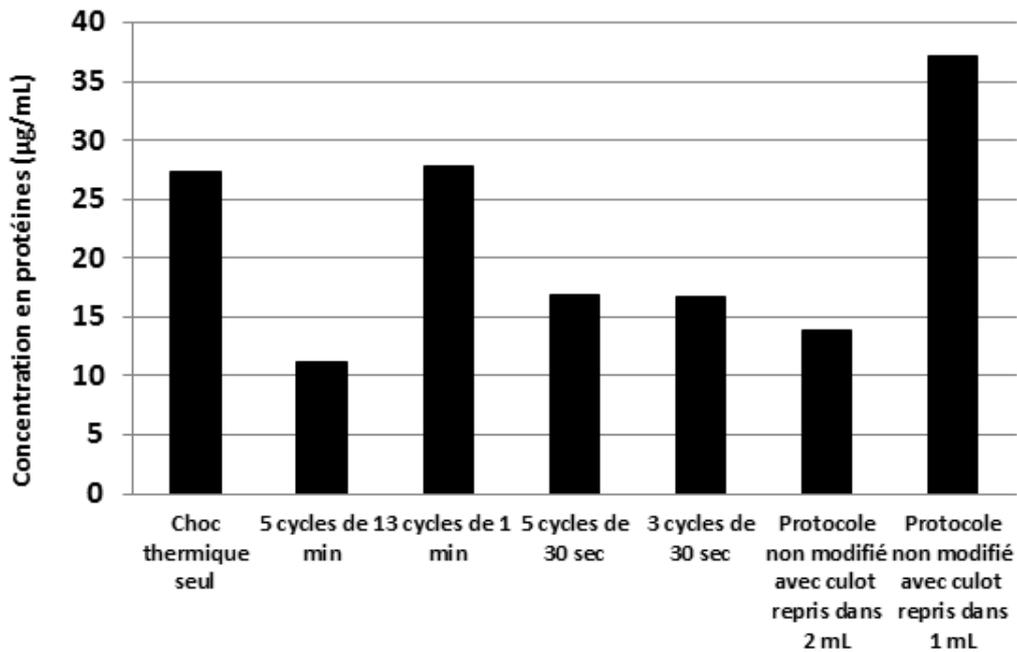


Figure 37 : Résultats des premiers tests du protocole d'obtention de lysats de *C. acnes* (souche ATCC 6919).

La première phase d'optimisation a été réalisée avec une souche de patient (A11), et deux souches de référence ATCC (6919 et 11827). Nous avons d'abord voulu tester l'impact du volume de reprise du culot contenant la fraction membranaire (celle qui nous intéresse) dans un volume final plus faible afin de concentrer les lysats. De ce fait, après la réalisation d'un même protocole, nous avons repris le culot de lysats dans un volume de PBS plus faible que précédemment (5 mL au lieu de 10 mL comme précédemment préconisé).

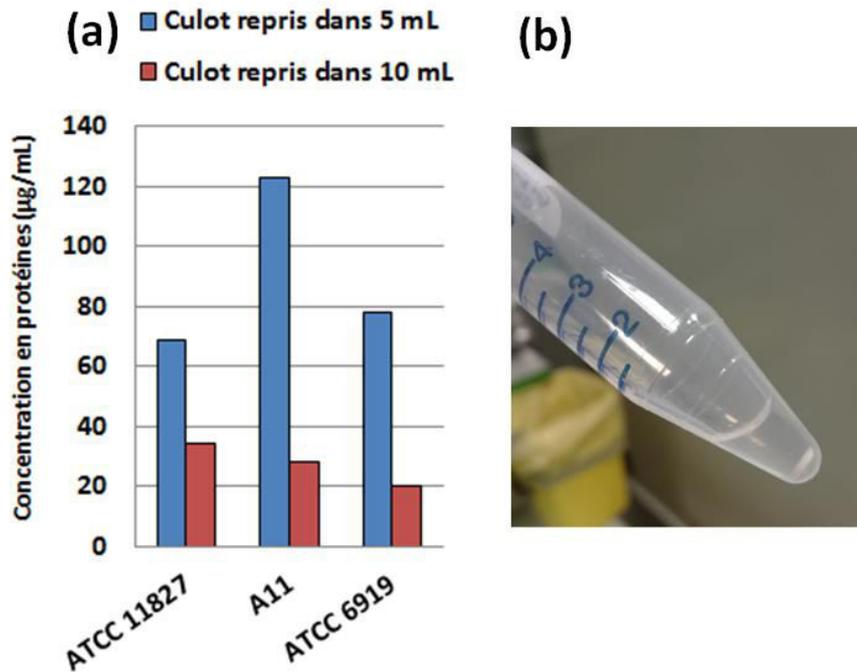


Figure 38 : (a) Concentration en protéines mesurées après protocole de création de lysats membranaires à partir d'une souche de *C. acnes* isolée chez un patient (A11) et deux souches de références (ATCC 6919 et ATCC 11827). Résultats obtenus après reprise du culot de lysats dans 5 mL ou 10 mL. Les concentrations en protéines ont été déterminées par BCA assay. (b) Photographie du culot contenant la fraction membranaire de *C. acnes*, à l'issue du protocole testé.

Les résultats montrent une amélioration de la concentration en protéines. En effet, les lysats membranaires obtenus *via* ce protocole présentent une concentration en protéines plus importantes lorsque le culot final est repris dans 5 mL comparé à 10 mL (Figure 38, p.98). Par exemple pour la souche ATCC 11827, la concentration en protéines atteint 68,6 µg/mL après reprise du culot dans 5 mL, alors que la concentration atteint seulement 34,64 µg/mL après reprise dans 10 mL. De même, pour la souche ATCC 6919, la concentration atteint 78,3 µg/mL après reprise du culot final dans 5 mL alors qu'elle atteint seulement 20,35 µg/mL après reprise dans un volume de 10 mL. Compte tenu de la corrélation entre le volume final de reprise du culot et la concentration en protéines, il a été décidé de reprendre le culot final dans 1 mL de PBS pour satisfaire la nécessité d'une concentration en protéines de 5 µg/mL utilisée lors des tests de stimulation avec les explants.

A la suite de cette première étape, plusieurs autres paramètres ont été testés, notamment le nombre de cycles de congélation/décongélation, le nombre de cycles de sonication/congélation, la durée de sonication, et la durée de congélation à -80°C. Pour se

faire, sept protocoles ont été testés en utilisant les deux souches de références ATCC 6919 et ATCC 11827. Dans un premier temps, nous avons testé la concentration en protéines obtenues après les sept protocoles (Figure 39, p.99).

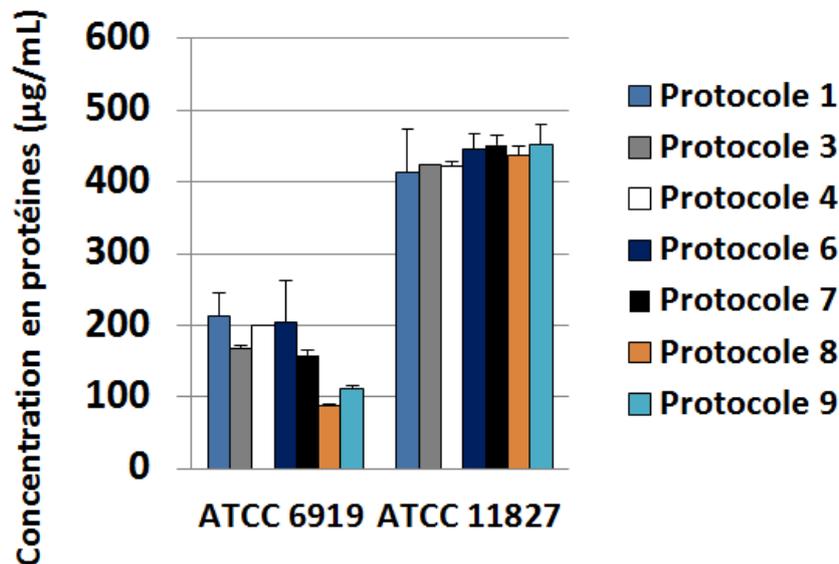


Figure 39 : Résultats de concentrations en protéines totales obtenus par méthode du BCA. Deux souches de *C. acnes* ont été utilisées : ATCC 11827 et ATCC 6919.

A cette étape d'optimisation et de manière surprenante, nous avons trouvé que la concentration en protéines était plus souche-dépendante que protocole-dépendante. En effet, peu importe le protocole utilisé, les lysats créés à partir de la souche ATCC 11827 ont démontré une concentration plus forte que ceux créés à partir de la souche ATCC 6919. Par exemple, la souche ATCC 11827 est celle qui a démontré les plus fortes concentrations en protéines observées, allant de 414,3 à 452,1 µg/mL avec les protocoles n°1 et n°7, respectivement. La souche ATCC 6919 a quant à elle, présenté des concentrations en protéines plus faibles allant de 88,3 à 213,1 µg/mL avec les protocoles n°8 et n°1, respectivement (Figure 39, p.99). Après cette première phase de test, nous avons collectivement décidé d'exclure les protocoles n°1 et n°6 pour des raisons de temps de manipulations car il s'agissait des protocoles les plus longs. L'optimisation a donc été poursuivie sur les protocoles n°3, 4, 7, 8 et 9. Grâce au modèle d'explant de peau *in vitro*, nous avons pu évaluer le potentiel immunogène des extraits membranaires issus de ces différents protocoles. De cette manière, la réaction inflammatoire a été mesurée par technique

ELISA, en dosant l'IL-8 libérée par les explants de peau après 6h d'incubation (Figure 40, p.100).

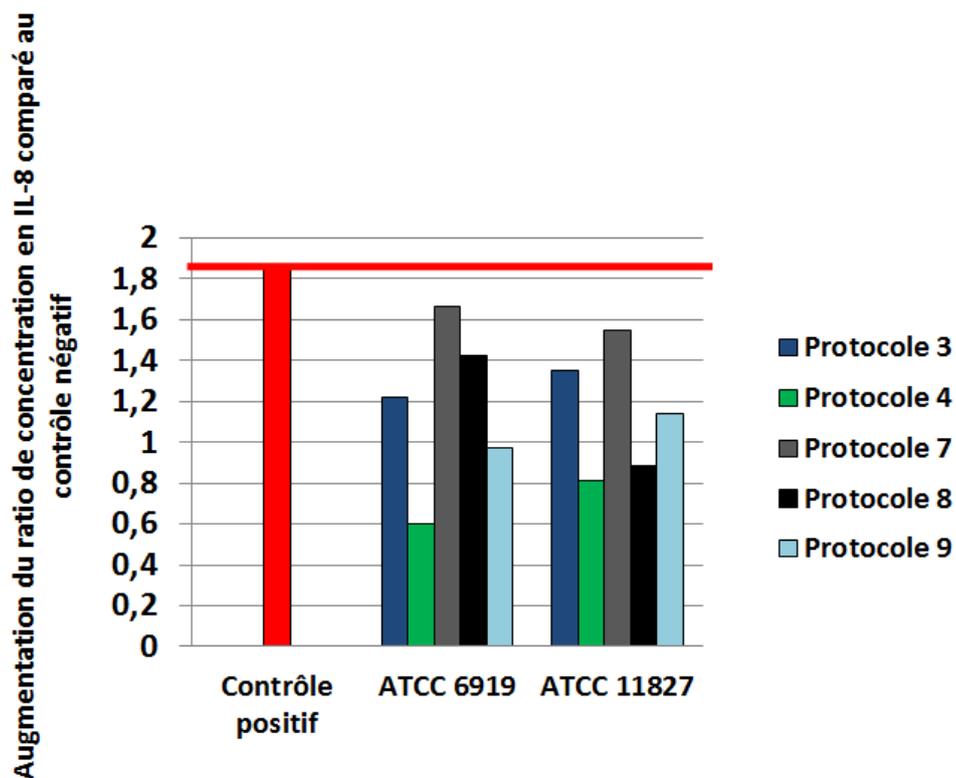


Figure 40 : Dosage de la cytokine IL-8 dans les surnageants de culture lors du test des protocoles n°3, 4, 7, 8 et 9. Les résultats sont présentés sous la forme de ratio en prenant comme référence le contrôle négatif.

A la suite de cette phase d'optimisation, nous avons sélectionné le protocole n°7 pour la suite des manipulations de la Thèse. Avant de débiter les manipulations à proprement dit, nous avons réalisé une dernière expérience de validation de ce protocole, grâce à des immunohistochimies pratiquées sur les explants de peau saine mise en contact avec les lysats membranaires de *C. acnes* issus du protocole n°7. Pour se faire, nous avons ciblé l'IL-1 β , le TLR-2 et la β -défensine-2, communément retrouvés dans les lésions inflammatoires d'acné et caractéristiques d'une inflammation cutanée. Les résultats de l'IHC sont présentés sous forme de photos qui ont été prises sur des lames représentatives du marquage observé (Figure 41, p.101).

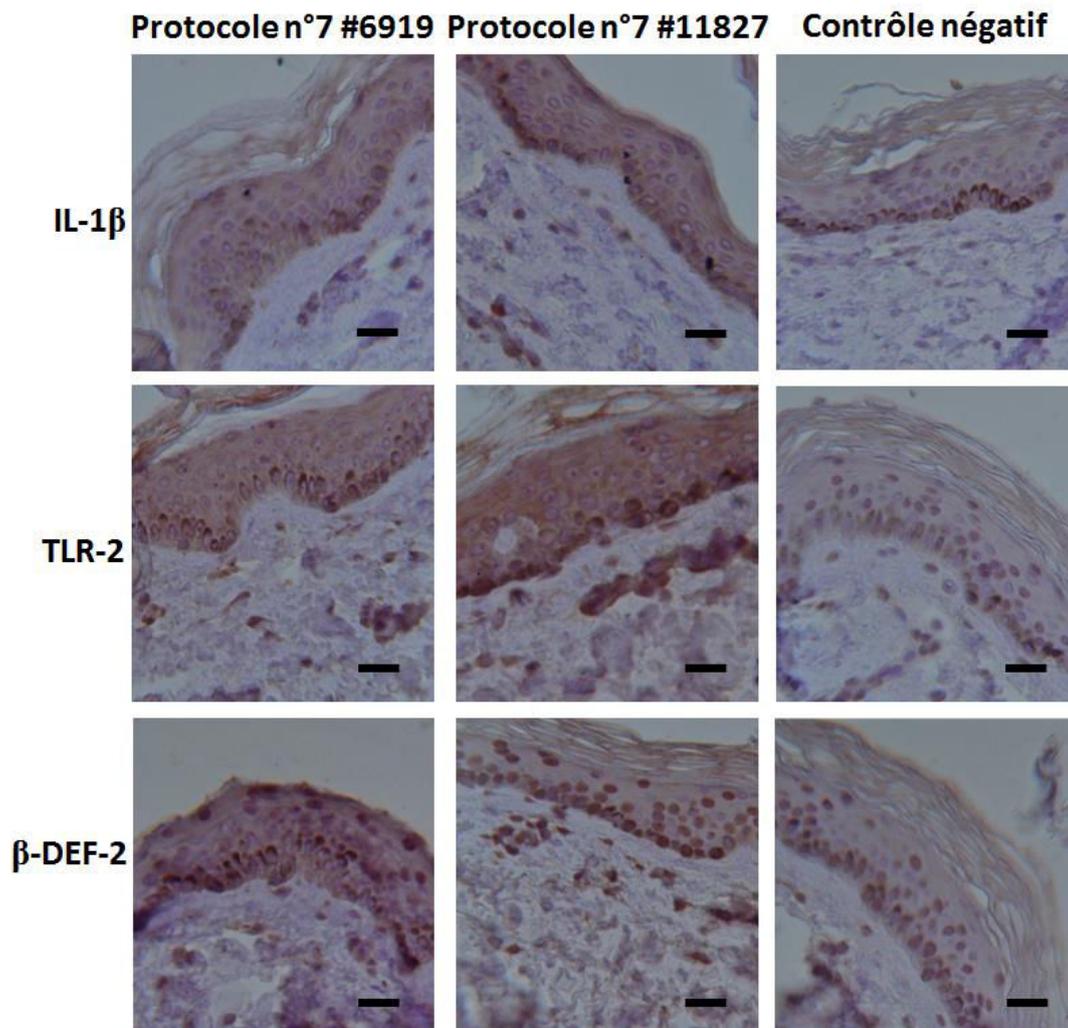


Figure 41 : Photographies de lames d'IHC pratiquées sur des explants de peau après contact avec différents lysats créés avec le protocole n°7 d'obtention d'extraits membranaires de *C. acnes*. La barre d'échelle représente 300 μ m.

Les marqueurs IL-1 β , TLR-2 et β -défensine-2 étaient clairement plus exprimés dans les explants mis en contact avec les extraits membranaires de *C. acnes* réalisés par le protocole n°7 comparé au contrôle négatif. Cette observation a été confirmée par deux lecteurs de lames indépendants. Par conséquent, nous avons confirmé la capacité du protocole n°7 à obtenir des extraits membranaires capables d'induire une activation du système immunitaire innée au niveau de l'explant de peau.

La mise au point de ce protocole de création d'extraits membranaires de *C. acnes* a fait l'objet d'un article qui est actuellement soumis pour une publication dans le journal intitulé « **Anaerobe** ».

Points de synthèse

- La mise au point du protocole de création d'extraits membranaires de *C. acnes* aura pris un peu plus d'un an de travail.
- La validation du protocole en question s'est basée sur l'évaluation de trois critères : (i) la concentration en protéines, (ii) la non-viabilité des bactéries à l'issue du protocole, et (iii) l'immunogénicité des lysats obtenus.
- Le protocole n°7 a été sélectionné et a été utilisé pour la suite des manipulations. Il comprenait un choc thermique à 60°C pendant, 15 min, suivi de 10 cycles de congélation/décongélation (37°C/-80°C), puis 5 cycles de congélation/sonication (37°C/soni.1min30sec/-80°C).

**Assessment of seven protocols to prepare *Cutibacterium acnes* cell wall membrane
extracts and review of the literature**

Marie-Ange Dagnelie, Amir Khammari, Brigitte Dréno, Stéphane Corvec

Article soumis à Anaerobe

Anaerobe

2 Original research article

4 **Assessment of seven protocols to prepare *Cutibacterium acnes* cell wall membrane
extracts and review of the literature**

6

8 Marie-Ange Dagnelie¹, Amir Khammari¹, Brigitte Dréno¹, and Stéphane Corvec^{2*}

¹ Dermatology department, CHU Nantes, CIC 1413, CRCINA, University Nantes, Nantes France

10 ² Bacteriology department, CHU Nantes, CRCINA, University Nantes, Nantes France

12 Keywords: *Cutibacterium acnes*; cell wall membrane; bacterial extract; innate immunity; skin
explants; inflammation; biomarkers

14

16 2379 words

18 *Correspondance: Dr Stéphane Corvec

Institut de Biologie des Hôpitaux de Nantes, Service de Bactériologie-Hygiène Hospitalière

20 CHU de Nantes

9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01, France

22 Email: stephane.corvec@chu-nantes.fr

Tel: +33.2.40.08.39.55

24

Abstract

26 Seven protocols were developed to prepare cell wall extracts from live *Cutibacterium acnes*. Different
parameters were modified: thawing/freezing and sonication/freezing cycles, to impact on mechanical
28 degradation of the bacteria. Finally, the immunogenic potential of the extracts generated was evaluated
by measuring IL-8 releases using an *in vitro* skin explants system. The aim of this review was to
30 compare these different protocols.

32

34

36

38

40

42

44

46

48

50 **Introduction**

51 *Cutibacterium acnes* is a Gram-positive bacterium growing in anaerobiosis. Although it is known to
52 be part of the normal skin microbiota and considered as less-pathogenic but strongly pro-
inflammatory, *C. acnes* is suspected to be involved in several inflammatory dermatosis(1–3)
54 Moreover, *C. acnes* strains have been also isolated in non-skin diseases (4–6). This way, *C. acnes*
study showed increased interest, because of its potential implication in a panel of human diseases.

56 At a technical level, the study of *C. acnes* involvement in diseases requires a way to use bacteria in *in*
vitro cocultures devices (*i.e.* with human/mice cells or skin explants). However, to avoid bacterial
58 contamination and for security problems, using live and viable bacteria in laboratories remains
difficult, when incubators are shared. Indeed, live bacteria should not be used because of
60 contamination risks spreading to other cell cultures. Also, working with bacterial fractions instead of
live bacteria enables the use of antibiotics in cell cultures, which is technically interesting to avoid
62 recurrent contaminations during cell culture process. Currently, there is a wide range of methods
existing in the scientific literature to create bacterial lysates. This lysates procedure suggests the
64 possibility to the development of a vaccine for severe acne. This way, there is an obvious need to
standardize the method and assess protocols to propose a standardized procedure.

66 This article focuses on the existing procedures, and proposes a method based on our experiences and
results, to obtain immunogenic *C. acnes* bacterial fractions from live bacteria, ready to use for *in vitro*
68 experiments. The evaluation of the protocols was mainly performed by characterizing them according
to their action on skin innate immunity using an *in vitro* skin explant model.

70

Diversity of methods according to the scientific literature

72 There is a real diversity of protocols existing in the literature, to obtain *C. acnes* bacterial lysates from
live bacteria. In total, nine articles describing cocultures between bacteria and cells or explants were
74 analyzed to have an overview of the methods used. They are all described as a way to “inactivate” the
bacteria and obtain bacterial extracts, but they are differently named. All the names and the procedures
76 used in the analyzed articles are summarized in the Table 1. For example, Gambero et al., used a

method based on the inactivation of *C. acnes* during 20 min at 120 °C (7). On the other hand, Nagy et al. used a method based on a heat-shock at 60°C during 30 min (8). From the nine analyzed articles, only one of them performed some purity controls to exclude the interference of LPS from Gram-negative bacteria. Huang et al. harvested *C. acnes* from the culture broth, extracted total DNA and amplified the 16S rRNA fragment using PCR. Thanks to this method, they checked that besides the 16S rRNA formed by *C. acnes*, no other fragment existed. For culture step, several culture media were used, from Reinforced Clostridial Media (9,10), to Brain Heart Infusion (11–13). All the detailed procedures analyzed in the nine articles are summarized in the table 1.

Regarding the large diversity of methods existing to create cell-free extracts from live bacteria, seven protocols were assessed to prepare *Cutibacterium acnes* cell wall membrane extracts. This protocol includes heat-shock, freezing/thawing cycles, and freezing/sonication cycles.

88

Material and methods

Bacterial strains

To test the different procedures to obtain bacterial fragments, two reference strains were used: *C. acnes* ATCC6919 and ATCC11827.

Procedure

First of all, bacteria were isolated on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042) and incubated in anaerobic conditions using the Anaerobia GasPak System (BD, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France, cat. #260683) for 5-7 days at 37°C. Then, isolated colonies were inoculated in BHI broth for 3-4 days and incubated in agitated warm-bath at 37°C to reach the bacterial stationary phase. After Gram and cultures controls, bacteria were centrifuged at 4000 rpm during 15 min at 10°C. Bacterial pellets were washed thrice in sterile 0.9 % sodium chloride solution (Versylene Fresenius B230561). All bacterial suspensions were calibrated at OD 1.00 (bioMérieux, Densichek Plus, 580 nm) and aliquoted by 10 mL in sterile plastic tubes (CELLSTAR Tubes cat. #188271). These aliquots were first heat-shocked at 60 °C during 15 min and then entered into 10

freezing/thawing cycles (-80°C during at least 45 min, and thawing at 37 °C in warm-bath without
104 agitation). Then, 5 freezing/sonication cycles were performed, each sonication cycle last for 90 sec
and then tubes were frozen for at least 45 min. Tubes were then centrifuged at 4000 rpm during 15
106 min, and pellets were separated from supernatants. Pellets and supernatants were separately kept at -
80°C. Before using, pellets were resuspended into a final volume of 1 mL in D-PBS, and proteins
108 quantitation was performed by BCA assay. All used materials and references are summarized in table
3.

110 *BiCinchoninic acid Assay (BCA) for protein quantification*

To use our bacterial fractions at a specific concentration, the protein concentrations were determined.
112 Bovine Serum Albumin was used as standard controls for each experiment and a standard curve was
designed from 0 to 2000 µg/mL to deduce each sample protein concentration, according to the
114 manufacturer's instructions (Pierce BCA Protein Assay Kit, cat. #23227 Thermo Scientific).

Test on skin explant system

116 Skin explants from healthy patients were obtained from the Plastic Surgery Department at Nantes
University Hospital. To assay whether our different procedures properly create immunogenic bacterial
118 lysates able to stimulate skin innate immunity, they were tested on healthy skin and the inflammation
response was measured by quantitation of IL-8 released in culture supernatants. Skin explants system
120 was used as previously described (14,15). As positive control, explants were also incubated during 6h
with LPS from *Escherichia coli* (Sigma Aldrich, cat. #L4391-1MG). As negative control, skin
122 explants were incubated without any bacterial lysate, in the same media as the other explants.

Cytokines quantitation's in supernatants

124 To determine the inflammation induced by the different lysates procedures, it was decided to
determine the IL-8 produced by explants because it is considered as well illustrating the inflammation
126 level in the skin in response to *C. acnes* stimulation. This way, the evaluation of the inflammation
potential of each lysates created by different procedures was performed. The IL-8 was quantified by
128 ELISA assay, using the ready-set-go! kit according to manufacturer's instructions (Invitrogen by
ThermoFisher Scientific cat. #88-8086-22).

130 *Samples preparation before immunohistochemistry*

The procedure was further validated using ImmunoHistoChemistry (IHC), testing the markers IL-1 β (Abcam, cat. #ab2105), TLR-2 (SantaCruz, cat. # sc-10739) and β -defensin-2 (Abcam, cat. # ab63982). Samples were prepared and IHC were performed as previously reported (14,15). Slides were read by two independent readers on a microscope (Leitz, Aristoplan).

Bacterial controls

136 Controls were performed all along the procedure to monitor the cultures pureness. After bacteria cultures, controls were performed on Schaedler agar cultures (kept for 5-7 days) and Gram-staining to make a morphological control before starting the lysates creation procedure. These controls were made with Gram staining and cultures (BD, cat. #254042) at the same time. Cultures were incubated at least 140 7 days at 37 °C in anaerobiosis using the Anaerobia GasPak System.

After cycles, morphological and Gram-staining controls were performed, and cultures were performed on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood, to verify the non-regeneration of the bacteria (viability study).

144

Results

146 *Protein concentration obtained after lysate procedure is strain-dependant*

After each protocol, the first step was the control of the mechanical degradation of the bacteria that released an appropriate amount of proteins to be usable in future experiments. A protein quantification was performed by BCA assay. The strain ATCC 11827 showed the highest protein concentration ranging from 414.3 to 452.1 μ g/mL with protocols n°1 and n°7, respectively. In parallel, strain ATCC 6919 showed weak protein concentration ranging from 88.3 to 213.1 μ g/mL with protocols n°8 and protocol n°1, respectively. Thus, no matter the used protocol, the protein concentration seemed to be strain-dependent (Figure 1).

154 After this step, both protocols n°1 and n°6 were excluded due to turnaround time. The investigations about immunogenicity potential were continued with the rest of the protocols (n°3, 4, 7, 8, and 9).

156

Development and selection of one protocol

158 With IL-8 quantifications in the supernatants, different pattern of inflammatory response appeared
according to the protocol used to create the bacterial extracts. To select one specific protocol, several
160 criteria were taken into account: the turnaround time, the protein concentration obtained, the
reproducibility inter-species (ATCC6919 and ATCC11827) and more importantly, the modulating
162 effect of the lysates obtained on skin innate immunity. To assess whether lysates were pro-
inflammatory or not, the negative control was taken as a reference threshold, and all IL-8 release
164 superior to this baseline (red line in figure 2) were considered as a positive inflammatory response.

First of all, protocols n°3 and n°7 induced a clear increase in IL-8 released by the skin explants, with
166 both ATCC6919 and ATCC11827 strains, comparing with the negative control (Figure 2). For
example, lysates created by the protocol n°7 induced 1.6-fold (ATCC6919) and 1.5-fold
168 (ATCC11827) more IL-8 releases by the explants than the negative control.

On the other hand, protocols n°8 and n°9 induced an IL-8 increase but only with one strain. It means
170 that there was not the same efficacy for both strains using these two protocols. Finally, protocol n°4
was considered as closely “neutral”, because the IL-8 release was inferior to the negative control, after
172 incubation with both strains.

Taken together, these data suggest that, in our hands, protocol n°7 is the most adequate and the most
174 closely to the parameters mentioned for the validation of a specific procedure.

To further validate the immunogenicity of the lysates created, immunohistochemistries were
176 performed targeting innate immune markers, including TLR-2 (Toll-Like Receptor 2), β -defensin-2
and IL-1 β (Figure 3).

178 Comparing with the negative control, an overexpression of the three tested markers was observed with
the explant incubated with the lysates created by the selected protocol, suggesting that protocol n°7
180 does create lysates with a significant immunogenic potential.

Taken together, these data show that protocol n°7 presents an appropriate turnaround time, creates a
182 usable protein concentration (150-450 μ g/mL), and is reproducible from one strain to another
(ATCC6919 and ATCC11827).

184 **Discussion**

Preparation of cell-free extracts from live bacterial suspensions presents unique difficulties. However, 186 for hygiene and security reasons, it is important to set up reliable methods to obtain bacterial lysates to perform the needed experiments. Regarding the current scientific literature, plenty of methods exist to 188 obtain cell-free extracts from Gram-positive bacteria, from mechanical disruptions to enzymatic degradations (10,16,17).

190 This article proposes a method to create lysates from a live *C. acnes* bacterial suspension. The strength of our method focuses on the controls included along the procedure, enabling to monitor the purity and 192 the bacteria degradation along with the protocol. Moreover, our method does not use any enzymatic reaction, this way, it avoids a subsequent step of proteins isolation before using on cell cultures, 194 allowing to obtain ready-to-use bacterial fractions for experiments.

This study shows that protein concentration is strain-dependent. This observation raises the question of 196 each strain quality membrane. The type and the quantity of protein found in each strain of *C. acnes* seem to be different. Interestingly, some articles already describe the differences existing between the 198 quality of surface proteins, especially concerning *C. acnes* subpopulations (10). This way, it could be a hypothesis to explain the variations in protein concentration after the different procedures, from one 200 strain to another. In addition, protocol n°9 induced a very weak inflammatory response. Interestingly, protocol n°9 consisted in a high-temperature heat-shock, at 80°C during 10 min. This way, it is 202 assumed that high-temperature may be able to denature the potential immunogenic proteins and that the lysates are not immunogenic anymore.

204 Regarding the scientific literature, freezing/thawing cycles were not used at all for cell-free extracts preparations. However, temperature shocks are widely used when bacterial walls degradation is 206 needed, especially for bacterial transformation. Indeed, it has been shown that sudden temperature changes were able to alter the fluidity of the semi-crystalline membrane state achieved at 0°C. During 208 transformation protocol, it allows the DNA molecule to enter the cell through the zone of adhesion. This way, it appears that temperature shock is able to mechanically degrade bacteria cell membrane, 210 and this way, is a useful step to create cell-free extracts.

On the other hand, other mechanical disruption procedures including sonication, blending/grinding
212 with abrasives, or agitation with glass beads (16) have been successfully used with a variety of
bacteria (17–20). Sonication continues to be described as a method to mechanically disrupt the
214 bacterial membrane and inactivate bacteria, with moderate to highly-efficient results, considering
either Gram-positive or Gram-negative bacteria. For example, it has been recently reported for
216 *Enterococcus faecalis* (21) and also for *Escherichia coli* (22). According to recent data, it is interesting
to mention that Huang et al. performed the sonication step on ice, which appears to be the best
218 method, notably to avoid biohazard problems associated with generation of aerosols, but also to avoid
heat production when performed on long period of time (9). Taken together, these data show that
220 freezing-thawing cycles and sonication cycles both appear as an efficient method to mechanically
disrupt and degrade bacteria cell walls, and this way it is relevant to include both of them in a protocol
222 to create cell-free extracts, especially for a Gram-positive microorganism with a robust cell-wall
structure.

224 Concerning the reproducibility of the proposed procedure, this study reports that other strains were
also tested and lysates were successfully obtained with *Cutibacterium granulosum* and *Cutibacterium*
226 *namnetense* (data not shown).

Finally, in this study, experimental conditions to obtain cell-free extracts from a live bacterial
228 suspension of *C. acnes* were identified, including a heat-shock (60°C during 15 min), 10
freezing/thawing cycles (-80°C), and 5 sonication/freezing cycles (1min30sec). Both the protein
230 concentration obtained were verified, and the immunogenicity of the created lysates using an *in vitro*
human skin explant model. Moreover, morphological and purity controls were performed all along the
232 procedure using Gram staining and culture on blood agars.

To conclude, our study offers a standardized and controlled method to create immunogenic bacterial
234 membrane extracts from a living bacterial suspension, allowing firstly to use them in a shared
incubators avoiding contamination risks and secondly to use them as therapeutic tools for vaccines
236 development in severe acne context.

238 **References**

- 240 1. Lomholt HB, Kilian M. Population Genetic Analysis of *Propionibacterium acnes* Identifies a
 242 Subpopulation and Epidemic Clones Associated with Acne. PLoS ONE [Internet]. 2010 Aug 19
 [cited 2016 Jul 13];5(8). Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2924382/>
- 244 2. Frenard C, Dagnelie M-A, Khammari A, Saint-Jean M, Boisrobert A, Corvec S, et al. Do
Cutibacterium acnes and *Staphylococcus aureus* define two different types of folliculitis? J Eur
 Acad Dermatol Venereol JEADV. 2018 Jan 16; 10.1111/jdv.14793.
- 246 3. Barnard E, Liu J, Yankova E, Cavalcanti SM, Magalhães M, Li H, et al. Strains of the
 248 *Propionibacterium acnes* type III lineage are associated with the skin condition progressive
 macular hypomelanosis. Sci Rep. 2016;6:31968.
- 250 4. Aubin GG, Baud'huin M, Lavigne J-P, Brion R, Gouin F, Lepelletier D, et al. Interaction of
Cutibacterium (formerly *Propionibacterium*) *acnes* with bone cells: a step toward understanding
 bone and joint infection development. Sci Rep. 2017 Feb 20;7:42918.
- 252 5. Minegishi K, Watanabe T, Furukawa A, Uchida K, Suzuki Y, Akashi T, et al. Genetic profiles of
 254 *Propionibacterium acnes* and identification of a unique transposon with novel insertion sequences
 in sarcoid and non-sarcoid isolates. Sci Rep. 2015 May 12;5:9832.
- 256 6. Mak TN, Yu S-H, De Marzo AM, Brüggemann H, Sfanos KS. Multilocus Sequence Typing
 (MLST) Analysis of *Propionibacterium acnes* Isolates From Radical Prostatectomy Specimens.
 The Prostate. 2013 May;73(7):770–7.
- 258 7. Gambero M, Teixeira D, Butin L, Ishimura ME, Mariano M, Popi AF, et al. *Propionibacterium*
 260 *acnes* induces an adjuvant effect in B-1 cells and affects their phagocyte differentiation via a
 TLR2-mediated mechanism. Immunobiology. 2016 Sep;221(9):1001–11.
- 262 8. Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, et al. *Propionibacterium acnes* and
 lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory
 cytokines/chemokines in human sebocytes. Microbes Infect. 2006 Jul;8(8):2195–205.
- 264 9. Huang Y-C, Yang C-H, Li T-T, Zouboulis CC, Hsu H-C. Cell-free extracts of *Propionibacterium*
 266 *acnes* stimulate cytokine production through activation of p38 MAPK and Toll-like receptor in
 SZ95 sebocytes. Life Sci. 2015 Oct 15;139:123–31.
- 268 10. Yu Y, Champer J, Agak GW, Kao S, Modlin RL, Kim J. Different *Propionibacterium acnes*
 phylotypes induce distinct immune responses and express unique surface and secreted proteomes.
 J Invest Dermatol. 2016 Jul 1; 10.1016/j.jid.2016.06.615.
- 270 11. Kitagawa H, Yamanaka K, Kakeda M, Inada H, Imai Y, Gabazza EC, et al. *Propionibacterium*
 272 *acnes* vaccination induces regulatory T cells and Th1 immune responses and improves mouse
 atopic dermatitis. Exp Dermatol. 2011 Feb;20(2):157–8.
- 274 12. Okamura H, Kawaguchi K, Shoji K, Kawade Y. High-level induction of gamma interferon with
 various mitogens in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. Infect Immun. 1982
 Nov;38(2):440–3.

- 276 13. Tsutsui H, Matsui K, Kawada N, Hyodo Y, Hayashi N, Okamura H, et al. IL-18 accounts for both
278 TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in
mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Oct 15;159(8):3961–7.
- 280 14. Jasson F, Nagy I, Knol AC, Zuliani T, Khammari A, Dréno B. Different strains of
Propionibacterium acnes modulate differently the cutaneous innate immunity. *Exp Dermatol*.
2013 Sep;22(9):587–92.
- 282 15. Isard O, Knol A-C, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dréno B. Cutaneous induction of
284 corticotropin releasing hormone by *Propionibacterium acnes* extracts. *Dermatoendocrinol*. 2009
Mar;1(2):96–9.
- 286 16. Rabodoarivelo MS, Aerts M, Vandamme P, Palomino JC, Rasolofo V, Martin A. Optimizing of a
protein extraction method for *Mycobacterium tuberculosis* proteome analysis using mass
spectrometry. *J Microbiol Methods*. 2016;131:144–7.
- 288 17. Şahin F, Kıyan M, Karasartova D, Çalgın MK, Akhter S, Türegün Atasoy B. [A new method for
290 the disruption of cell walls of gram-positive bacteria and *mycobacteria* on the point of nucleic
acid extraction: sand method]. *Mikrobiyol Bul*. 2016 Jan;50(1):34–43.
- 292 18. Burris RH. Cell-free enzyme preparation from bacteria. In: *Manometric and biochemical
techniques*, 5th ed Burgess Publishing Co Minneapolis. W. W. Umbriet, R. H. Burring, and J. F.
Stauffer (ed.); 1972. p. 162–8.
- 294 19. Ames GF. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs.
Membrane, soluble, and periplasmic fractions. *J Biol Chem*. 1974 Jan 25;249(2):634–44.
- 296 20. Bhaduri S, Demchick PH. Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies.
Appl Environ Microbiol. 1983 Oct;46(4):941–3.
- 298 21. Foladori P, Laura B, Gianni A, Giuliano Z. Effects of sonication on bacteria viability in
300 wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry—Fecal indicators, wastewater and
activated sludge. *Water Res*. 2007 Jan 1;41(1):235–43.
- 302 22. Monsen T, Lövgren E, Widerström M, Wallinder L. In Vitro Effect of Ultrasound on Bacteria and
Suggested Protocol for Sonication and Diagnosis of Prosthetic Infections. *J Clin Microbiol*. 2009
Aug;47(8):2496–501.

304

306

308

310

Tables

Reference	Cultures	Controls	Bacteria washes	Bacterial suspension calibration	Heat-shock	Freeze/Thawing Cycles	Sonication Cycles	Other procedure
Huang <i>et al.</i> , 2015, Life Sciences Name of extracts : cell free extracts and heat-inactivated <i>C. acnes</i>	Reinforced <i>Clostridial</i> Media (RCM) 100 mL	Total DNA was extracted and the 16S rDNA was amplified with PCR to check purity and that no other fragment was amplified except <i>C. acnes</i> ones	3 washes in ice-cold PBS and calibration was performed	1.10 ⁸ CFU in 100 mL of bacterial suspension	None or specific protocol 80°C during 30 min, as called "heat-inactivated <i>C. acnes</i> "	None	Sonication on ice, no details	Two type of cell-free extracts are used: cell-free extracts from supernatant culture, and cell-free extract from disrupted bacteria.
Nagy <i>et al.</i> , 2006, Microbes and Infection Name of extracts : heat-treated <i>P. acnes</i>	Columbia agar base 5% bovine blood and vitamin K1 and haemin Single-cell colonies inoculated in Brain Heart Infusion (BHI) and incubated at 37°C overnight	None	3 washes in PBS-EDTA	No detail DO estimated at 600 nm.	30 min 60°C	None	None	None

Yu <i>et al.</i> , 2016, Journal of Investigative Dermatology Name of extracts : protein fraction	Inoculation in RCM at 37°C and calibrated at DO 0.1-0.3 Incubation for 40h and calibrated at DO 1.00	None	PBS	DO 0.1-0.3 and DO 1.00	None	None	None	Sonication, no detail	Use of lysozyme to digest well cell wall
Jasson <i>et al.</i> , 2013, Experimental Dermatology Name of extracts : bacterial extracts	None	None	None	None	None	None	None	None	None
Nakamura <i>et al.</i> , 2016, Plos One Name of extracts : viable or heat-killed <i>P. acnes</i>	Gifu Anaerobic (GAM) broth for 3 days at 37°C under anaerobic conditions	None	2 washes in PBS	None	10 min 100°C	None	None	None	None
Gambero <i>et al.</i> , 2016, Immunobiology Name of extracts : heat-killed <i>P. acnes</i> suspension	Anaerobic medium (Hemobac, Probac, SP, Brazil) at 37°C for 3 days	None	Washed in 0.9% commercial saline. No detail about number of washes	None	20 min 120°C	None	None	None	None
Kitagawa <i>et al.</i> , 2011,	Brain Heart Infusion medium supplemented	None	Washed in sterile distilled	None	60 min	None	None	None	Lyophilized after heat-

Experimental Dermatology Name of extracts : heat-killed <i>P. acnes</i>	with L-cysteine and Tween-80		water		60°C			shock
Okamura <i>et al.</i> , 1982, Infection and Immunity Name of extracts : heat-killed <i>P. acnes</i>	Brain Heart Infusion medium supplemented with L-cysteine (0.03%) and Tween-80 (0.03%)	None	Washed in PBS	None	60 min 60°C	None	None	None
Tsutsui <i>et al.</i> , 1997, J of Immunology Name of extracts : heat-killed <i>P. acnes</i>	Brain Heart Infusion medium supplemented with L-cysteine and Tween-80	None	Washed in sterile distilled water	None	60 min 60°C	None	None	Lyophilized after heat-shock

None: no information is available in the procedure described in the publication.

Table 1: comparison of the existing methods to create *C. acnes* bacterial fractions to perform experiments.

Protocole n°	Cultures	Controls before procedure (purity)	OD suspension (McF)	Heat-shock	Freezing/thawing cycles	Freezing/Sonication cycles	Controls after procedure (viability)
1	100 mL BHI	None	1.00	None	15 cycles (-80°C/+37°C)	5 cycles (-80°C/30 sec sonication at RT)	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)
3	100 mL BHI	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)	1.00	60°C 30 min	5 cycles (-80°C/+37°C)	None	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)
4	100 mL BHI	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)	1.00	60°C 30 min	None	5 cycles (-80°C/1 min sonication at RT)	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)
6	100 mL BHI	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)	1.00	None	15 cycles (-80°C/+37°C)	10 cycles (-80°C/1min30sec sonication at RT)	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)
7	100 mL BHI	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)	1.00	60°C 15 min	10 cycles (-80°C/+37°C)	5 cycles (-80°C/1 min30' sonication at RT)	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)
8	100 mL BHI	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)	1.00	60°C 15 min	None	10 cycles (-80°C/1 min30' sonication at RT)	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)
9	100 mL BHI	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)	1.00	80°C 10 min	None	None	Gram staining and culture on Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood (BD, cat. #254042)

Table 2: description of all protocols tested according to our experience and presented in this article. RT : Room Temperature.

316

318

320

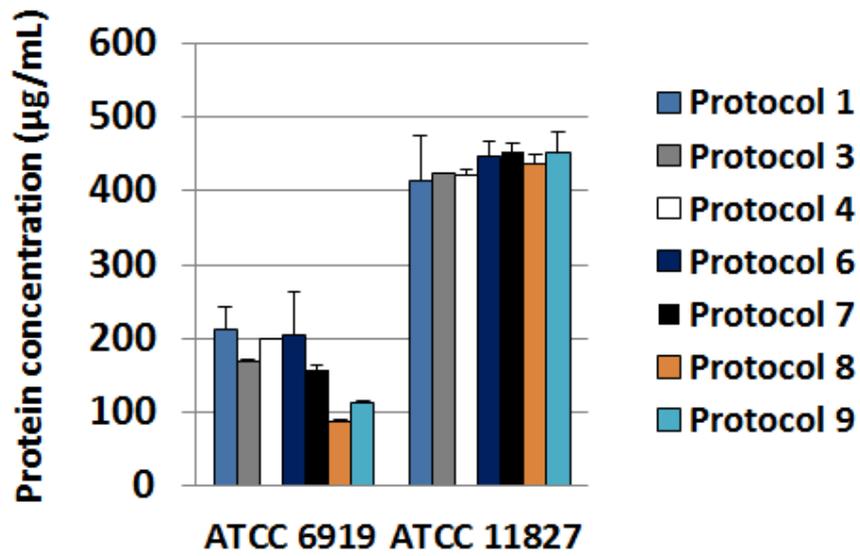
322

Steps	Material	Reference
Initial culture	Schaedler agar with vitamin K1 and 5% sheep blood	Becton Dickinson cat. #254042
Broth	BHI	Sigma Aldrich cat. #53286-500G
Calibration of the bacterial suspension	Densimeter	bioMérieux, Densichek Plus
Thawing (37°C)	Warm-bath	Grant Instruments (Cambridge, England), type JB2 (20-90°C)
Freezing (-80°C)	Freezer	Panasonic Ultra-Low temperature Freezer MDF U33865-PE
Sonication	Ultrasound-bath	Branson, Bransonic 220
Aliquote the bacterial suspensions before protocol beginning	Plastic tubes	CELLSTAR Tubes cat. #188271 15 mL Conical-bottom sterile tubes

Table 3: summary of the used materials for the bacterial lysates process.

324

Figures



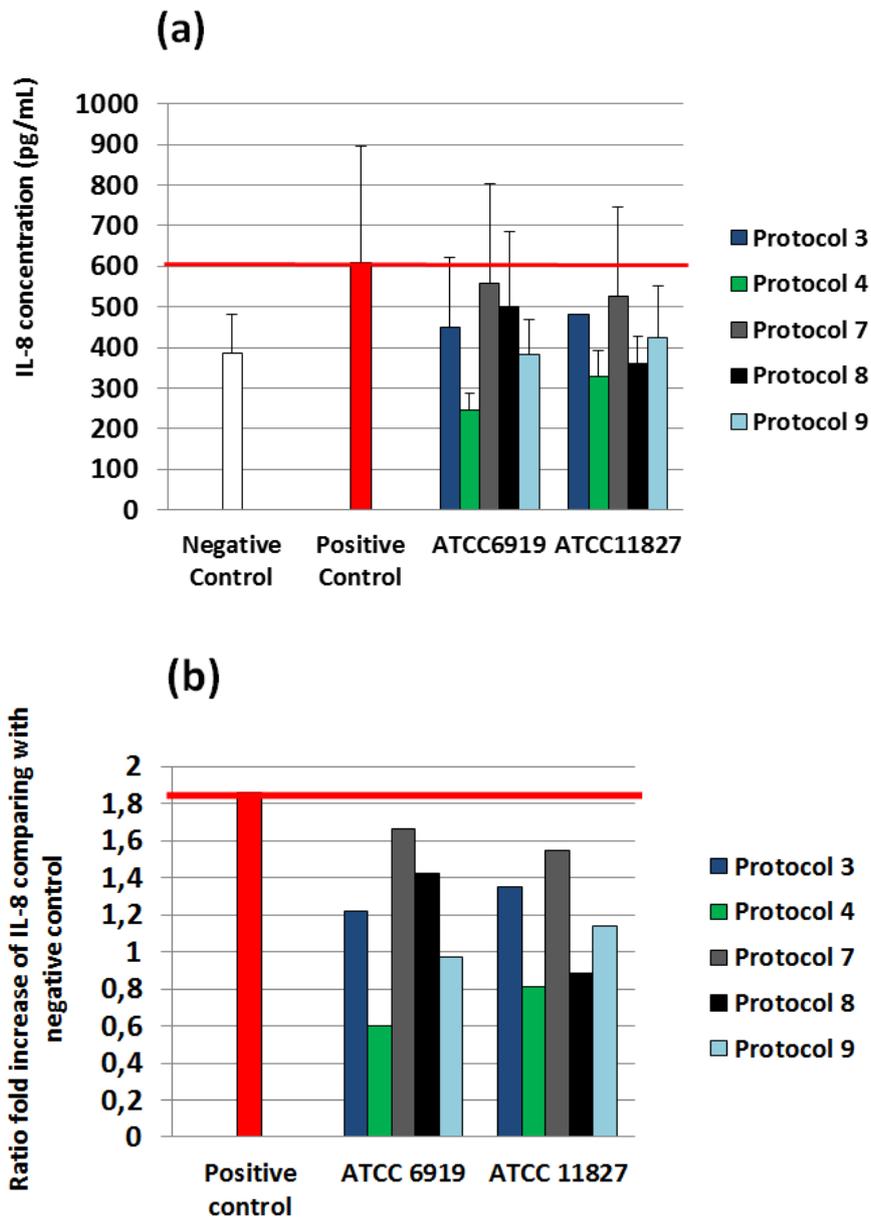
326

328 **Figure 1:** Protein concentration analysis by BCA assay according to the seven protocols, for both *C.*
330 *acnes* ATCC6919 and ATCC11827. Experiments were carried out twice, mean values were taken and
presented in this graph.

332

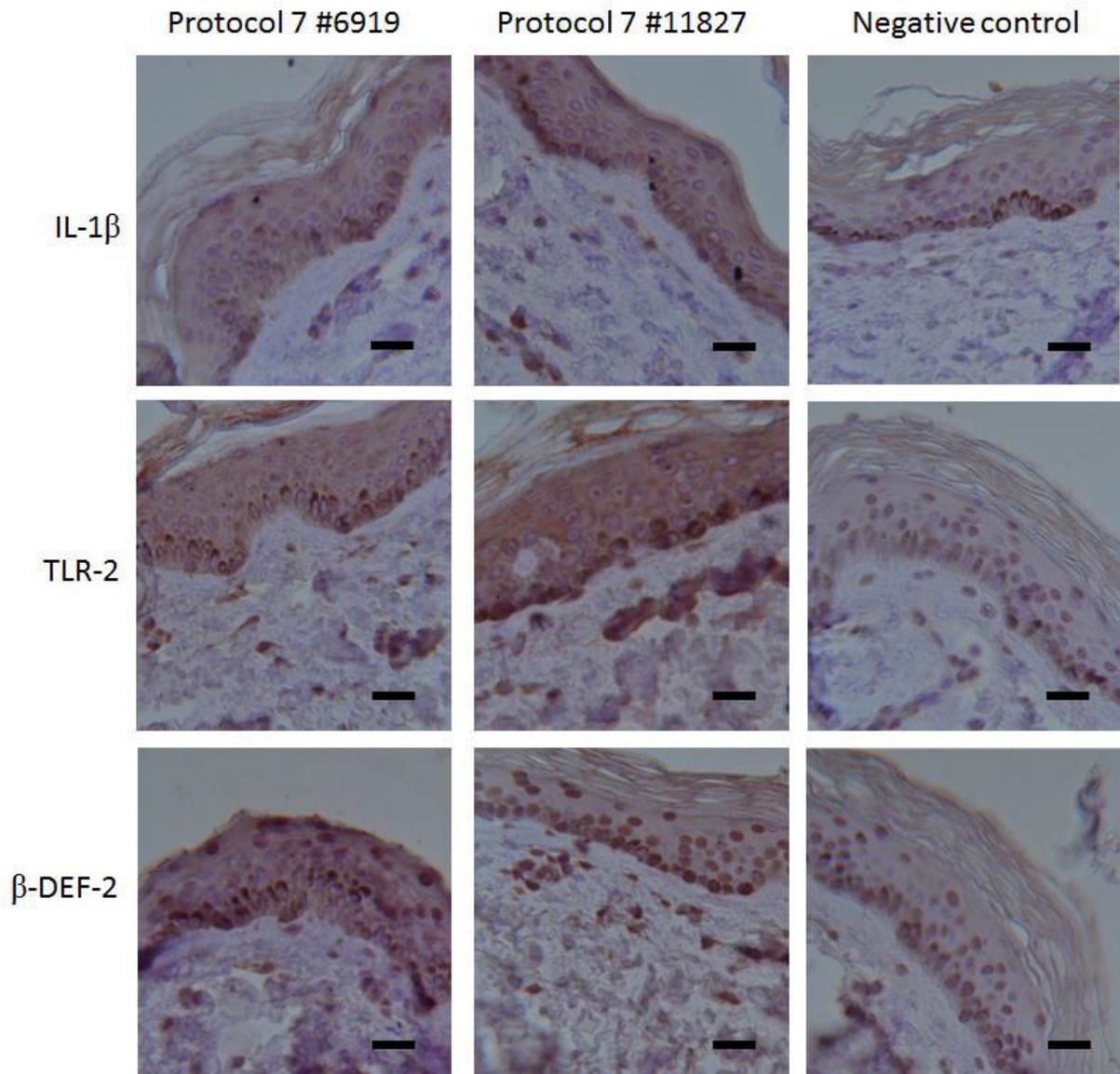
334

336



338

Figure 2: Quantification of inflammation-related cytokine IL-8 in explant supernatants after 6h-
340 incubation with *C. acnes* lysates from different protocols. Positive control was performed using LPS
(*E. coli*) and negative control was obtained by incubating skin explants in culture medium alone
342 (DMEM). (a) Presentation of the raw data obtained after IL-8 quantifications. (b) Presentation of the
344 data according to ratio fold increase in IL-8 release in supernatants taking the negative control as the
reference. IL-8 quantifications were performed by ELISA assay.



346 **Figure 3:** Immunohistochemistry performed on the skin explant after 6h-incubation with bacterial *C.*
 348 *acnes* lysates from ATCC6919 and ATCC11827, created following the protocol n°7. Scale bars
 indicate 300 μ m.

350

A.2 Caractérisation moléculaire des souches de *C. acnes* issue des patients inclus

Cette caractérisation moléculaire s'est effectuée selon les trois niveaux de caractérisation connus actuellement.

A.2.a Identification du phylotype

Le phylotype a été déterminé par PCR multiplex (Barnard *et al.*, 2015b). L'identification du phylotype a été réalisée grâce à l'utilisation de souche de phylotype connu. En fonction du profil des bandes obtenues après migration, le phylotype était déduit par comparaison aux profils obtenus pour les souches contrôles (Figure 42, p.104).

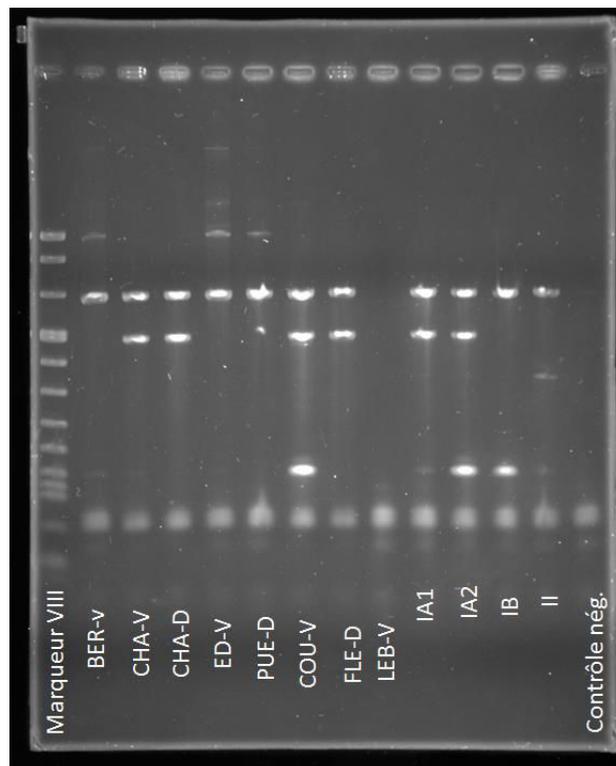


Figure 42 : Exemple de profil de migration obtenu après PCR multiplex, sur huit souches de *C. acnes*.

Lors de cette migration, le phylotype a pu être déterminé pour les échantillons suivants : FLE-D, CHA-V, CHA-D (phylotype IA1), COU-V (phylotype IA2). Le phylotype n'a pas pu être identifié pour les échantillons BER-V, ED-V, PUE-D (Figure 42, p.104).

Après de plus amples investigations, il s'est avéré que ces échantillons étaient en fait des *Cutibacterium namnetense*, ce qui expliquait l'impossibilité d'identifier un phylotype. Cette vérification s'est effectuée par PCR amplifiant la séquence codant pour le gène *gyrB* et par son séquençage suivie de la comparaison à une base de données en utilisant le logiciel CLC Sequence Viewer (Qiagen Bioinformatics). Cette méthode d'identification a été mise au point par notre groupe, et est décrite dans un article actuellement en cours de révision dans le journal intitulé « **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease** ». Par ailleurs, le phylotype n'a pas pu être identifié pour l'échantillon LEB-V à cause d'un problème technique lors de l'extraction d'ADN. Pour cet échantillon, le phylotype a été identifié lors d'une seconde manipulation.

Après identification de tous les phylotypes, nous avons obtenu les profils suivants en fonction de la catégorie considérée (acné/sain, visage/dos) :

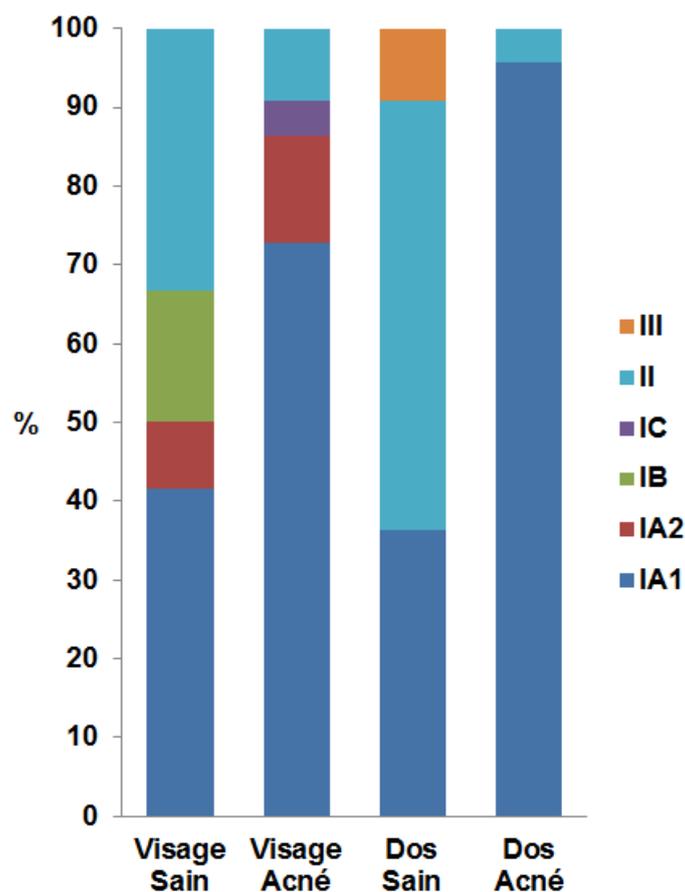


Figure 43 : Détermination des phylotypes pour toutes les souches de *C. acnes* retrouvées lors de notre étude (n=68).

Nous observons une certaine diversité des phylotypes retrouvée dans le groupe sain, notamment au niveau du visage où quatre phylotypes étaient représentés (IA1, IA2, IB, et II). Dans ce même groupe, trois phylotypes étaient représentés (IA1, II et III) au niveau du dos (Figure 43, p.105). A l'inverse, le groupe acné a démontré une perte de la diversité des phylotypes par rapport au groupe sain, sur les deux zones étudiées. En effet, sur le visage, quatre phylotypes étaient représentés (IA1, IA2, IC, et II) avec cependant une prédominance du phylotype IA1. Cette perte de diversité était plus particulièrement marquée au niveau du dos, avec plus de 95% des souches identifiées comme appartenant au phylotype IA1 (Figure 43, p.105).

A.2.b Détermination des complexes clonaux et des types SLST

L'analyse de la distribution des complexes clonaux dans les deux groupes (acné/sain) sur les deux zones considérées (visage et dos), a montré que le CC18 et le CC53 étaient respectivement associés au groupe acné et au groupe sain (Figure 44, p.107). En prenant en compte la localisation, 62,5 % des échantillons provenant du dos était du CC18, démontrant une association significative de ce CC avec l'acné sévère du dos ($p < 0.001$). En outre, 16,6 % des souches en provenance du dos appartenait au CC28, correspondant au phylotype IA1 (absence totale du phylotype II). Une association significative a été retrouvée entre le type SLST A1 et l'acné sévère du dos ($p = 0.002$). De manière intéressante, le seul phylotype III de *C. acnes* retrouvé dans l'étude a été isolé à partir du groupe sain, associé au CC43 et un nouveau type SLST appelé « L7 », jamais décrit auparavant (Figure 43, p.105 et Figure 45, p.108).

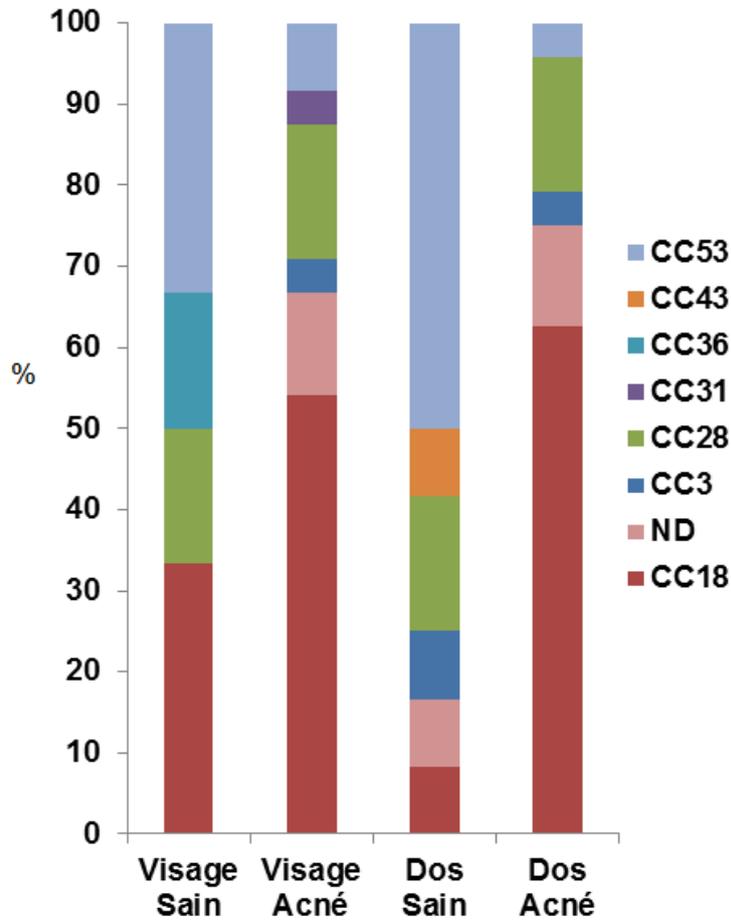


Figure 44 : Détermination des complexes clonaux pour toutes les souches de *C. acnes* retrouvées lors de notre étude (n=68).

La description exhaustive des différents complexes clonaux retrouvés sur le visage et le dos des deux groupes inclus dans l'étude, est réalisé dans l'article publié dans le journal intitulé « **Acta Dermato-Venereologica** ».

Enfin, il est à noter que les souches de référence ATCC6919 et ATCC11827, appartenant au phylotype IA1, ont également été typés dans le cadre de ce travail de Thèse. Les résultats ont montré que les souches ATCC6919 et ATCC11827 appartenaient toutes deux au CC18 et au type SLST A1.

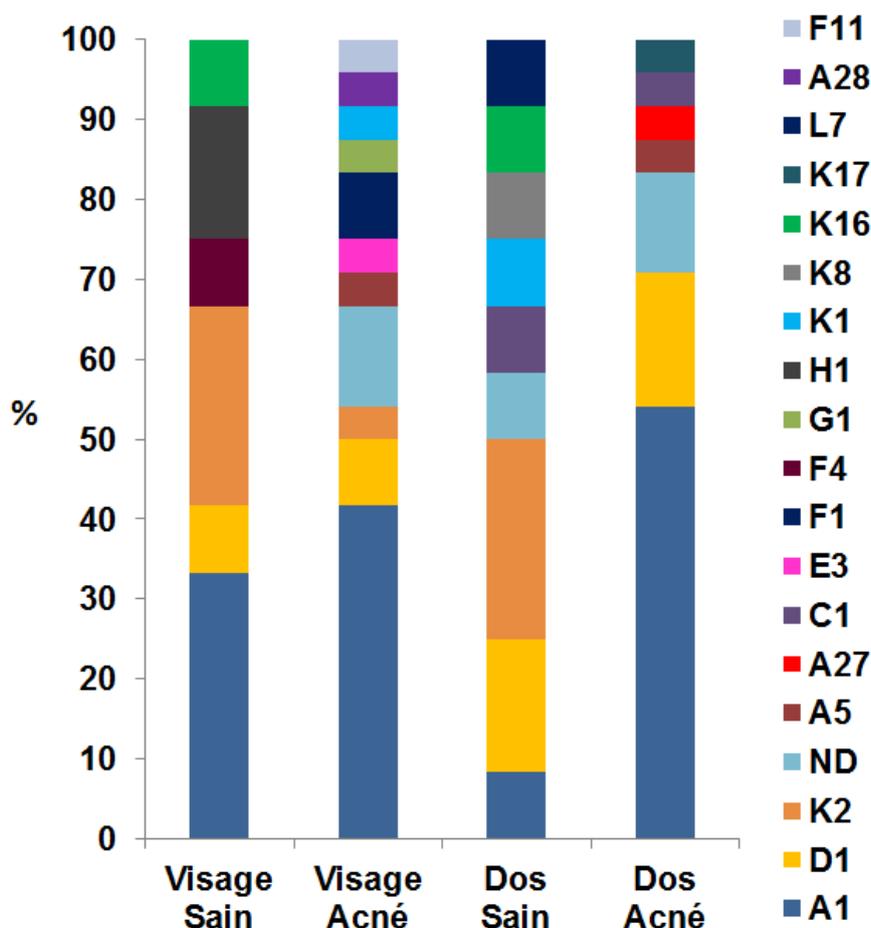


Figure 45 : Détermination des types SLST pour toutes les souches de *C. acnes* retrouvées lors de notre étude (n=68).

De manière intéressante, six nouveaux types SLST jamais décrits auparavant ont été trouvés lors de ce travail de Thèse. Ces six nouveaux types SLST étaient associés aux phylotypes IA1 (A28, A27), IA2 (F11), II (K16, K17) et III (L7). Ils ont été incrémentés dans la base de données en ligne publique (<http://medbac.dk/slst/pacnes>, dernière consultation le 05/06/2018). Actuellement, notre groupe a incrémenté une trentaine de nouveaux types SLST dans cette base de données.

Ce travail de caractérisation des 48 souches issues des patients acné, et des 24 souches issues des patients sains, a fait l'objet d'une publication dans le journal « **Acta Dermato-Venereologica** » (Dagnelie *et al.*, 2018a). Par ailleurs, un travail de synthèse sur les techniques de phylogénie et typage moléculaire concernant ces trois niveaux de caractérisation a été réalisé au sujet de ces trois niveaux de caractérisation de *C. acnes*. Il a fait l'objet d'une publication sous le format de revue narrative, dans le journal intitulé « **Clinical Microbiology and Infection** » (Dagnelie *et al.*, 2018b). Nous préconisons

effectivement l'utilisation d'un algorithme pour choisir la technique de typage moléculaire la plus adéquate en fonction du niveau de caractérisation voulu (Figure 46, p.109). De ce fait, en fonction des trois niveaux de caractérisation existants (phylotype, complexe clonal et type SLST), nous préconisons l'utilisation de l'une ou l'autre technique. Concernant la détermination des phylotypes, nous préconisons l'utilisation de la PCR multiplex. Pour le complexe clonal, nous préconisons l'utilisation du schéma d'Aarhus (MLST9), et pour l'identification du type SLST, l'utilisation du SLST mise au point par Scholz C. Les raisons de ces sélections reposent principalement sur le temps de manipulation, le coût et le niveau de discrimination.

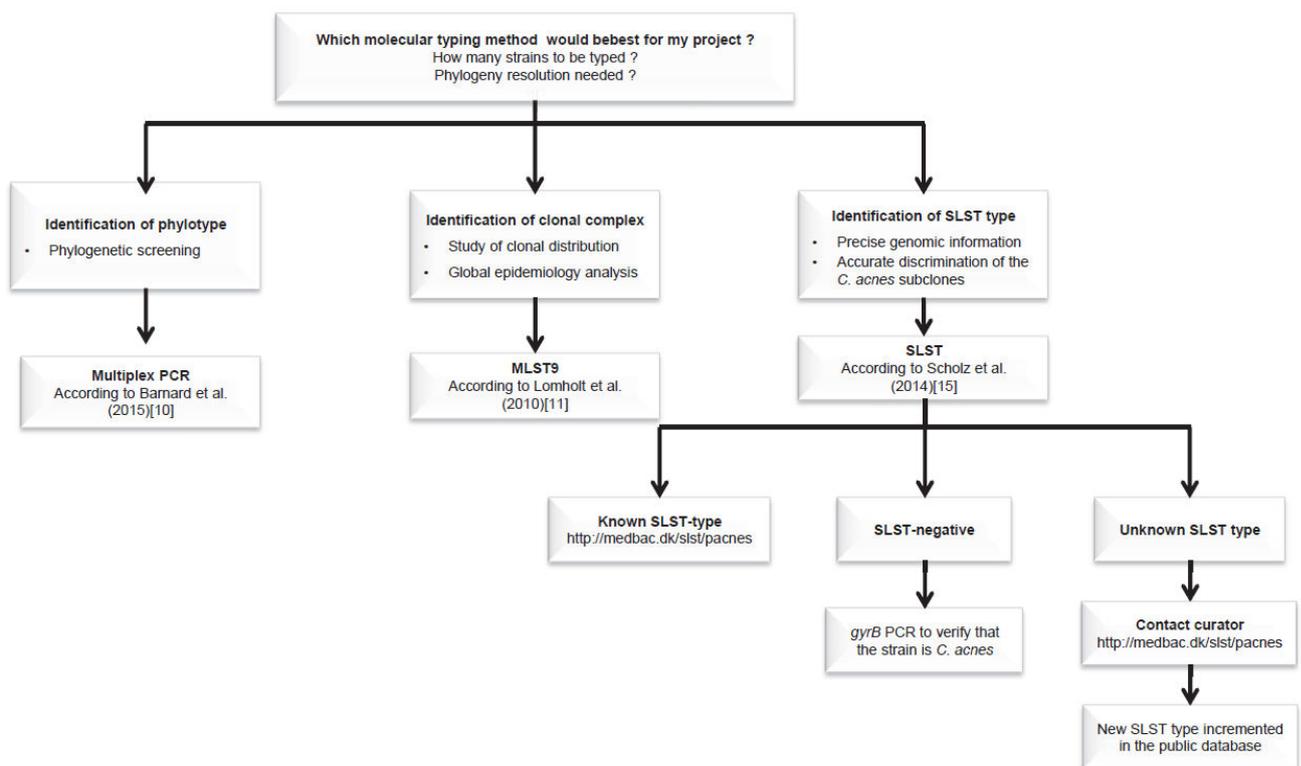


Figure 46 : Algorithme de décision de la technique de typage moléculaire en fonction du niveau de caractérisation requis, extrait de (Dagnelie *et al.*, 2018b).

Points de synthèse

- Le CC18 apparaît comme prédominant dans les isolats de *C. acnes* issus de prélèvements réalisés sur le dos et le visage de patients atteints d'acné sévère du dos.
- Le type SLST A1 a démontré une association significative avec le dos des patients atteints d'acné sévère du dos.
- Une réduction importante de la diversité des phylotypes de *C. acnes* est observée en contexte d'acné sévère du dos, avec plus de 95 % des souches issues du dos des patients appartenant au phylotype IA1 en comparaison au groupe sain.

**Decrease in Diversity of *Propionibacterium acnes* Phylotypes in Patients with Severe
Acne on the Back**

Marie-Ange Dagnelie, Stéphane Corvec, Mélanie Saint-Jean, Valérie Bourdès, Jean-Michel
Nguyen, Amir Khammari, Brigitte Dréno

Article publié dans Acta Dermato-Venereologica



Decrease in Diversity of *Propionibacterium acnes* Phylotypes in Patients with Severe Acne on the Back

Marie-Ange DAGNELIE¹, Stéphane CORVEC^{1,3}, Mélanie SAINT-JEAN^{1,2}, Valérie BOURDÈS⁵, Jean-Michel NGUYEN^{1,4}, Amir KHAMMARI^{1,2} and Brigitte DRÉNO^{1,2}

¹CIC, Inserm U1232, ²Department of Dermatology, ³Bacteriology and Hygiene Unit, Biology Institute, ⁴Biostatistic Department, PIMES, Saint-Jacques Hospital, Nantes University Hospital, Nantes, and ⁵Evaluation Department – CUTIS – Galderma R&D, Biot, France

***Propionibacterium acnes*, a major member of normal skin microbiota, is subdivided into 6 phylotypes: IA1, IA2, IB, IC, II and III. This study investigated *P. acnes* subgroups on the face and back in patients with severe acne and in healthy controls. In 71.4% of patients with severe acne, *P. acnes* phylotypes were identical on the face and back, whereas this was the case in only 45.5% of healthy controls. The healthy group carried phylotypes IA1 (39.1%) and II (43.4%), whereas the acne group carried a high predominance of IA1 (84.4%), especially on the back (95.6%). In addition, the single-locus sequence typing (SLST) method revealed A1 to be the predominant type on the back of patients with acne, compared with a wide diversity in the healthy group. We report here that severity of acne on the back is associated with loss of diversity of *P. acnes* phylotype, with a major predominance of phylotype IA1. The change in balance of cutaneous *P. acnes* subgroups might be an inducing factor in the activation of *P. acnes*, which could trigger inflammation.**

Key words: acne, *P. acnes* phylotypes; clonal complexes; SLST-types.

Accepted Nov 13, 2017; Epub ahead of print Nov 14, 2017

Acta Derm Venereol 2018; 98: 262–267.

Corr: Brigitte Dréno, Department of Dermatology, Nantes University Hospital, 1 Place Alexis Ricordeau, FR-44035 Nantes Cedex 01, France. E-mail: brigitte.dreno@wanadoo.fr

Acne is one of the most common skin diseases worldwide, affecting up to 85% of the population (1). At the pathophysiological level, 2 factors play a crucial role: the sebaceous gland and *Propionibacterium acnes*. *P. acnes* is a commensal anaerobic Gram-positive bacterium of the healthy skin. This bacterial genus has high specificity, from face to feet areas (2). This study showed a predominance of *Propionibacterium* genus on the face and back. This microorganism diversity on the human body also depends on several factors, such as host factors (e.g. age, sex, hair follicle density) and environmental factors (e.g. occupation, clothing choice, antibiotic use) (3, 4).

P. acnes plays an important role in the maintenance of normal cutaneous microbiota, by inhibiting the development of some pathogenic bacteria, such as *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. It produces propionic acid and, thus, can maintain acidic pH in the

pilo-sebaceous follicles. In addition to acne, *P. acnes* has also been implicated in deep infections and orthopaedic abscesses (5–7), lung abscesses (8), prostate cancer (9), and sarcoidosis (10). Its development in deep infections may be related to the secretion of a biofilm that increases both its adherence to surfaces and antibiotic resistance (11).

In the skin, *P. acnes*, as an anaerobic bacterium, is located more specifically in the pilo-sebaceous follicles. A number of studies have shown that *P. acnes* can activate innate immunity, mainly via Toll-like receptors (TLRs) expressed by keratinocytes and monocytes (12, 13). *P. acnes* also stimulates the secretion of interleukins (IL)-12, IL-8, IL-1 β and IL-17 cytokines by monocytes (14). Thus, it plays a crucial role in the development of inflammatory lesions in acne.

P. acnes population strains are divided into 6 main phylotypes: IA1, IA2, IB, IC, II and III. Recent genomic studies have also highlighted the presence of subgroups among phylotypes, according to genome analysis called multi-locus sequence typing (MLST) (15) and single-locus sequence typing (SLST). These cluster differentiations are called clonal complexes (CCs). Some *P. acnes* phylotypes are associated with skin disease conditions, such as phylotype III and progressive macular hypomelanosis (16). Moreover, different *P. acnes* phylotypes are known to induce distinct immune responses in the context of acne (12, 17). The aim of this study was to determine and compare the different *P. acnes* phylotypes, CCs and SLST types on the face and back of patients with severe acne of the back vs. a healthy population.

MATERIALS AND METHODS

Recruitment of healthy volunteers and patients

At the first visit, patients with acne who fulfilled the inclusion criteria were selected. The inclusion criteria were: age (16–35 years), at least 2 nodules on the back, complying with wash-out periods for acne drugs including systemic antibiotics (1 month), oral retinoids (6 months) and topical treatments (2 weeks). Healthy volunteers were selected according to inclusion criteria, including the total absence of acne on the face and back, and the absence of other history or current dermatological pathologies. All patients provided signed informed consent and the study was approved by the health authorities (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM); number 151141B-42) and ethics committee (Comité de Protection des Personnes (CPP); number 21–15).

Table I. Clinical data for acne patients

Pat. No.	Back score (ECLA)	Sex	Age, years	Face score (GEA)
9008	5	F	21	2
9020	5	M	23	1
9001	4	M	24	1
9002	4	M	31	2
9004	4	M	22	2
9006	4	M	33	1
9014	4	M	21	1
9017	4	M	34	1
9021	4	F	24	2
9003	3	M	22	2
9005	3	M	29	1
9007	3	M	28	2
9009	3	M	33	1
9010	3	M	21	2
9011	3	M	22	2
9012	3	M	18	3
9013	3	F	19	3
9015	3	M	31	1
9016	3	M	20	1
9018	3	M	29	1
9019	3	M	21	1

GEA: Groupe Expert Acné; ECLA: Echelle de Cotation des Lésions d'Acné.

Clinical data

For each patient with acne, face and back acne scores were established by a dermatologist. These scores were estimated from 0 to 5 according to the type of acne (mild to severe), for both areas. All scores are shown in **Table I**. Scores for back acne were established according to the Echelle de Cotation des Lésions d'Acné (ECLA) scale (18). Scores for face acne were established according to the Groupe Expert Acné (GEA) scale (19). The experimental scheme of the study is detailed in **Fig. 1**.

Bacteriological sampling and microbiology study

For all included patients, swab samples were taken from the face and the back at the same visit, from a surface area of 1 cm² surrounding an inflammatory lesion (papule), by rubbing with the swab for 45 s. Samples were collected in both groups from

the back and face zones, using a cotton swab, and separately discharged into a brain heart infusion medium and delivered to the Bacteriology Department of Nantes University Hospital within 30 min. Each sample was cultured anaerobically at 37°C for 7–10 days. Colonies with the macroscopic morphology of *P. acnes* were picked from each plate to recover the predominant strain of *P. acnes*. As reported recently (20), this picking method allows the predominant clone of *P. acnes* present in the cutaneous skin flora to be recovered. Indeed, it has been shown that the representative isolate constitutes 85–100% of the sample.

All isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with a VitekMS[®] mass spectrometer (MALDI-TOF MS) (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). All strains were identified accurately with a value >99.9%.

DNA extraction and phylotype determination

Total DNA from *P. acnes* isolates was extracted using the InstaGene Matrix method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

The 6 main phylotypes for all isolates were determined as described previously (21).

Multi- and single-locus sequence type determination and sequencing protocol

MLST is a method to determine to which clonal complex a *P. acnes* strain belongs. Recently, 2 main MLST schemes have been developed (22, 23), but we decided to use the method developed by Lomholt & Kilian (23) according to its best discriminant power. This scheme is based on partial sequencing of 9 housekeeping genes, comprising a total of 4,287 nucleotides, and is available at <http://pacnes.mlst.net/>.

SLST is a molecular typing method based on the analysis of a single locus of the *P. acnes* genome. The portion of amplified DNA enables the identification of *P. acnes* SLST-types (A1, A5 etc.). SLST was carried out on all isolates, as described previously (24). Reference sequences for alignment and trimming are described in the web-interface typing tool at <http://medbac.dk/slst/pacnes>.

Sequencing was performed on a 3130xl-1 Hitachi (Applied Biosystems, Foster City, USA). At the end of the sequencing, each sequence for each sample was reviewed and analysed using Seqscape software v2.5 (Applied Biosystems) before comparison with online databases.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Fisher exact test (R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)).

RESULTS

Clinical isolates and cultivable skin microbiota

A total of 24 patients with acne and 12 healthy volunteers were recruited. For each patient with acne, GEA and ECLA scores were established by a dermatologist for the face and the back, respectively. Concerning the back zone, 15 of the 24 patients scored 3, 7 scored 4, and 2 scored 5. In addition, concerning the face zone, 14 scored 1, 8 scored 2 and 2 scored 3. The clinical data are shown in Table I.

Positive culture was obtained for all patients and controls (100%). Cultures identified *P. acnes*, but also

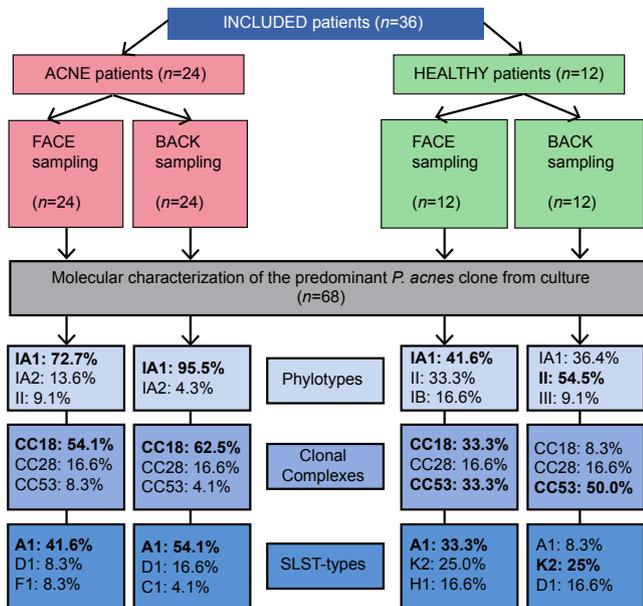


Fig. 1. Experimental scheme of the study and summary of the main results obtained. CC: clonal complex; SLST: single-locus sequence typing.

other bacterial species, including *S. aureus* (acne group 2/48; 4.2% vs. healthy group 2/24; 8.3%), and *S. epidermidis* (acne group 33/48; 68.8% vs. healthy group 14/24; 58.3%). *P. acnes* was systematically recovered from all collected samples ($n=72$) in culture, except for 4 samples. Instead of *P. acnes*, other species were discovered, including *P. avidum* in the healthy group (2/24; 8.3%), *P. granulosum* in the acne group (1/48; 2.1%) and *P. namnetense* in the acne group (3/48; 6.3%). However, no significant difference in bacteria diversity was noted on the back between acne and healthy individuals ($p=0.820$). In addition, no significant difference in bacteria diversity was noted between the face samples from subjects with acne and healthy subjects ($p=0.690$).

P. acnes phylotype diversity on face vs. back

The *P. acnes* phylotypes found both on the back and on the face in acne vs. healthy groups were different.

In healthy group samples (face and back), 5 of the 6 main phylotypes were present, showing a large diversity: IA1, IA2, IB, II and III (Fig. 2). The most predominant ones were phylotypes IA1 and II (respectively, 39.1% and 43.5% of isolates), 8.7% were phylotype IB, 4.3% phylotype III and 4.3% phylotype IA2. On the face, the most predominant phylotypes found were phylotype IA1 (41.6%), and II (33.3%). This trend was the same on the back zone for this group, with a majority of phylotypes IA1 and II (36.3% and 54.5%, respectively).

In acne group samples (face and back), 4 out of the 6 main phylotypes were identified: IA1, IA2, IC, and II (Fig. 2). Phylotype IA1 represented 84.4% of typed *P. acnes*. The other phylotypes represented only 6.6% for phylotypes II, 2.1% for IC, and 6.6% for IA2 (6.6%) (Fig. 2). No phylotype III was identified. Concerning the back zone, a large predominance of phylotype IA1 was found (95.6%) with a significant association ($p < 0.001$),

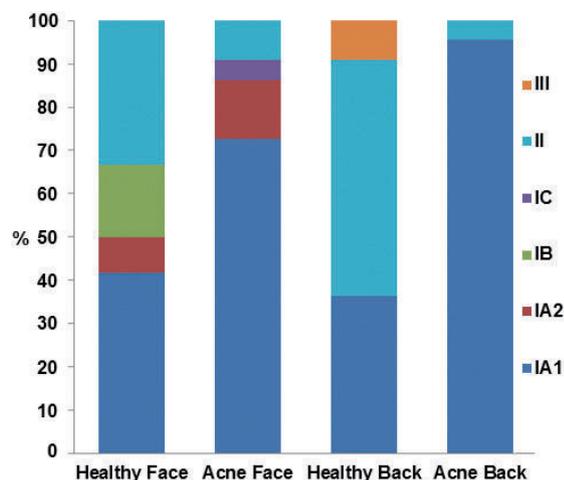


Fig. 2. *Propionibacterium acnes* phylotype distribution on 2 sites on healthy volunteers and acne patients ($n=12$ and $n=24$, respectively). Categories "Healthy" and "Acne" represent the percentages of phylotypes found on the back and the face, respectively.

phylotype II represented only 4.3% of the *P. acnes* strains, no other phylotype was detected on this body site. On the face zone, phylotype IA1 was the most predominant phylotype (72.7%), compared with 13.6% for phylotype IA2, 9.1% phylotype II. Moreover, a rare *P. acnes* phylotype was also found in the acne group on the face: phylotype IC (1/48; 2.1%). For both zones, no significant association was found between acne severity (GEA and/or ECLA scores) and phylotypes ($p=0.649$ for the face and $p=0.391$ for the back). The main results concerning phylotypes identification are shown in Fig. 1.

In conclusion, there was a higher diversity of *P. acnes* phylotypes on the face vs. the back zone, in both groups, and phylotype IA1 was largely represented in the acne group, especially in the back zone.

Analysis of multi-locus and single-locus sequence type determination

To go deeper in the analysis of *P. acnes* lineages involved in acne lesions, 2 additional molecular typing methods were performed: MLST and SLST. These additional methods offer more precise data about the phylogenetic clades distribution of *P. acnes* isolates. SLST-type A1 was predominant in the acne group (Fig. 3). A higher diversity of SLST-types associated with known phylotypes (IA1 and II) with new SLST-types never described before was also noted: K16 (phylotype II) and L7 (phylotype III) in the healthy group; A27, A28 (phylotype IA1), F11 (phylotype IA2), and K17 (phylotype II) in the acne group. Analysis of the distribution of clonal complexes (CC) among both healthy and acne populations in the back/face zones revealed that CC18 and CC53 were more

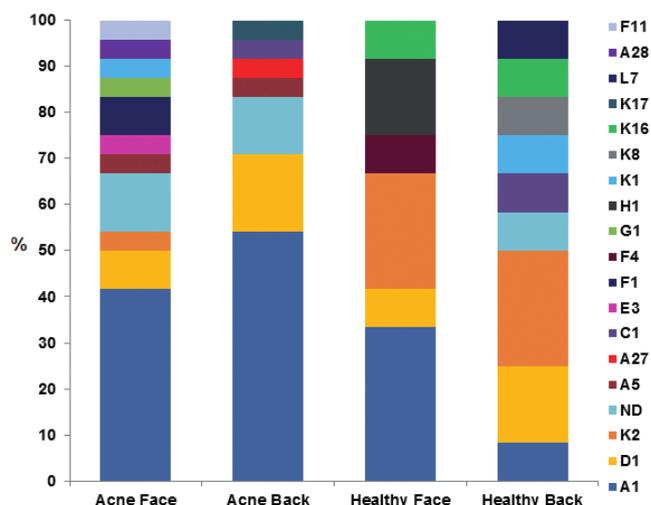


Fig. 3. *Propionibacterium acnes* single-locus sequence typing (SLST) type distribution according to 2 body sites on healthy volunteers and patients with acne ($n=12$ and $n=24$, respectively). Categories "Healthy" and "Acne" represent the percentages of the different SLST types found on back and on face in either the healthy group or the acne group. "ND" category represents the other species found instead of *P. acnes*, where typing was not possible.

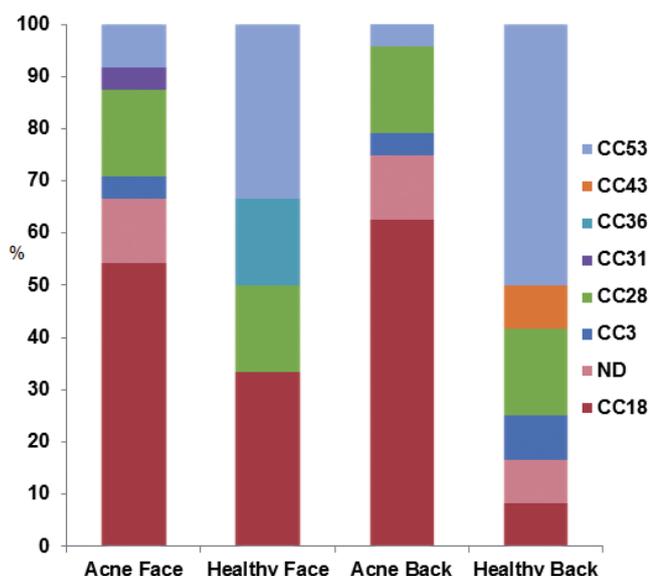


Fig. 4. *Propionibacterium acnes* clonal complex (CC) distribution on 2 sites on healthy volunteers and acne patients ($n=12$ and $n=24$, respectively). Categories "Healthy" and "Acne" represent the percentages of the different CCs found on the back and face in either the healthy or the acne group. "ND" category represents the other species found instead of *P. acnes*, where the typing was not possible.

associated with the acne group and the healthy group, respectively (Fig. 4). The main results concerning CC identification are shown in Fig. 1.

In healthy group samples, 41.6% belonged to the CC53 subgroup (phylogroup II and K SLST-types), 20.8% of the *P. acnes* strains belonged to the CC18 subgroup and 16.6% to the CC28 subgroup belonging to phylogroup IA1 including SLST-types A1, C1 and D1 (Figs 3 and 4). Taking into account the location (face or back), 50.0% of the back samples were CC53 (phylogroup II including K1, K2, and K8 SLST-types), 16.6% were CC28 (phylogroup IA1 including D1 SLST-type), 8.3% were CC18 (phylogroup IA1 and A1 SLST-type), 8.3% were CC3 (phylogroup IA1 and C1 SLST-type) and, finally, 8.3% were CC43 (phylogroup III and new SLST-type named "L7") (Figs 3 and 4). Concerning the face zone, 33.3% of the strains were CC18 (phylogroup IA1 and A1 SLST-type) and 33.3% were CC53 (phylogroup II including K1 and a new SLST-type named "K16"), whereas 16.6% were CC28 (phylogroups IA1 and IA2 corresponding to D1 and F4 SLST-types) and 16.6% were CC36 (phylogroup IB and H1 SLST-types) (Figs 3 and 4).

Interestingly, the only *P. acnes* phylogroup III found in this study was recovered in the healthy group, associated with CC43 and a new SLST-type L7 not previously described.

In acne group samples, 58.3% of the *P. acnes* strains belonged to CC18 and 16.6% belonged to CC28, including SLST types A1, A5, C1, D1 and E3 (Fig. 3, 4). Taking into account the location, 62.5% of the back samples were CC18, demonstrating a significant association of this CC with back acne skin-condition

($p<0.001$). Moreover, 16.6% of the back samples were CC28, corresponding to phylogroup IA1 (total absence of phylogroup II), whereas 54.1% of the face samples were CC18, 16.6% were CC28, and 8.3% were CC53 (phylogroup II corresponding to K SLST-types). In addition, a significant association was found between SLST-type A1 and back acne skin-condition ($p=0.002$).

All new SLST-types described for the first time in this study are as listed: A27 (acne back), A28 (acne face), F11 (acne face), K17 (acne back), K16 (healthy face and healthy back), and L7 (healthy back). These new SLST-types have been incremented in the online database, based on Christian F. P. Scholz's genetic system (<http://medbac.dk/slst/pacnes>). The main results concerning identification of CC and SLST-types are summarized in Fig. 1.

DISCUSSION

In summary, this study reveals that inflammatory severe acne of both face and back is associated with diversity loss of *P. acnes* phylotypes, and a high predominance of phylogroup IA1, both on the face (72.7%) and the back (95.6%), which has not been described previously. In healthy individuals, 2 main phylotypes have been found: IA1 (39.1%) and II (43.4%). In addition, this study identifies A1 SLST-type as the predominant SLST-type recovered from nodular acne of the back.

Distribution of phylotypes and CCs on the human body in the context of acne has been studied previously. Lomholt & Kilian analysed the distribution of CCs in 2 patients with acne on the face/back (25), and showed the presence of several CCs, including CC3 and CC18 on face, but a lower diversity of CCs on the back. Moreover, the results of the current study confirm those of Lomholt et al. (20) regarding the predominance of IA1 phylogroup (CC18) in patients with acne, but this study did not perform determination of SLST-types. In our study, among the large diversity of SLST-types found, we describe the significant association between A1 SLST-type and severe back acne. Overall, despite a highly conserved genome of *P. acnes* (26), we show that acne lesions are associated with the development of a specific subpopulation of *P. acnes*.

From our 72 isolates, the A1 SLST-type was significantly associated with acne skin condition. In addition, we found 6 new SLST-types that had not been described previously (i.e. F11, L7, K16, K17, A28, and A27), which have been incremented in the online database (24) (<http://medbac.dk/slst/pacnes>). Currently, the impact of the different SLST-types on skin disease is not known; this field represents an interesting avenue for future clinical investigations. To our knowledge, 2 studies currently describe *P. acnes* SLST-types found in acne vulgaris (27, 28). In Nakase et al., the SLST-type predominantly found in severe acne is A5. In our data, we found the SLST-type A1 as the predominant type in severe acne of the back.

This difference can be due to ethnicity, skin care (i.e. use of cleansers, moisturizers, etc.), climate, and acne therapeutic care, which differs from country to country, notably with regard to use of antibiotics, isotretinoin and benzoyl peroxide. Nevertheless, in both cases we found clade A to be predominant in severe acne.

In contrast to SLST-types, association of CCs with some diseases is starting to be well-documented, such as: CC36 and CC53/60 in prostate cancer and absence of CC18 (29), and CC18 association with acne-skin condition (20). Previous works have reported a high diversity of CCs in sarcoidosis: CC36, CC28, CC53, CC18 and singletons (30). In the same manner, our data reveal a diversity of CC, found on both the back and face zones, in the healthy group. For example, phylotype IA1 was associated with CC18, CC28 and CC3. In addition, our study confirms the association between CC18 and acne, and between CC53 and healthy skin.

Our results show a decrease in diversity of *P. acnes* phylotypes in severe back acne (all patients had a minimum of 2 nodules on the back and 40% of patients were scored 4–5). This loss of diversity could be the result of hyperseborrhoea, which is associated with both qualitative and quantitative sebum modifications inducing alteration of the skin barrier and, subsequently, microbiota changes. Interestingly, it has been shown that there is a direct link between hyperseborrhoea, proliferation of *P. acnes* and onset of acne lesions (31). As the microbiota modulates the innate immunity of the skin (32, 33), this loss of diversity could activate innate immunity, triggering the development of inflammatory acne lesions.

We also report differences in the pattern of *P. acnes* phylotypes between the back and face. We hypothesize that these differences might be related to several factors that impact differently on face/back skin bacterial populations, such as cleansers and physical agents (wind, sun, etc.), although this has not been investigated for *P. acnes* phylotypes (3, 4).

In culture we identified *P. namnetense* in 3 patients (2 minor acne face score 1; 1 severe acne back score 3), which has not been described previously in acne and could lead to further investigations about the link between this bacterium and specific clinical forms of acne. All patients and controls were positive for *P. acnes* or related species with our sampling method, which is an important point at the methodological level, compared with previous studies in which culture positivity was found in approximately 70–84% of patient samples (34, 35). Concerning the association between *S. epidermidis* and *P. acnes*, we identified *S. epidermidis* in 50% of acne back samples (41.6% in healthy back), and 75% of acne face samples (75% in healthy face) (data not shown), respectively. Interestingly, these data favour the hypothesis of a symbiotic association between *P. acnes* and *S. epidermidis*, as a crucial element for skin microbiota balance (3, 36).

At the bacteriological level this study sheds light on an important question: Do all CCs that belong to a same cluster (i.e. IA1) stimulate innate immunity effectors in the same way? Seeing how different the *P. acnes* CCs and SLST-types are from one body area to another in both acne/healthy context, the elucidation of this question will permit better understand of the role of certain *P. acnes* subgroups (i.e. SLST-types and CCs), and determine whether some of them are associated with pro-inflammatory reactions in human skin.

The results of this study suggest that acne could be associated with the proliferation of one specific phylotype. These results can be related to the study from Tax et al. (37), who found a difference in growth properties and propionic acid production between the different *P. acnes* phylotypes. Taken together, these data provide a potential explanation for the role of the different *P. acnes* phylotypes in acne physiopathology.

This study opens up new areas of research into innovative alternative treatments for acne. In 2015, Yu et al. reviewed *P. acnes* molecular typing methods, and pointed out the importance of investigating *P. acnes* populations in acne vulgaris (38). The microbiological results presented here may be crucial for the elaboration of innovative therapies, such as probiotic treatments, as suggested previously (38). For instance, future topical treatments could restore the phylotype diversity, through re-introduction of *P. acnes* subgroup CC53. In addition, our data give a precise lineage description of the dominant *P. acnes* clones found in the context of severe acne, identifying for the first time the A1 SLST-type as the predominant SLST-type found in this disease. This information is currently the most precise genetic level of subgroup identification concerning *P. acnes* bacterium (24). It suggests the possibility of setting up a vaccine targeting A1 SLST-type, especially for children with a family history of severe acne, and with previous isotretinoin treatment in parents or brothers and sisters. Indeed, as acne occurs earlier and is more severe in patients with a positive family history, there is a need to investigate ways to prevent acne development, such as vaccination. Such treatments might prevent the irreversible scars associated with severe acne, which is a major problem in this disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a research grant from Galderma R&D - CUTIS (Sophia Antipolis). The authors would like to thank Dr Knol, Elodie Belliot, Nathalie Defossé and Julie Marraillac for technical support and assistance, and Aurélie Boisrobert for assistance with clinical sampling.

Conflicts of interest: SC, MS-J. and JM N have no conflicts of interest to declare. BD, AK and MAD declare a potential conflict of interest, as the study was funded by Galderma R&D - CUTIS (Sophia Antipolis, France). VB is an employee of Galderma R&D - CUTIS (Sophia Antipolis, France).

REFERENCES

- Dawson AL, Dellavalle RP. Acne vulgaris. *BMJ* 2013; 346: f2634.
- Bouslimani A, Porto C, Rath CM, Wang M, Guo Y, Gonzalez A, et al. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: E2120–2129.
- Dréno B, Araviiskaia E, Berardesca E, Gontijo G, Sanchez Viera M, Xiang LF, et al. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016; 30: 2038–2047.
- Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 244–253.
- Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S. Propionibacterium acnes, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Médecine Mal Infect* 2014; 44: 241–250.
- Daguzé J, Frénard C, Saint-Jean M, Dumont R, Touchais S, Corvec S, et al. Two cases of non-prosthetic bone and joint infection due to Propionibacterium acnes. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016; 30: e136–e137.
- Khasseba J, Hellmark B, Davidsson S, Unemo M, Nilsson-Augustinsson Å, Söderquist B. Antibiotic susceptibility of Propionibacterium acnes isolated from orthopaedic implant-associated infections. *Anaerobe* 2015; 32: 57–62.
- Veitch D, Abioye A, Morris-Jones S, McGregor A. Propionibacterium acnes as a cause of lung abscess in a cardiac transplant recipient. *BMJ Case Rep* 2015; 2015. pii: bcr2015212431.
- Davidsson S, Mölling P, Rider JR, Unemo M, Karlsson MG, Carlsson J, et al. Frequency and typing of Propionibacterium acnes in prostate tissue obtained from men with and without prostate cancer. *Infect Agent Cancer* 2016; 11: 26.
- de Brouwer B, Veltkamp M, Wauters CA, Grutters JC, Jansen R. Propionibacterium acnes isolated from lymph nodes of patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis Off J WASOG* 2015; 32: 271–274.
- Bayston R, Ashraf W, Barker-Davies R, Tucker E, Clement R, Clayton J, et al. Biofilm formation by Propionibacterium acnes on biomaterials in vitro and in vivo: impact on diagnosis and treatment. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81: 705–709.
- Jasson F, Nagy I, Knol AC, Zuliani T, Khammari A, Dréno B. Different strains of Propionibacterium acnes modulate differently the cutaneous innate immunity. *Exp Dermatol* 2013; 22: 587–592.
- Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L. Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 931–938.
- Agak GW, Qin M, Nobe J, Kim M-H, Krutzik SR, Tristan GR, et al. Propionibacterium acnes induces an IL-17 response in acne vulgaris that is regulated by vitamin A and vitamin D. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 366–373.
- Kilian M, Scholz C, Lomholt HB. multilocus sequence typing and phylogenetic analysis of propionibacterium acnes. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1158–1165.
- Barnard E, Liu J, Yankova E, Cavalcanti SM, Magalhães M, Li H, et al. Strains of the Propionibacterium acnes type III lineage are associated with the skin condition progressive macular hypomelanosis. *Sci Rep* 2016; 6: 31968.
- Yu Y, Champer J, Agak GW, Kao S, Modlin RL, Kim J. Different Propionibacterium acnes phylotypes induce distinct immune responses and express unique surface and secreted proteomes. *J Invest Dermatol* 2016; 136: 2221–2228.
- Dreno B, Bodokh I, Chivot M, Daniel F, Humbert P, Poli F, et al. La grille ECLA : un système de cotation de l'acné pour la pratique quotidienne du dermatologue. *Ann Dermatol Venereol* 1999; 126: 136–141.
- Dréno B, Poli F, Pawin H, Beylot C, Faure M, Chivot M, et al. Development and evaluation of a Global Acne Severity Scale (GEA Scale) suitable for France and Europe. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 43–48.
- Lomholt HB, Scholz CFP, Brüggemann H, Tettelin H, Kilian M. A comparative study of Cutibacterium (Propionibacterium) acnes clones from acne patients and healthy controls. *Anaerobe* 2017; 47: 57–63.
- Barnard E, Nagy I, Hunyadkúrti J, Patrick S, McDowell A. Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen Propionibacterium acnes. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 1149–1155.
- McDowell A, Gao A, Barnard E, Fink C, Murray PI, Dowson CG, et al. A novel multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen Propionibacterium acnes and characterization of type I cell surface-associated antigens. *Microbiol Read Engl* 2011; 157: 1990–2003.
- Lomholt HB, Kilian M. Population genetic analysis of Propionibacterium acnes identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne. *PLoS One* 2010; 5: e12277.
- Scholz CFP, Jensen A, Lomholt HB, Brüggemann H, Kilian M. A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of Propionibacterium acnes in vivo. *PLoS One* 2014; 9: e104199.
- Lomholt HB, Kilian M. Clonality and anatomic distribution on the skin of antibiotic resistant and sensitive Propionibacterium acnes. *Acta Derm Venereol* 2014; 94: 534–538.
- Scholz CFP, Brüggemann H, Lomholt HB, Tettelin H, Kilian M. Genome stability of Propionibacterium acnes: a comprehensive study of indels and homopolymeric tracts. *Sci Rep* 2016; 6: 20662.
- Paugam C, Corvec S, Saint-Jean M, Le Moigne M, Khammari A, Boisrobert A, et al. Propionibacterium acnes phylotypes and acne severity: an observational prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017; 31: e398–e399.
- Nakase K, Hayashi N, Akiyama Y, Aoki S, Noguchi N. Antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of Propionibacterium acnes isolated from acne patients in Japan between 2013 and 2015. *J Dermatol* 2017; 44: 1248–1254.
- Mak TN, Yu S-H, De Marzo AM, Brüggemann H, Sfanos KS. Multilocus sequence typing (MLST) analysis of Propionibacterium acnes isolates from radical prostatectomy specimens. *The Prostate* 2013; 73: 770–777.
- Minegishi K, Watanabe T, Furukawa A, Uchida K, Suzuki Y, Akashi T, et al. Genetic profiles of Propionibacterium acnes and identification of a unique transposon with novel insertion sequences in sarcoid and non-sarcoid isolates. *Sci Rep* 2015; 5: 9832.
- Moorelatsos K, Eady EA, Cunliffe WJ, Clark SM, Cove JH. Temporal changes in sebum excretion and propionibacterial colonization in preadolescent children with and without acne. *Br J Dermatol* 2007; 156: 22–31.
- Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 1974–1980.
- Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, Leichtle A, Yang Y, Cogen AL, et al. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat Med* 2009; 15: 1377–1382.
- Giannopoulos L, Papaparaskevas J, Refene E, Daikos G, Stavrianeas N, Tsakris A. MLST typing of antimicrobial-resistant Propionibacterium acnes isolates from patients with moderate to severe acne vulgaris. *Anaerobe* 2015; 31: 50–54.
- Ma Y, Zhang N, Wu S, Huang H, Cao Y. Antimicrobial activity of topical agents against Propionibacterium acnes: an in vitro study of clinical isolates from a hospital in Shanghai, China. *Front Med* 2016; 10: 517–521.
- Christensen GJM, Scholz CFP, Enghild J, Rohde H, Kilian M, Thürmer A, et al. Antagonism between Staphylococcus epidermidis and Propionibacterium acnes and its genomic basis. *BMC Genomics* 2016; 17: 152.
- Tax G, Urbán E, Palotás Z, Puskás R, Kónya Z, Bíró T, et al. Propionic acid produced by propionibacterium acnes strains contributes to their pathogenicity. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 43–49.
- Yu Y, Champer J, Garbán H, Kim J. Typing of Propionibacterium acnes: a review of methods and comparative analysis. *Br J Dermatol* 2015; 172: 1204–1209.

***Cutibacterium acnes* molecular typing: time to standardize the method**

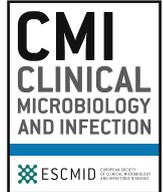
Marie-Ange Dagnelie, Amir Khammari, Brigitte Dréno, Stéphane Corvec

Revue narrative publiée dans *Clinical Microbiology and Infection*



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Narrative review

Cutibacterium acnes molecular typing: time to standardize the methodM.-A. Dagnelie¹, A. Khammari¹, B. Dréno¹, S. Corvec^{2,*}¹ Dermatology Department, CHU Nantes, CIC 1413, CRCINA, University Nantes, Nantes, France² Bacteriology Department, CHU Nantes, CRCINA, University Nantes, Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2018

Received in revised form

1 March 2018

Accepted 3 March 2018

Available online xxx

Editor: S.J. Cutler

Keywords:

Acne

Bone and joint infection

Cutibacterium acnes

MLST

Molecular typing method

Phylotype

Prostate

Sarcoidosis

SLST

ABSTRACT

Background: The Gram-positive, anaerobic/aerotolerant bacterium *Cutibacterium acnes* is a commensal of healthy human skin; it is subdivided into six main phylogenetic groups or phylotypes: IA1, IA2, IB, IC, II and III. To decipher how far specific subgroups of *C. acnes* are involved in disease physiopathology, different molecular typing methods have been developed to identify these subgroups: i.e. phylotypes, clonal complexes, and types defined by single-locus sequence typing (SLST). However, as several molecular typing methods have been developed over the last decade, it has become a difficult task to compare the results from one article to another.

Aims: Based on the scientific literature, the aim of this narrative review is to propose a standardized method to perform molecular typing of *C. acnes*, according to the degree of resolution needed (phylotypes, clonal complexes, or SLST types).

Content: We discuss the existing different typing methods from a critical point of view, emphasizing their advantages and drawbacks, and we identify the most frequently used methods. We propose a consensus algorithm according to the needed phylogeny resolution level. We first propose to use multiplex PCR for phylotype identification, MLST9 for clonal complex determination, and SLST for phylogeny investigation including numerous isolates.

Implications: There is an obvious need to create a consensus about molecular typing methods for *C. acnes*. This standardization will facilitate the comparison of results between one article and another, and also the interpretation of clinical data. **M.-A. Dagnelie, Clin Microbiol Infect 2018;■:1**

© 2018 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Cutibacterium acnes (formerly *Propionibacterium acnes*) is a Gram-positive bacterium known to be a key member of the human skin microbiota [1]. Although it has been often reported as a contaminant of cultures and not as an obvious pathogen, *C. acnes* is today regarded as an opportunistic microorganism and is probably underdiagnosed [2]. Its involvement in device-related infections—including prosthetic joint and spinal instrumentation infections—is being increasingly highlighted [3,4]. Detection of *C. acnes* has also been reported during sarcoidosis [5], prostate cancer [6], and progressive macular hypomelanosis [7,8]. *C. acnes*

has also been described in acne vulgaris [9]. Currently, the *C. acnes* population is subdivided into six main phylotypes: IA1, IA2, IB, IC, II and III [10–14]. So far, the role of specific *C. acnes* subgroups in the physiopathology of these diseases remains a field of intense scientific debate.

In the last decade, in order to decipher how far *C. acnes*-specific clades or lineages are involved in disease physiopathology, several molecular typing methods have been developed to identify subgroups—i.e. phylotypes, clonal complexes, types defined by single-locus sequence typing (SLST)—potentially associated with specific disease conditions [5–8,15]. All these molecular methods are based on partial amplification and sequencing of conserved genes. However, despite a renewed interest over several years, it remains difficult to obtain a clear overview of the implication of *C. acnes* subgroups in specific diseases. Indeed, molecular typing methods used and data dedicated to a clinical entity are not comparable from one study to another. Therefore, to compare the phylogeny of clinical isolates recovered during different diseases, we consider

* Corresponding author. S. Corvec, Institut de Biologie des Hôpitaux de Nantes, Service de Bactériologie-Hygiène Hospitalière, CHU de Nantes, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01, France.

E-mail address: stephane.corvec@chu-nantes.fr (S. Corvec).

that medical and scientific research is needed to establish a consensus about *C. acnes* molecular typing methods available, and thus to build up an internationally recognized reference method. Here, we reviewed the existing molecular typing methods recently proposed, and evaluated the most discriminating ones according to the literature. We propose an appropriate scheme to perform *C. acnes* molecular typing according to the level of phylogeny identification needed—i.e. phylotype, multi-locus sequence typing (MLST) types, SLST types—in order to build up a global solution using harmonized current methods.

Methods developed for *C. acnes* molecular typing

Context

Over the years, the phylogenetic tree of the different lineages of *C. acnes* has evolved considerably. Indeed, *C. acnes* has been historically typed into two groups (I and II) according to several criteria, including serological agglutination tests, the ability to metabolize sugar and sugar alcohols, and susceptibility to bacteriophages [16–20].

Subsequently, another rapid and accessible typing method based on the amplification of variable regions of the genome has been proposed. This method has been useful to analyse in a standardized way a large number of strains at the same time. Thus, Shannon et al. have developed a PCR typing scheme using specific primers for each type and amplifying short regions of the *recA* gene that differentiate types IA, IB and II [21]. Kwon et al. have also used this method to classify *C. acnes* isolates from acne lesions [22]. On the other hand, a rep-PCR method providing a standardized band pattern has been evaluated by Davidsson et al. on *C. acnes* isolates from prostate cancer tissues [23]. Recently, Aubin et al. demonstrated the ability of this method to screen and distinguish the phylotype of clinical *C. acnes* strains [24]. Unfortunately, this method is no longer available on the market. Other methods (serotyping, ribotyping etc) have previously been used to perform typing of *C. acnes*, but nowadays they are no longer used and have given way to faster, more efficient and discriminating techniques based on molecular biology.

Phylotype determination

recA or *tly* PCR/sequencing typing method

Historically, the first molecular typing method developed was based on amplification and sequencing of a single gene target, especially the *recA* or *tly* genes. In 2005, three phylogenetic groups were defined: IA, IB and II [12,25]. Then phylotype III was reported, leading to four groups [13], and the identification of phylotype IC increased the number of subtypes to five [26].

Multiplex PCR for phylotype determination

The most efficient, cheapest, and less time-consuming method for determining phylotype has proved to be the multiplex PCR developed in 2015 [10]. This method is based on the simultaneous amplification of six genes leading to a combination of band profiles (Table S1a). This method requires only amplification and migration. More recently, regarding the *C. acnes* genome available in the GenBank databases (more than 139 publicly available), new genomic analyses have also been performed, and it has been proposed that three subspecies of *C. acnes* be distinguished [27,28].

MLST molecular typing

More specific typing methods were needed to precisely characterize strain phylogeny and to determine to which main clusters

the clinical isolates recovered from human samples belong, allowing correlation between specific lineages and diseases. Since the 2000s, one of the most interesting methods developed to perform molecular typing has been the MLST. Originally, the first scheme was developed in 1998 for *Neisseria meningitidis* [29]. The MLST method aims to establish the sequence type (ST) or clonal complexes (CCs) of bacteria to identify subgroups based on the allelic profile of each strain. Thanks to this method, phylogenetic trees are built up and illustrate the genetic distances existing between strains.

MLST9 according to Aarhus scheme, 2010 [11]

Regarding *C. acnes*, this molecular typing method—based on the analysis and the partial sequencing of nine genes—has been developed by Lomholt and Kilian (Aarhus scheme). This scheme was the first to be described in 2010 for *C. acnes*. The nine targeted housekeeping genes selected are involved in the bacterial metabolism and are described in the database (Table S1b). The database is available on the MLST website (<http://www.mlst.net/>). At the very last consultation (12/05/2017), 143 STs have been described.

MLST7 according to the Belfast scheme, 2011 [30]

One year later, another molecular typing method based on the analysis and the partial sequencing of seven different genes was developed by McDowell et al. [30]. The seven targeted genes are described in the database available on the website <https://pubmlst.org/pacnes/> (Table S1c).

Only the *recA* gene is shared between the Aarhus and Belfast MLST schemes. A well-documented comparison of both schemes has been published, and shows that the Aarhus scheme is the most discriminating one [31]. In the Aarhus scheme, the targeted genetic sequences are located all along the bacteria genome with a balanced distribution, whereas in the Belfast scheme the targeted genes are concentrated in one half of the genome length [31].

MLST8 according to Belfast scheme, 2012 [14]

McDowell et al. have updated the previous MLST scheme by proposing the analysis of eight genes to increase its discriminatory power [14]. This MLST scheme allows a better discrimination between IA1 and IA2 phylotypes and a better characterization of the rare IC phylotype than the previous one described by the Belfast group. In order to save time and money, the same group subsequently developed a reduced MLST scheme using only four genes which had the same discriminatory power [32]. This scheme enables six main phylotypes to be determined. However, after the first description, no clinical study has used this MLST4 scheme to validate its discriminatory power.

SLST molecular typing

More recently, Scholz et al. have developed a rapid and less expensive way to perform molecular typing of *C. acnes* [15]. More than 139 *C. acnes* genomes were sequenced (available on the Genbank website), enabling the creation of a new scheme based on the analysis of a single locus (SLST) to distinguish all described phylotypes (IA-1, IA-2, IB-1, IB-2, IB-3, IC, II and III).

At that time, very few articles used this innovative method to characterize patient isolates [8,33–35]. However, despite the high typability of the SLST method, we have reported some SLST-negative strains with the original primer set [35]. Scholz et al. equated these SLST-negative strains as ‘non-*C. acnes* strains’. However, we performed both MALDI-TOF (ViteK MS bioMérieux) and *gyrB* sequencing on SLST-negative strains and confirmed the identification as *C. acnes* (data not shown). Thereafter, we confirmed that rare *C. acnes* strains are carrying the SLST

Table 1

Analysis of the scientific literature on the molecular typing methods most used in clinical studies (18 papers in total).

Reference	Isolates number ^a	Method for phylotyping	MLST4, 8 or 9	SLST	Association with disease	Characterization of the strains
Lomholt and Kilian, 2010 [11]	210 (143) ^b	ND	MLST9	ND	Acne (n = 105) Various opportunistic infections (n = 30) Caucasian healthy carriers (n = 55) Chinese healthy carriers (n = 20)	I-1a (n = 77) I-1b (n = 13) I-2 (n = 23) II (n = 26) III (n = 4)
Dekio et al., 2012 [43]	50	ND	MLST7	ND	Healthy volunteers (n = 10) Atopic dermatitis (n = 4) No more detail	IA (n = 14) IB (n = 18) II (n = 13) III (n = 5)
McDowell et al., 2013 [32]	87	ND	MLST4	ND	Acneic lesions (n = 24) Healthy skin covering 'acne-prone' areas (n = 19) Blood (n = 15) Soft tissue infections (n = 27) Medical devices (n = 2)	IA1 (n = 35) IA2 (n = 4) IB (n = 27) IC (n = 1) II (n = 15) III (n = 5)
Mak et al., 2013 [39]	9	ND	MLST9	ND	Prostate cancer (n = 9)	I-2 (n = 2) II (n = 7)
Tomida et al., 2013 [40]	82	ND	MLST8 and MLST9	ND	Skin (acne/healthy) (n = 74) Refractory endodontic lesions (n = 2) Plate (n = 1) Pleuropulmonary infection (n = 1) Aqueous humor (n = 2) Abscess (n = 1) Corneal scrape (n = 1)	I-1a (n = 56) I-1b (n = 6) I-2 (n = 2) II (n = 10) NA (n = 8)
Scholz et al., 2014 [15]	188 (86) ^b	ND	MLST9	Scholz et al. method	Healthy subject (n = 86)	IA1 (n = 48) IA2 (n = 21) IB (n = 4) IC (n = 2) II (n = 9) III (n = 2)
Barnard et al., 2015 [10]	312	Barnard et al. method	ND	ND	Wide range of clinical sources and healthy skin No more detail	IA1 (n = 145) IA2 (n = 20) IB (n = 65) IC (n = 7) II (n = 45) III (n = 30)
Minegishi et al., 2015 [41]	60	ND	MLST9	ND	Representative strain called 'C1' and previously published (n = 1) (Minegishi et al., 2013) Lymph nodes of patients with sarcoidosis (n = 23) Non-metastatic lymph nodes of cancerous patients (n = 10) Healthy skin from healthy individuals (n = 12) Prostate cancer (n = 14)	ST26 (n = 13) ST44 (n = 1) ST103 (n = 1) ST8 (n = 3) ST41 (n = 6) ST104 (n = 1) ST94 (n = 1) ST70 (n = 3) ST51 (n = 3) ST67 (n = 7) ST102 (n = 2) ST95 (n = 1) ST105 (n = 1) ST100 (n = 3) ST110 (n = 1) ST98 (n = 1) ST97 (n = 1) ST91 (n = 1) ST101 (n = 1) ST36 (n = 1) ST112 (n = 1) ST96 (n = 1) ST108 (n = 1) ST109 (n = 1) ST111 (n = 1) ST107 (n = 1) ST106 (n = 1) ST99 (n = 1)
Giannopoulos et al., 2015 [44]	25	ND	MLST8	ND	Acne (n = 25)	IA1 (n = 15) IA2 (n = 8) IB (n = 2)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Reference	Isolates number ^a	Method for phylotyping	MLST4, 8 or 9	SLST	Association with disease	Characterization of the strains
Lomholt et al., 2017 [45]	241	<i>recA</i> and <i>fbA</i> typing	MLST9	ND	Acne (n = 12) Healthy individuals (n = 11)	ST27 CC53 CC36 CC31 CC28 CC18 CC3 The detailed numbers for each CC were not available in the article
Paugam et al., 2017 [35]	63	Barnard et al. method	ND	Scholz et al. method	Mild acne (n = 29) Severe acne (n = 34)	IA1 (n = 39) IA2 (n = 1) IB (n = 3) II (n = 9) III (n = 1) Negative strains for phylotypes (n = 8) <i>Cutibacterium</i> spp. (n = 2)
Petersen et al., 2017 [8]	96 (total used reads = 7674)	ND	ND	Method adapted from Scholz et al.	Patients suffering from progressive macular hypomelanosis (n = 8) Healthy individuals (n = 8)	PMH lesions IA1 (n = 982.2) 12.8% II (n = 429.7) 5.6% III (n = 5671) 73.9% Not visible in article: 7.7% Healthy individuals IA1 (n = 4358.8) 56.8% II (n = 1711.3) 22.3% III (n = 1089.7) 14.2% Not visible in article: 6.7%
Aubin et al., 2017 [24]	88	ND	MLST9	ND	Reference strains (n = 2) Monomicrobial instrumentation spine infections (n = 58) Prosthetic monomicrobial infections (n = 14) Acne lesions (n = 14) Granulome	IA1 (n = 45) IB (n = 35) IC (n = 1) II (n = 7)
Aubin et al., 2017 [46]	3	ND	MLST9	ND		IA1 (n = 1) IA2 (n = 1) IB (n = 1)
Aubin et al., 2017 [3]	11	<i>recA</i> typing	MLST9	ND	Reference strains (n = 2) Monomicrobial spinal instrumentation infections (n = 4) Prosthetic monomicrobial infections (n = 2) Acne lesions (n = 3)	IA1/2 (n = 5) IB (n = 6)
Nakase et al., 2017 [34]	68	ND	ND	Scholz et al. method	Acne patients (n = 113)	IA1 (n = 42) IA2 (n = 22) IB (n = 2) II (n = 2)
Burnham et al., 2017 [37]	140	Barnard et al. method	ND	ND	Central nervous system and prosthetic joint infections	IA1 (n = 35) IA2 (n = 15) IB (n = 36) IC (n = 2) II (n = 39) III (n = 1) Not determined (n = 12)
Dagnelie et al., 2017 [33]	72	Barnard et al. method	MLST9	Scholz et al. method	Patients with severe acne of the back (n = 48) Healthy volunteers (n = 24)	IA1 (n = 47) IA2 (n = 4) IB (n = 2) IC (n = 1) II (n = 13) III (n = 1) Not determined (n = 8)

ND, the concerned molecular typing method was not used in the article.

^a The isolates number is the number of isolates taken into account for molecular typing; it was sometimes different from total isolates used in the study.

^b The number in parenthesis is the number of strains considered for the elaboration of the phylogenetic tree and frequencies calculations presented in the cited study. For these two studies, several strains were isolated from the same patient and from the same body localization.

sequence detectable only with the new primer set. Nevertheless, SLST is particularly indicated for large population studies of *C. acnes* isolated from different origins. Moreover, SLST is one of the rare methods enabling the identification of all *C. acnes* types in complex mixtures without the need to cultivate the bacteria

(DNA extractions followed by PCR and subsequent amplicon sequencing). Thus, it allows a quick analysis of the *C. acnes* population within a clinical sample, as was reported recently by Petersen et al. for progressive macular hypomelanosis [8]. Scholz et al. showed that their scheme allowed typing of 88.4% of the

isolates from healthy individuals. SLST is a fast and less expensive molecular typing method. In addition, this identification level currently represents the most precise genetic information about the *C. acnes* subclones found in the sample. To date, about 113 SLST types have been described. The database is updated regularly and is available on the website <http://medbac.dk/slst/pacnes>.

What are the molecular typing methods most used in clinical studies?

The molecular typing methods used in the scientific literature are various. Several clinical studies use them to identify the *C. acnes* subgroups according to the identification level needed (i.e. phylotypes, CCs or SLSTs) (Table 1).

Phylotypes

Historically, phylotypes determination has been considered as the first level of phylogeny analysis for *C. acnes* clinical isolates. The development of such DNA sequence typing analyses based mostly on *recA* or *tly* genes provided a basic understanding of *C. acnes* population genetic structure [36]. Recently, the rapid and non-expensive method reported by Barnard et al. to identify *C. acnes* phylotypes has been used for clinical isolates [10], and enables a first phylogenetic screening. According to Paugam et al., it enables the identification of 39 IA1 strains, one IA2 strain, three IB strains, nine II strains, and one III strain in the context of moderate to severe acne [35]. The same approach was used by Dagnelie et al., leading to the comparison of isolates from patients with severe back acne and from healthy volunteers. They identified a majority of phylotype IA1 on the backs of severe acne patients ($n = 22$; 95.6%), and higher phylotype diversity on the backs of healthy individuals, with phylotypes IA1 ($n = 4$; 36.3%), II ($n = 6$; 54.5%), and III ($n = 1$; 9.1%). Finally, Burnham et al. suggested that this *C. acnes* typing method was a useful tool in helping to distinguish infections from contaminations in the central nervous system [37].

Thus, this multiplex PCR is useful in terms of first-line phylogenetic information, comparable with MLST and SLST despite particular limitations (limited discriminatory power). This method allows the molecular confirmation of presumptive *C. acnes* isolates along with parallel phylogenetic typing and can represent a phylogeny screening step for clinical strains. This method is a flexible typing tool, and is technically simple for a rapid analysis in non-specialized laboratories.

MLST9

MLST methods have been described for global epidemiology to investigate the circulation of the main clones among a clonal population structure, especially for *Staphylococcus aureus* [38]. To have a more precise view about the *C. acnes* clonal distribution, the MLST scheme is now often used. Although two MLST schemes have been proposed, reviewing the literature on *C. acnes* molecular typing we noticed that 75.0% of papers analysed actually used the MLST9 scheme for CC/ST determination, probably because of its previously suggested higher discriminatory power [31]. For example, this method allowed identification of CC18 as the dominant clone found in patients with severe back acne [33]. Furthermore, it enabled the identification of CC53/60 and CC36 in association with prostate-cancer-derived *C. acnes* isolates [39]. Likewise, it enables the identification of CC53 and CC36 as

associated with prosthetic and joint infections, while CC18 or CC28 were more involved in spinal instrumentation infections [24]. Finally, Minegheshi et al. revealed a high diversity in clinical sarcoidosis samples with numerous singletons belonging to different clusters ($n = 26$) despite an overrepresentation of *C. acnes* ST26.

The main advantages of MLST9 are: a high reproducibility within and between laboratories, with accurate and exchangeable data thanks to sequence-based analysis. As for other pathogens, this sequence-based method provides relevant, robust, valid and transferable results to investigate clinical strains epidemiologically and also the dynamic evolution of the *C. acnes* population. This scheme provides a high-resolution phylogeny which correlates with that of the rare whole-genome sequencing (WGS) analysis [15]. However, routinely, this cumbersome method (MLST9) has some disadvantages; the main drawbacks remain the cost and the lengthy time required to obtain the results, particularly if numerous strains are included. In addition, the relevant choice concerning which target genes to sequence in order to reach a minimum discriminatory power has proved to be difficult, and some genome modifications (microdeletions, gene transfers) cannot be investigated compared to WGS analysis.

SLST

Finally, if needed, SLST gives precise genomic information and accurately discriminates between *C. acnes* populations. This recent method has been performed in only a few papers describing these subclones. However, it has already been shown that the SLST type A1 is clearly associated with severe acne skin condition [33,35]. In a Japanese population, Nakase et al. reported the presence of macrolide-resistant *C. acnes* SLST type A in acne patients [34]. This method is a promising tool for *C. acnes* molecular typing, being less expensive than MLST and having a high-resolution power to analyse large populations of *C. acnes*. SLST is the only method (except for ribotyping) that enables identification of all *C. acnes* types in complex mixtures without the need to cultivate the bacteria. Thus, we recommend the SLST method as the reference-standard method to use when there is a need to analyse large *C. acnes* populations, and also if the study needs precise information about the clade (SLST level).

Globally, our analysis reveals that among the 18 papers described, 13 actually use an MLST scheme in their molecular typing procedure, including the one of Tomida et al. [40] which describes both MLST8 and MLST9 but which was excluded from the analysis. From the 12 papers included, nine (75.0%) use the Aarhus scheme. This percentage demonstrates that the MLST9 scheme seems to be the scheme most used around the world [24,39,41].

The fact that several nomenclatures exist is a cause of confusion as these clusters do not correspond to each other. For instance, as recently reported, the clades will not be the same if a different MLST scheme has been used: IB in a *recA* typing method corresponds to IB1 clade and to I-1b in the scheme of Lomholt and Kilian [11]. The same strain belongs to CC4 according to the McDowell scheme [14], whereas it belongs to CC31 according to the scheme of Lomholt and Kilian [11]. This striking example illustrates the urgent need to adopt a reference method to perform molecular typing of *C. acnes* clinical isolates. A standardized method will allow readers to clearly understand to which clade the considered strain belongs.

For these reasons, we recommend harmonizing the *C. acnes* CC/ST determination which can constitute a future reference method for phylogeny studies (Fig. 1, Table S2).

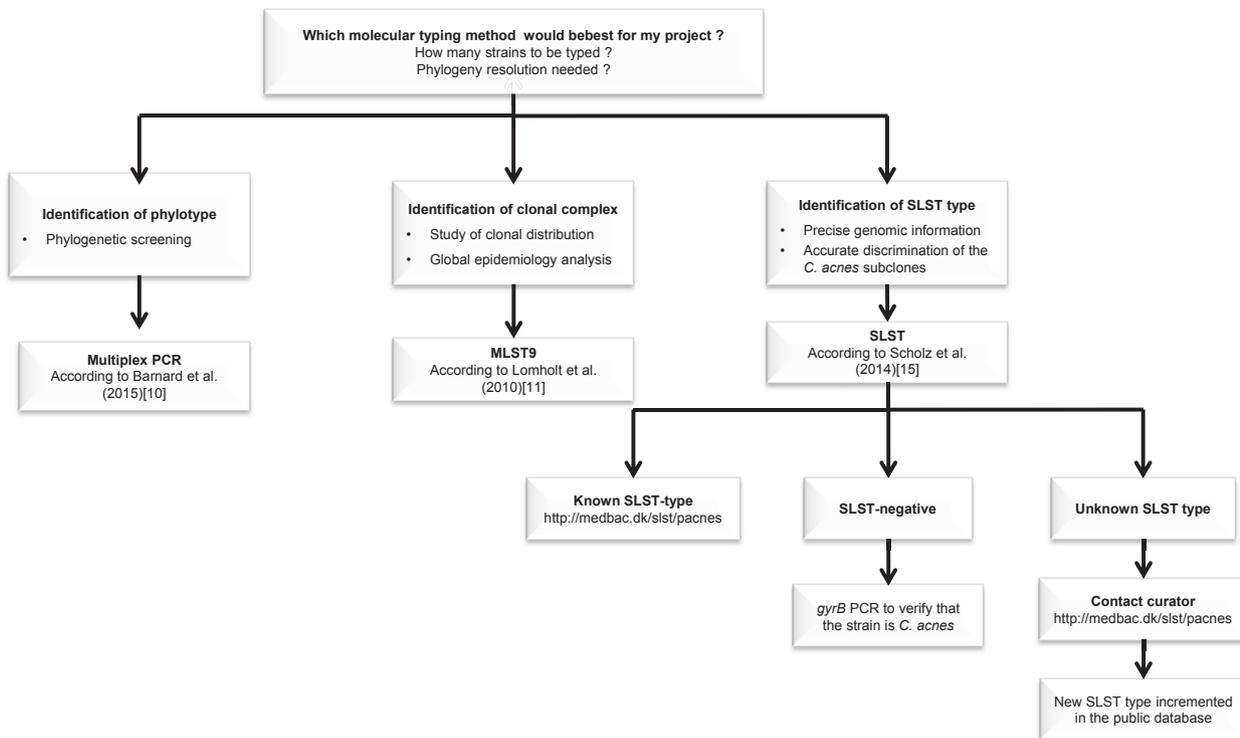


Fig. 1. Decision flowchart for choosing the method of molecular typing. MLST, multi-locus sequence typing; SLST, single-locus sequence typing.

Conclusion and WGS outlooks

To understand *C. acnes* phylogeny and clonal distribution, and their implication in disease physiopathology, typing methods have been developed and have succeeded in identifying *C. acnes* subgroups (i.e. phylotypes, CCs, SLST types). However, many typing methods have been developed, and as they have not been standardized it is difficult to obtain a clear overview of *C. acnes* subgroups and their implication in diseases, as well as to make comparisons between studies. Here, we have reviewed the existing molecular typing methods and have proposed a consensus for *C. acnes* molecular typing according to the degree of identification needed (i.e. phylotype, MLST types, SLST types), as follows: multiplex PCR for general phylotype studies [10], MLST9 for clonal distribution analysis of *C. acnes* populations [11], and SLST for accurate characterization of specific lineages [15]. Taking these data together, and according to the intended level of characterization, we propose a decision flowchart to choose the method of molecular typing (Fig. 1).

In the future, WGS implementation will surely become of great interest as an innovative method for molecular typing. At the time of writing, no relevant study based on *C. acnes* WGS analysis or genome comparisons in different clinical settings have been reported. However, as WGS deciphers the entire bacterial genome, it enables the sequencing of all critical genetic sequences at the same time (MLST and SLST sequences). Therefore, we would have access to all molecular typing levels at the same time, even in the event of horizontal gene transfers, conjugation or recombination. This new age could permit the rapid acquisition of novel types of information, such as virulence genes, and will probably open up new inquiries to investigate resistome and virulome [42]. As soon as this method becomes more commonly used by researchers, it may become the reference method for molecular typing of any bacterium for which sequence types are described and identifiable. For

these future studies, single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis with wgMLST (whole-genome multi-locus sequence typing) will offer a fast and cost-effective way to analyse the bacterial genome, replacing Sanger sequencing, with higher typing resolution taking into account a much larger number of loci. These future approaches for *C. acnes* might be biologically and epidemiologically more relevant than ones that consider only point mutations.

Transparency declaration

All authors declare no conflicts of interest relevant to this article. No external funding was received for this research project.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.03.010>.

References

- [1] Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:244–53. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>.
- [2] Portillo ME, Corvec S, Borens O, Trampuz A. *Propionibacterium acnes*: an underestimated pathogen in implant-associated infections. *BioMed Res Int* 2013;2013:804391. <https://doi.org/10.1155/2013/804391>.
- [3] Aubin GG, Baud'huin M, Lavigne J-P, Brion R, Gouin F, Lepelletier D, et al. Interaction of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* with bone cells: a step toward understanding bone and joint infection development. *Sci Rep* 2017;7:42918. <https://doi.org/10.1038/srep42918>.
- [4] Bémer P, Corvec S, Tariel S, Asseray N, Boutoille D, Langlois C, et al. Significance of *Propionibacterium acnes*-positive samples in spinal instrumentation. *Spine* 2008;33:E971–6. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31818e28dc>.
- [5] de Brouwer B, Veltkamp M, Wauters CA, Grutters JC, Janssen R. *Propionibacterium acnes* isolated from lymph nodes of patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Dif* 2015;32:271–4.

- [6] Davidsson S, Mölling P, Rider JR, Unemo M, Karlsson MG, Carlsson J, et al. Frequency and typing of *Propionibacterium acnes* in prostate tissue obtained from men with and without prostate cancer. *Infect Agent Cancer* 2016;11:26. <https://doi.org/10.1186/s13027-016-0074-9>.
- [7] Barnard E, Liu J, Yankova E, Cavalcanti SM, Magalhães M, Li H, et al. Strains of the *Propionibacterium acnes* type III lineage are associated with the skin condition progressive macular hypomelanosis. *Sci Rep* 2016;6:31968. <https://doi.org/10.1038/srep31968>.
- [8] Petersen RLW, Scholz CFP, Jensen A, Brüggemann H, Lomholt HB. *Propionibacterium acnes* phylogenetic type III is associated with progressive macular hypomelanosis. *Eur J Microbiol Immunol* 2017;7:37–45. <https://doi.org/10.1556/1886.2016.00040>.
- [9] Beylot C, Auffret N, Poli F, Claudel J-P, Leccia M-T, Del Giudice P, et al. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014;28:271–8. <https://doi.org/10.1111/jdv.12224>.
- [10] Barnard E, Nagy I, Hunyadkúrti J, Patrick S, McDowell A. Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*. *J Clin Microbiol* 2015;53:1149–55. <https://doi.org/10.1128/JCM.02460-14>.
- [11] Lomholt HB, Kilian M. Population genetic analysis of *Propionibacterium acnes* identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne. *PLoS One* 2010;5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012277>.
- [12] McDowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney MM, Glenn JV, McLorinan GC, et al. *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. *J Clin Microbiol* 2005;43:326–34. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.326-334.2005>.
- [13] McDowell A, Perry AL, Lambert PA, Patrick S. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. *J Med Microbiol* 2008;57:218–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47489-0>.
- [14] McDowell A, Barnard E, Nagy I, Gao A, Tomida S, Li H, et al. An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium acnes*: investigation of “pathogenic”, “commensal” and antibiotic resistant strains. *PLoS One* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041480>.
- [15] Scholz CFP, Jensen A, Lomholt HB, Brüggemann H, Kilian M. A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of *Propionibacterium acnes* in vivo. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104199>.
- [16] Holmberg K, Forsum U. Identification of actinomyces, arachnia, bacterionema, rothia, and *Propionibacterium* species by defined immunofluorescence. *Appl Microbiol* 1973;25:834–43.
- [17] Kishishita M, Ushijima T, Ozaki Y, Ito Y. Biotyping of *Propionibacterium acnes* isolated from normal human facial skin. *Appl Environ Microbiol* 1979;38:585–9.
- [18] Voss JG. Differentiation of two groups of *Corynebacterium acnes*. *J Bacteriol* 1970;101:392–7.
- [19] Webster GF, Cummins CS. Use of bacteriophage typing to distinguish *Propionibacterium acne* types I and II. *J Clin Microbiol* 1978;7:84–90.
- [20] Johnson JL, Cummins CS. Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria, and strains of *Arachnia propionica*. *J Bacteriol* 1972;109:1047–66.
- [21] Shannon BA, Cohen RJ, Garrett KL. Polymerase chain reaction-based identification of *Propionibacterium acnes* types isolated from the male urinary tract: evaluation of adolescents, normal adults and men with prostatic pathology. *BJU Int* 2006;98:388–92. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06273.x>.
- [22] Kwon HH, Yoon JY, Park SY, Suh DH. Analysis of distribution patterns of *Propionibacterium acnes* phylotypes and *Peptostreptococcus* species from acne lesions. *Br J Dermatol* 2013;169:1152–5. <https://doi.org/10.1111/bjd.12486>.
- [23] Davidsson S, Söderquist B, Elgh F, Olsson J, André O, Unemo M, et al. Multilocus sequence typing and repetitive-sequence-based PCR (DiversiLab) for molecular epidemiological characterization of *Propionibacterium acnes* isolates of heterogeneous origin. *Anaerobe* 2012;18:392–9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.015>.
- [24] Aubin GG, Lavigne J-P, Foucher Y, Dellièrre S, Lepelletier D, Gouin F, et al. Tropism and virulence of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium acnes*) clones involved in implant-associated infection. *Anaerobe* 2017;47:73–8. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.04.009>.
- [25] Valanne S, McDowell A, Ramage G, Tunney MM, Einarsson GG, O'Hagan S, et al. CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. *Microbiol Read Engl* 2005;151:1369–79. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27788-0>.
- [26] McDowell A, Hunyadkúrti J, Horváth B, Vörös A, Barnard E, Patrick S, et al. Draft genome sequence of an antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* strain, PRP-38, from the novel type IC cluster. *J Bacteriol* 2012;194:3260–1. <https://doi.org/10.1128/JB.00479-12>.
- [27] Dekio I, Culak R, Misra R, Gaulton T, Fang M, Sakamoto M, et al. Dissecting the taxonomic heterogeneity within *Propionibacterium acnes*: proposal for *Propionibacterium acnes* subsp. *acnes* subsp. nov. and *Propionibacterium acnes* subsp. *elongatum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015;65:4776–87. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000648>.
- [28] McDowell A, Barnard E, Liu J, Li H, Patrick S. Proposal to reclassify *Propionibacterium acnes* type I as *Propionibacterium acnes* subsp. *acnes* subsp. nov. and *Propionibacterium acnes* type II as *Propionibacterium acnes* subsp. *defendens* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016;66:5358–65. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001521>.
- [29] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3140–5.
- [30] McDowell A, Gao A, Barnard E, Fink C, Murray PI, Dowson CG, et al. A novel multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes* and characterization of type I cell surface-associated antigens. *Microbiol Read Engl* 2011;157:1990–2003. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049676-0>.
- [31] Kilian M, Scholz C, Lomholt HB. Multilocus sequence typing (MLST) and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes*. *J Clin Microbiol* 2011. <https://doi.org/10.1128/JCM.06129-11>.
- [32] McDowell A, Nagy I, Magyari M, Barnard E, Patrick S. The opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*: insights into typing, human disease, clonal diversification and CAMP factor evolution. *PLoS One* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070897>.
- [33] Dagnelie M-A, Corvec S, Saint-Jean M, Bourdès V, Nguyen J-M, Khammari A, et al. Decrease in diversity of *Propionibacterium acnes* phylotypes in patients with severe acne on the back. *Acta Derm Venereol* 2017. <https://doi.org/10.2340/00015555-2847>.
- [34] Nakase K, Hayashi N, Akiyama Y, Aoki S, Noguchi N. Antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in Japan between 2013 and 2015. *J Dermatol* 2017. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13913>.
- [35] Paugam C, Corvec S, Saint-Jean M, Le Moigne M, Khammari A, Boisrobert A, et al. *Propionibacterium acnes* phylotypes and acne severity: an observational prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017. <https://doi.org/10.1111/jdv.14206>.
- [36] McDowell A. Over a decade of recA and tly gene sequence typing of the skin bacterium *Propionibacterium acnes*: what have we learnt? *Microorganisms* 2017;6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010001>.
- [37] Burnham JP, Shupe A, Burnham CD, Warren DK. Utility of strain typing of *Propionibacterium acnes* in central nervous system and prosthetic joint infections to differentiate contamination from infection: a retrospective cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3090-9>.
- [38] Oosthuysen WF, Orth H, Lombard CJ, Sinha B, Wasserman E. Population structure analyses of *Staphylococcus aureus* at Tygerberg Hospital, South Africa, reveals a diverse population, a high prevalence of Pantone–Valentine leukocidin genes, and unique local methicillin-resistant *S. aureus* clones. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:652–9. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12452>.
- [39] Mak TN, Yu S-H, De Marzo AM, Brüggemann H, Sfanos KS. Multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Propionibacterium acnes* isolates from radical prostatectomy specimens. *Prostate* 2013;73:770–7. <https://doi.org/10.1002/pros.22621>.
- [40] Tomida S, Nguyen L, Chiu B, Liu J, Sodergren E, Weinstock GM, et al. Pan-genome and comparative genome analyses of *Propionibacterium acnes* reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *mBio* 2013;4(3):e00003–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00003-13>.
- [41] Minegishi K, Watanabe T, Furukawa A, Uchida K, Suzuki Y, Akashi T, et al. Genetic profiles of *Propionibacterium acnes* and identification of a unique transposon with novel insertion sequences in sarcoid and non-sarcoid isolates. *Sci Rep* 2015;5:9832. <https://doi.org/10.1038/srep09832>.
- [42] Zhang N, Lu Z, Ma Y. Draft genome sequences of three multidrug-resistant *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium acnes*) strains isolated from acne patients, China. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;11:114–5. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.008> [Epub 2017 Oct 16].
- [43] Dekio I, Rajendram D, Morita E, Gharbia S, Shah HN. Genetic diversity of *Propionibacterium acnes* strains isolated from human skin in Japan and comparison with their distribution in Europe. *J Med Microbiol* 2012;61(Pt 5):622–30. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.040949-0>.
- [44] Giannopoulos L, Papaparaskevas J, Refene E, Daikos G, Stavrianeas N, Tsakris A. MLST typing of antimicrobial-resistant *Propionibacterium acnes* isolates from patients with moderate to severe acne vulgaris. *Anaerobe* 2015;31:50–4. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.10.007>. Epub 2014 Nov 8. PMID: 25451716.
- [45] Lomholt HB, Scholz CFP, Brüggemann H, Tettelin H, Kilian M. A comparative study of *Cutibacterium* (*Propionibacterium acnes*) clones from acne patients and healthy controls. *Anaerobe* 2017;47:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.04.006>. Epub 2017 Apr 19.
- [46] Aubin GG, Ada Da Silva G, Eishi Y, Jacqueline C, Altare F, Corvec S, et al. Immune discrepancies during in vitro granuloma formation in response to *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium acnes*) infection. *Anaerobe* 2017;48:172–6. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.08.014>. Epub 2017 Aug 30.

A.3 Etude de la capacité de production de biofilm par les souches de *C. acnes*

Pour étudier la capacité de production de biofilm des différentes souches de *C. acnes* isolées, nous avons tout d'abord utilisé la méthode du crystal violet. De nombreux problèmes techniques ont été rencontrés, en particulier le détachement de la plaque de biofilm formée au fond du puit de la plaque, ce qui faussait les résultats lors de la lecture. Nous avons testé quatre milieux de culture différents (BHI 1% glucose, BHI 10% glucose, BHI simple, BCC), quatre souches différentes (ATCC 6919, ATCC 11827, ATCC 35984 (*S. epidermidis*) et *C. avidum* (souche issue de patient)). Egalement, trois types de dilutions ont été testés : pas de dilution, une dilution au 1/100^{ème} et une dilution au 1/1000^{ème}. Enfin, deux types d'inoculum ont été testés, en partant soit de colonies (DO ajustée à 1.00), soit d'une suspension bactérienne liquide pré-incubée pendant 72 h au bain-marie (DO ajustée à 1.00).

Après sept manipulations pour tenter de mettre au point la méthode du crystal violet pour l'étude des biofilms de *C. acnes* et malgré le nombre important de paramètres testés, aucune conclusion n'a pu être formulée quant à l'utilisation de cette technique car elle s'est avérée être non-reproductible. Nous avons donc décidé de ne pas poursuivre les investigations, d'autant qu'une nouvelle collaboration avec le laboratoire BioFilm Control[®] était engagée avec un dispositif plus standardisé. Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer cet échec, et la plus probable semble être le décrochement du biofilm de la plaque 96-puits suite aux lavages successifs du crystal violet. Ce décrochement était en effet bien visible à l'issue des lavages (Figure 47, p.114). La plaque présentée en Figure 47 montre, en particulier en colonne n°2, que le biofilm formée par cette souche a été arraché par les lavages, en comparaison à la colonne n°3 qui présente un biofilm intact.

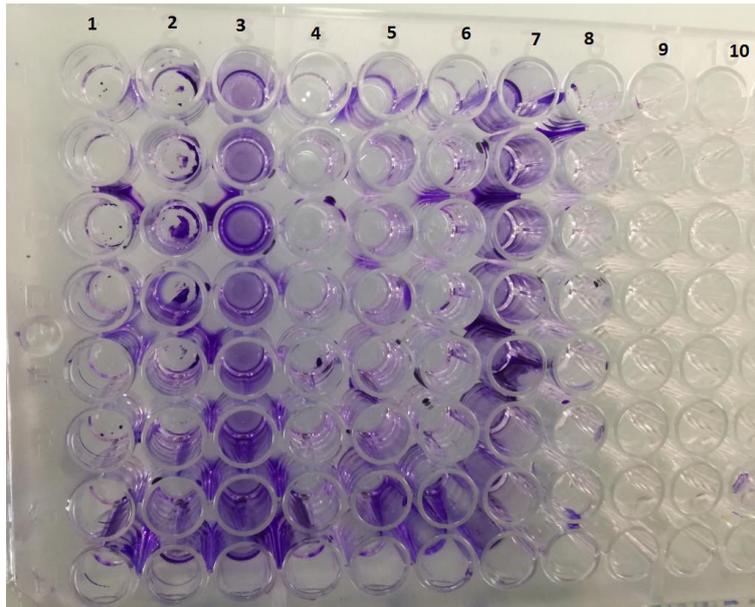


Figure 47 : Photographie d'une plaque où le biofilm bactérien vient d'être coloré avec du crystal violet, l'excès de crystal violet ayant été lavé. Chaque colonne correspond à une souche.

A la suite de ces essais, nous avons commencé les tests avec la technique du Biofilm RingTest, qui a donné des résultats fiables, avec des écart-types exploitables (Figure 48, p.114).

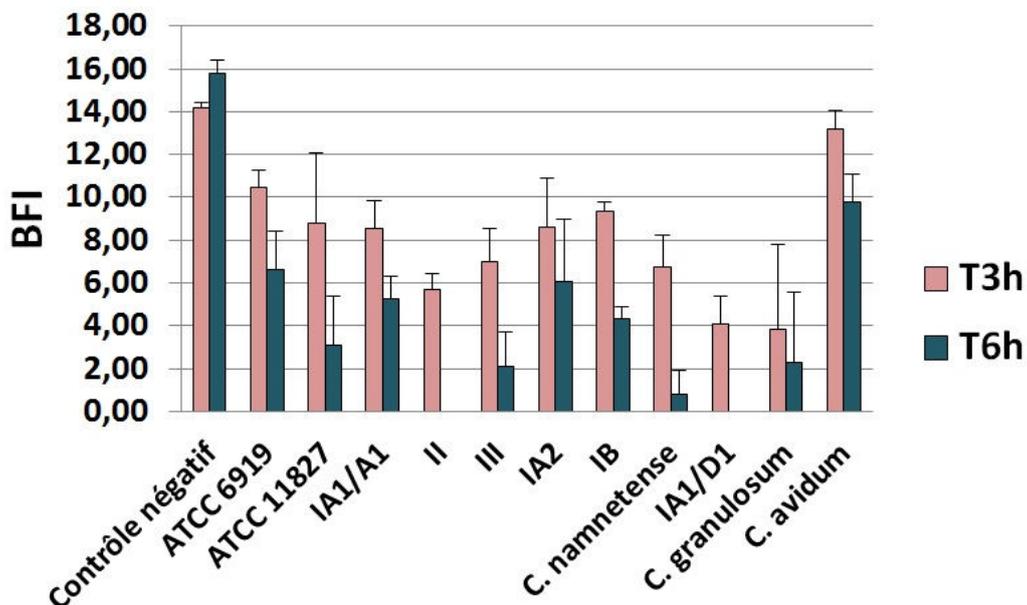


Figure 48 : Capacité de production de différentes souches de *Cutibacterium spp.* Résultats obtenus par la technique du Biofilm RingTest, après n=3 essais indépendants, la BFI étant prise après 3h et 6h d'incubation.

De manière intéressante, les souches de *C. acnes* phylotype II et phylotype IA1 (CC28/D1) présentent déjà une BFI à 0.00 après 6h d'incubation, comparé aux autres souches (Figure 48, p.114). Ceci montre que les différents sous-groupes de *C. acnes* ne présentent pas la même capacité de synthèse de biofilms, ce qui n'avait jamais été montré dans la littérature.

Cette mise au point ouvre la voie à des investigations actuellement en cours. En effet, nous sommes en train de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de formation de biofilm de 14 molécules, appelées « antibiofilmogramme ». Ces résultats ont un intérêt non seulement dans la problématique de l'acné mais également dans les folliculites du cuir chevelu, où le biofilm bactérien commence à être souligné comme jouant un rôle dans la physiopathologie de cette dermatose (Eyraud *et al.*, 2018; Matard *et al.*, 2013). Nous testons actuellement 11 antibiotiques ainsi que trois molécules communément utilisées pour le traitement de l'acné (isotrétinoïne, adapalène et peroxyde de benzoyle). Pour se faire, des tests préliminaires ont été réalisés, notamment sur la viabilité des bactéries en présence de DMSO (DiMethyl SulfOxide), étant donné que certains antibiotiques sont solubilisés et dilués dans ce réactif. La viabilité des bactéries n'a pas été affectée par le DMSO à 1 %, 5 % et 10 %, lors de leur culture dans du BHI liquide. Les antibiofilmogrammes sont actuellement en cours de réalisation.

A.4 Analyses métagénomiques des populations bactériennes

Les prélèvements de flore bactérienne réalisés sur le dos et le visage des patients atteints d'acné sévère et des individus sains ont fait l'objet d'analyses sous-traitées par Galderma R&D au laboratoire ViroScan3D (Lyon, France). A la suite de cette première phase d'analyse, et en accord avec Galderma R&D, nous avons récupéré les fichiers contenant les séquences obtenues (fichiers .fatsq.gz) et avons poursuivi les analyses. Nous voulions notamment connaître les différentes abondances relatives des différentes bactéries présentes à la surface de la peau des deux groupes de notre étude (Figure 49, p. 116).

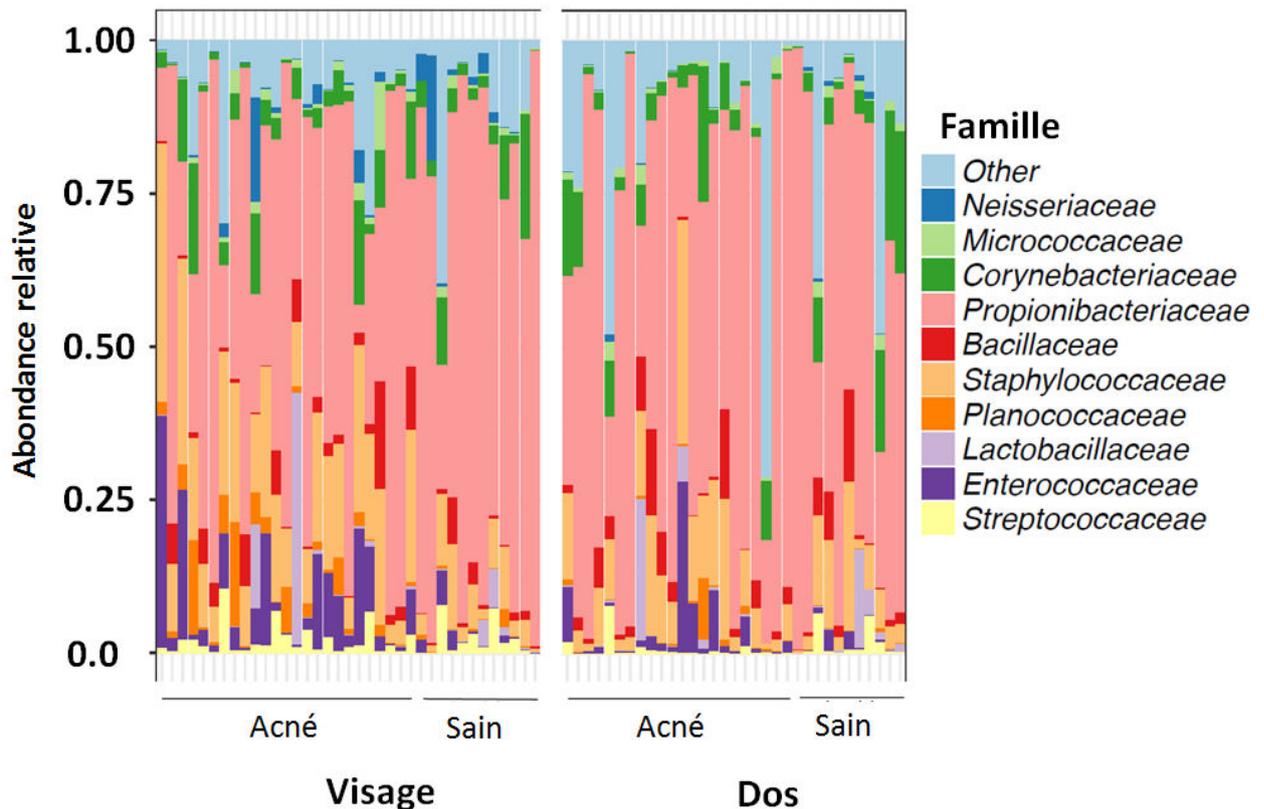


Figure 49 : Analyses métagénomiques des communautés bactériennes présentes à la surface de la peau des deux groupes inclus dans l'étude, sur le dos (droite) et le visage (gauche).

Les résultats mettent en évidence deux profils microbiologiques distincts entre le groupe de patients présentant de l'acné sévère du dos, et le groupe d'individus sains. Tout d'abord, les deux groupes démontrent une forte prédominance de la famille des *Propionibacteriaceae* (Figure 49, p.116). Par ailleurs, les patients atteints d'acné ont démontré une plus forte abondance de bactéries appartenant à la famille des *Enterococcaceae*, comparé au groupe sain (Figure 49, p.116). Ce résultat était plus marqué sur le visage comparé au dos, mais restait significatif pour les deux zones étudiées.

Les résultats de cette partie du travail feront l'objet d'une lettre à l'éditeur qui est en cours de finalisation, que nous soumettrons au « **Journal of Investigative Dermatology** ».

Points de synthèse

- Les résultats préliminaires montrent que des différences de capacité à produire du biofilm sont observées en fonction des sous-groupes de *C. acnes*.
- Les analyses métagénomiques ont pu mettre en évidence des profils de communautés bactériennes différentes à la surface de la peau des patients atteints d'acné sévère du dos, en comparaison au groupe sain.

B. Etude immuno-dermatologique

B.1 Données cliniques

Au total, 24 sujets atteints d'acné sévère du dos et 12 volontaires sains ont été inclus dans l'étude. Concernant les scores de sévérité établis par les dermatologues pour le visage, 14 patients ont montré un score de 1, huit patients ont montré un score de 2, et deux patients ont montré un score de 3. Concernant les scores de sévérité établis par les dermatologues pour le dos, 15 patients ont montré un score de 3, sept patients ont montré un score de 4, et enfin, deux patients ont montré un score de 5.

B.2 Marqueurs de l'immunité innée dans les lésions inflammatoires d'acné sévère du dos

Nous avons étudié l'expression de six marqueurs caractéristiques de l'immunité innée dans deux types de lésions inflammatoires d'acné sévère du dos : une papule et un nodule. Pour se faire, la technique d'immunohistochimie a été réalisée sur des coupes de nodules et papules issues des biopsies réalisées sur le dos des patients de l'étude. Les cibles étaient : TLR-2, β -défensine-2, IL-1 β , IL-10, TGF- β , et IL-17. Une zone de peau non lésionnelle du dos était prise en contrôle et en niveau « basal » d'expression pour construire les histogrammes (Figure 50, p.118).

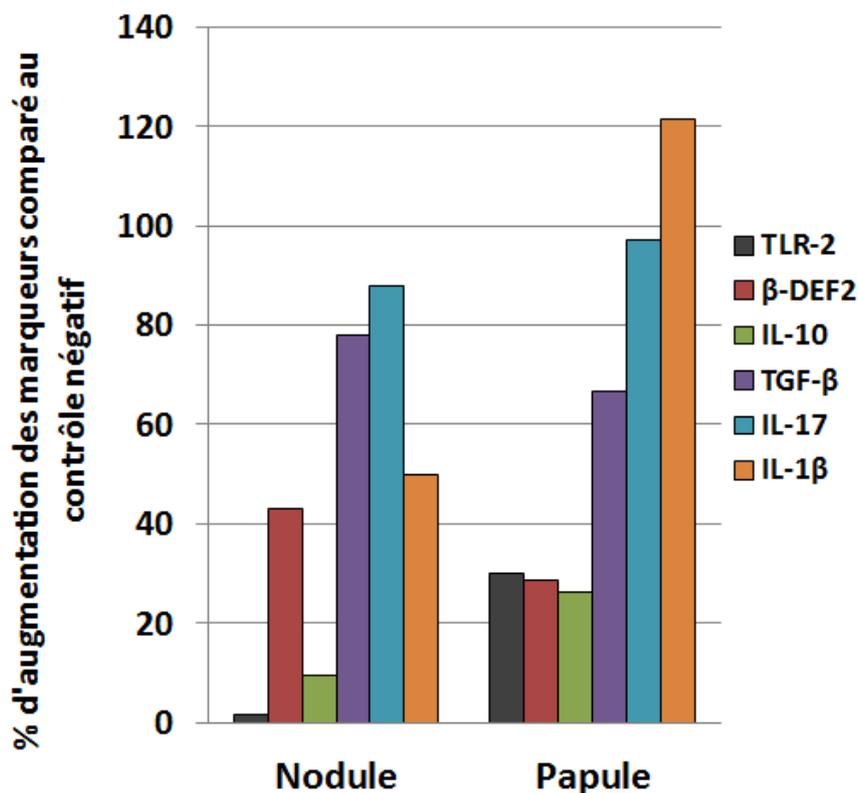


Figure 50 : Niveau d'expression des six marqueurs étudiés dans les lésions inflammatoires d'acné (nodule et papule), en comparaison au contrôle négatif. Le contrôle négatif était la peau non-lésionnelle biopsiée sur chaque patient et prise en tant que référence. Les résultats sont exprimés sous forme de ratio, en prenant la peau non-lésionnelle comme référence.

Globalement, nous observons une plus forte expression des marqueurs testés dans les papules comparées aux nodules, avec par exemple l'IL-1β (Figure 50, p.118) (respectivement 50,0 % *versus* 121,4 %) et le TLR-2 (respectivement 1,5 % *versus* 29,8 %). A l'inverse, la β-défensine-2 (42,8 % *versus* 28,5 %) et le TGF-β (77,7 % *versus* 66,6 %) étaient plus exprimés dans les nodules que dans les papules (Figure 50, p.118).

Points de synthèse

- Globalement, nous avons observé une plus forte expression des marqueurs testés dans les papules comparées aux nodules, sauf pour la β-défensine-2 et le TGF-β.

B.3 Les marqueurs de l'immunité innée chez les patients atteints d'acné sévère du dos

Compte tenu de la récente publication de plusieurs articles suggérant l'implication du système immunitaire inné dans la physiopathologie de l'acné (Dréno *et al.*, 2015; Koreck *et al.*, 2003), il est apparu important de trouver un moyen d'évaluer l'activation de ce système immunitaire chez les patients atteints d'acné sévère et de le comparer à une population saine. Lors de notre étude, trois types de biopsies avaient été réalisées sur le dos des patients atteints d'acné sévère du dos (papule, nodule et zone de peau cliniquement saine). En revanche, aucune biopsie de peau saine n'a été réalisée sur les individus sains de l'étude pour des raisons éthiques, mais également car celle-ci n'était pas prévue dans le protocole clinique. Nous avons donc réalisé cette comparaison en utilisant de la peau saine provenant de déchets de plasties (abdominoplasties, cruroplasties, réduction mammaire...) du Département des Brûlés et Chirurgie Plastique Adultes-Enfants du CHU de Nantes.

L'idée était de comparer l'expression de six marqueurs de l'immunité innée de la peau cliniquement saine de patient atteint d'acné sévère du dos, et de la peau cliniquement saine de patients sains. Les marqueurs ciblés étaient : TLR-2, β -défensine-2, IL-1 β , IL-10, TGF- β , et IL-17. Ceci nous a permis d'étudier le niveau d'activation de l'immunité innée 'de base' dans ces deux groupes. En effet, l'étude s'est faite sur de la peau « cliniquement saine » c'est-à-dire qui ne contenait aucune lésion inflammatoire, évitant un biais (une lésion d'acné contient plus d'effecteurs de l'immunité innée liés à l'inflammation locale importante, et donc une suractivation locale de l'immunité au niveau de la lésion). Les résultats sont présentés sous deux formes différentes dans la figure ci-après (Figure 51, p.120).

Nous observons que deux marqueurs sont significativement plus exprimés dans la peau issue de patients atteints d'acné sévère comparée à celle des sujets sains, il s'agit du TLR-2 et de la β -défensine-2 (Figure 51, p.120), avec respectivement des intensités de marquage moyen à 1,4 et 1,6 dans le groupe acné, alors qu'ils étaient de 0,80 et 0,95 pour le TLR-2 et la β -défensine-2 respectivement.

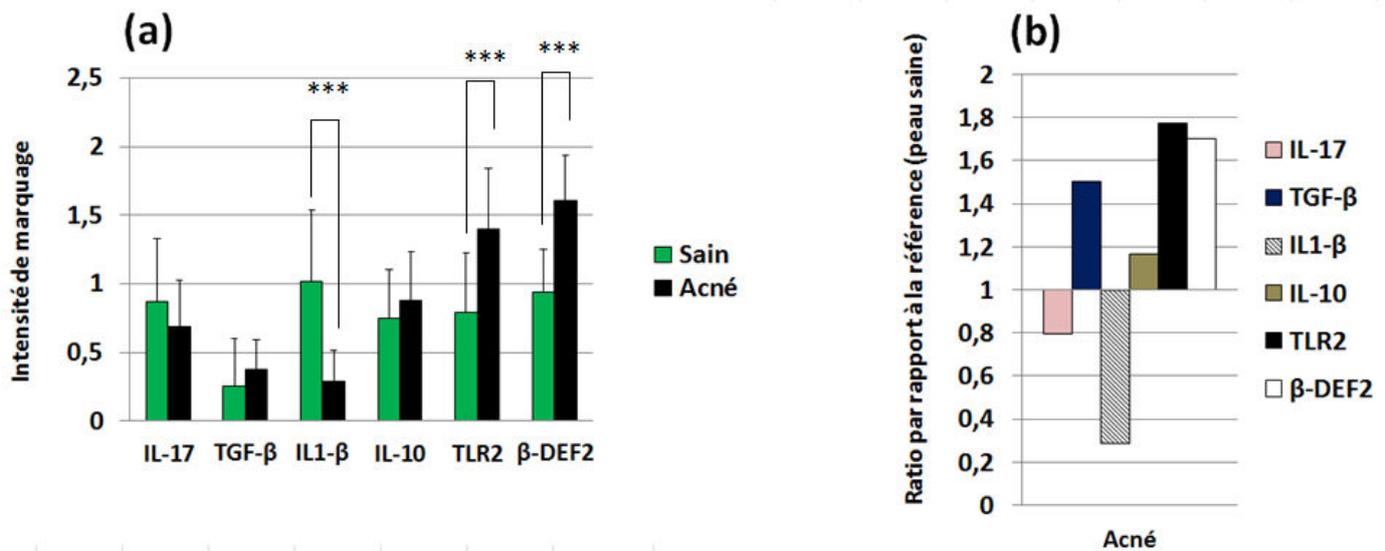


Figure 51 : Expression de six marqueurs de l'immunité innée dans la peau cliniquement saine de patient sain, comparée à de la peau cliniquement saine de patient atteint d'acné sévère. Les résultats sont exprimés soit (a) en résultats bruts, par les scores d'intensité de marquage (moyennes des deux lecteurs), soit (b) en ratio d'expression groupe acné comparé au groupe sain. Les tests statistiques ont été réalisés par l'utilisation du General Linear Model par le Dr Jean-Michel Nguyen. Niveau de significativité * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, et *** $p \leq 0.001$.

Points de synthèse

- La β -défensine-2 et le TLR-2 sont apparus surexprimés dans la peau non-lésionnelle de patients atteints d'acné sévère du dos comparé à de la peau saine de patients sain.
- Le système immunitaire inné « de base » paraît donc être suractivé chez les patients atteints d'acné sévère du dos comparé aux individus sains.

B.4 Les profils inflammatoires des explants mis en contact avec des extraits de *C. acnes*

La première partie de la Thèse s'est centrée sur la description exhaustive des isolats de *C. acnes* retrouvés sur le visage et le dos d'une population de patients atteinte d'acné sévère du dos, et d'une population d'individus sains. Les résultats de cette phase ont mis en évidence une perte importante de la diversité des phylotypes en contexte d'acné sévère du dos, avec une prédominance du phylotype IA1 appartenant au CC18 (type SLST A1). Une question a découlé de ce travail et visait à déterminer si cette perte de diversité des phylotypes de *C. acnes* était une cause ou une conséquence de la maladie. Pour répondre à cette question, nous

avons élaboré un système *in vitro* pour évaluer la réponse inflammatoire des explants de peau saine après incubation avec différentes combinaisons d'extraits membranaires de *C. acnes*. Nous avons mis en contact les explants avec du phylotype IA1, II ou III individuellement, et également avec une combinaison des trois phylotypes IA1+II+III. La réponse inflammatoire a été évaluée secondairement d'une part, par dosage de cytokines liées à l'inflammation dans les surnageants des cocultures (IL-10, IL-17, IL-6, IL-8 et TGF- β) et d'autre part, par immunohistochimie réalisée sur les explants de peau récupérés après la coculture (Figure 52, p.122, Figure 53, p.123, et Figure 54, p.124).

Tout d'abord, les manipulations d'immunohistochimie ont démontré une augmentation significative des marqueurs IL-1 β ($p = 0,0374$), IL-10 ($p = 0,00630$), IL-17 ($p = 0,00290$), TLR-2 ($p = 0,00406$) et β -défensine-2 ($0,00290$), dans les explants incubés avec le phylotype IA1 seul, comparé à la combinaison IA1+II+III (Figure 52, p.122 et Figure 53, p.123). Le seul marqueur qui n'a montré aucune différence significative était le TGF- β (Figure 52, p.122 et Figure 53, p.123). La β -défensine-2 était par exemple 4 fois moins exprimée ($p = 0,00290$) dans les explants incubés avec le mélange de phylotypes IA1+II+III comparé au phylotype IA1 utilisé seul (Figure 52, p.122 et Figure 53, p.123). De la même manière, l'IL-1 β était 3 fois moins exprimée ($p = 0,0297$) dans des explants incubés avec le mélange de phylotypes IA1+II+III, comparé avec l'explant incubé avec le phylotype IA1 seul. En parallèle, il y avait une augmentation significative de IL-1 β ($p = 0,0297$), dans les explants incubés avec le phylotype III seul, comparé avec l'explant incubé avec l'association IA1+II+III. En outre, il y avait une augmentation significative du TLR-2 ($p = 0,00572$), dans les explants incubés avec le phylotype II seul, comparé avec l'explant incubé avec la combinaison IA1+II+III (Figure 52, p.122 et Figure 53, p.123).

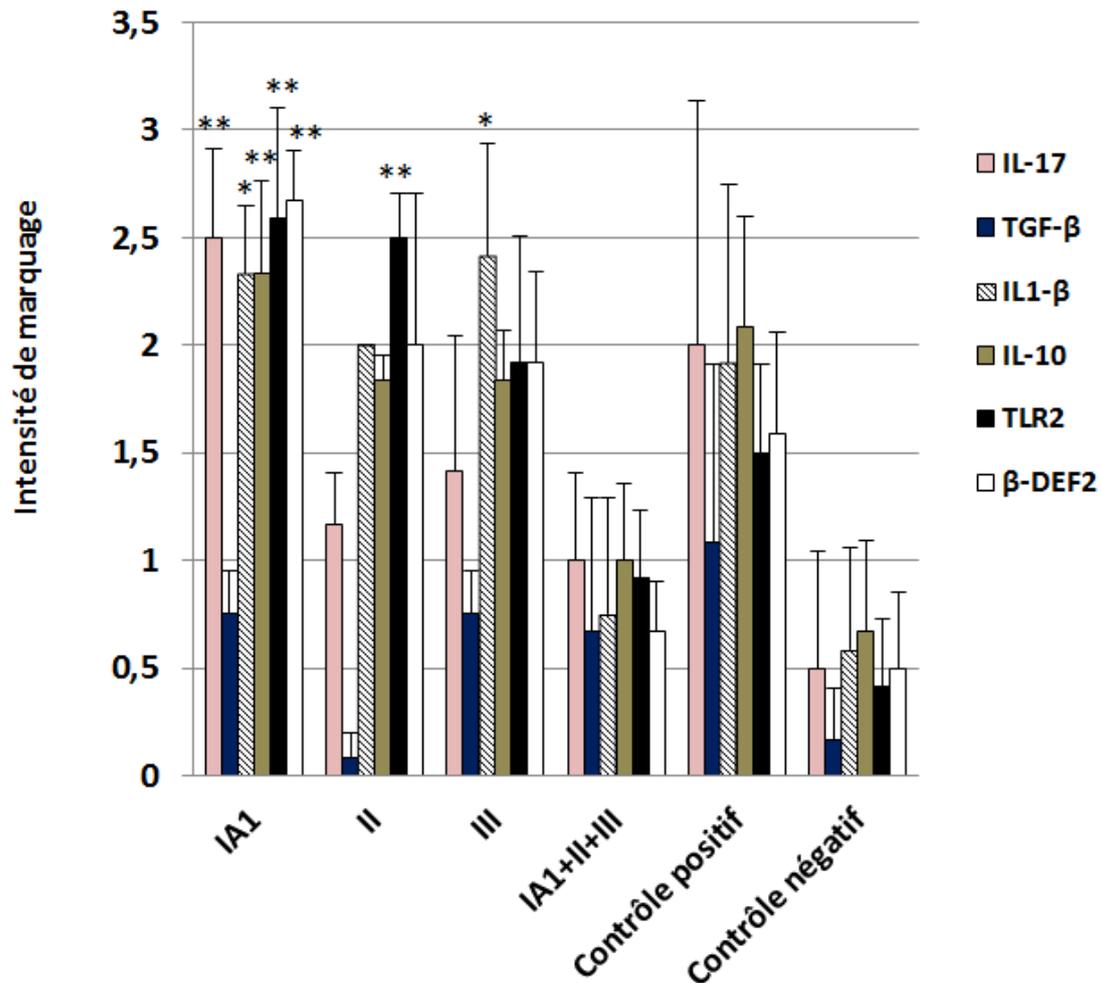


Figure 52 : Résultats des marquages réalisés sur les explants après incubation avec IA1, II, III ou la combinaison IA1+II+III (n=3). Les scores sont donnés en fonction de l'intensité du marquage observé, par deux lecteurs indépendants. L'échelle utilisée a été publiée précédemment (Jasson *et al.*, 2013). Statistiques réalisées en utilisant le General Linear Model, en comparant les niveaux d'expression des marqueurs dans les explants après incubation des phylotypes IA1, II, ou III aux niveaux d'expressions dans les explants incubés avec la combinaison IA1+II+III. Niveau de significativité * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, et *** $p \leq 0.001$.

En résumé, les marqueurs de l'immunité innée testés étaient surexprimés dans la peau après incubation avec un seul phylotype (IA1, II, ou III) et en particulier avec le phylotype IA1, en comparaison au mélange des trois phylotypes (IA1+II+III). Les phylotypes IA1, II ou III induisent séparément une activation du système immunitaire inné significativement plus importante par rapport à la combinaison des trois phylotypes (IA1+II+III).

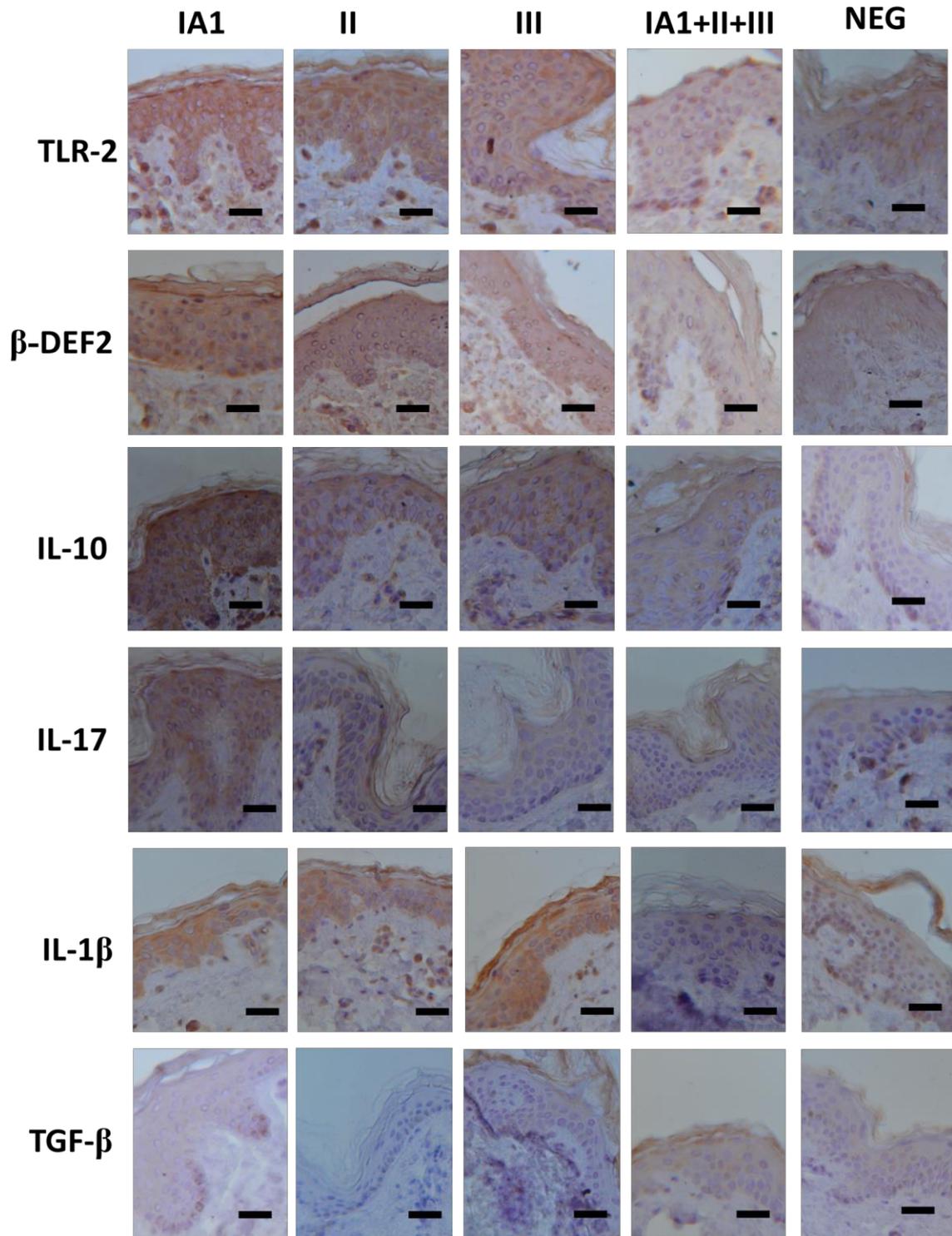


Figure 53 : Photographies des IHC pratiquées sur les explants après coculture avec différentes combinaisons de sous-types de *C. acnes* pendant 6 h. La barre d'échelle représente 300 μ m.

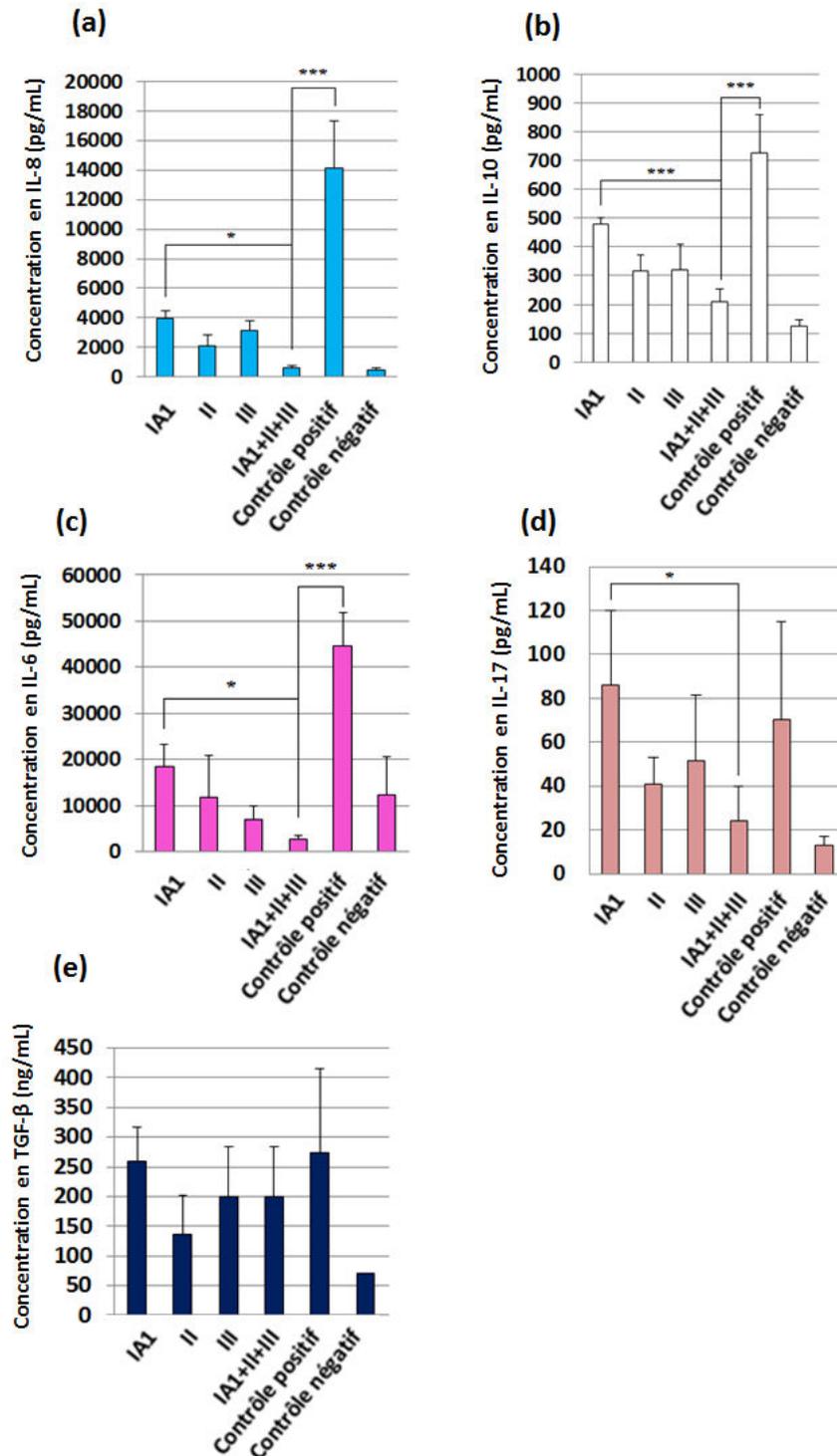


Figure 54 : Mesures des concentrations en cytokines libérées par les explants cutanés après 6 h d'incubation avec les phylotypes de *C. acnes* IA1, II ou III, en comparaison avec la combinaison des phylotypes IA1+II+III (n = 3). (a) concentration en IL-8 (pg/mL), (b) concentration en IL-10 (pg/mL), (c) concentration en IL-6 (pg/mL), (d) concentration en IL-17 (pg/mL), (e) concentration en TGF-β (ng/ml). Ces expériences de cocultures ont été réalisées sur trois donneurs indépendants de peau saine. Niveau de significativité * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, et *** $p \leq 0.001$.

Ensuite, les tests ELISA ont confirmé ces tendances notamment pour les cytokines IL-17, IL-10 et TGF- β (Figure 54, p.124). En effet, la concentration en IL-17 dans les surnageants était significativement diminuée lors de la stimulation par le mélange IA1+II+III par rapport au phylotype IA1 seul ($p = 0,0166$). Les autres cytokines pro-inflammatoires testées IL-6 ($p = 0,02652$) et IL-8 ($p = 0,03423$) ont également été augmentées dans les surnageants des explants incubés avec le phylotype IA1 seul, en comparaison avec les phylotypes IA1+II+III combinés (Figure 54, p.124). En outre, l'immunomodulateur IL-10 a montré une augmentation significative entre les deux conditions IA1 et IA1+II+III ($p < 0,001$) (Figure 54, p.124). A l'opposé, le TGF- β était la seule cytokine qui n'a démontré aucune différence significative entre toutes les conditions testées, ce qui est cohérent avec les résultats d'immunohistochimie.

Les résultats de cette partie du travail de Thèse ont mené à la soumission d'un article dans le journal intitulé « **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology** », présenté ci-après.

***Cutibacterium acnes* phylotypes diversity loss: a trigger for skin inflammation process**

Marie-Ange Dagnelie, Stéphane Corvec, Mélanie Saint-Jean, Jean-Michel Nguyen, Amir
Khammari, Brigitte Dréno

Article soumis au Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology

***Cutibacterium acnes* phylotypes diversity loss: a trigger for skin inflammation process**

Cutibacterium acnes phylotypes diversity loss can trigger skin inflammation

Words: 3132

Table count: 2

Figure count: 4

Marie-Ange Dagnelie¹, Stéphane Corvec², Mélanie Saint-Jean¹, Jean-Michel Nguyen³, Amir Khammari¹, and Brigitte Dréno^{1*}

¹ Dermatology department, CHU Nantes, CIC 1413, CRCINA, University Nantes, Nantes France

² Bacteriology department, CHU Nantes, CRCINA, University Nantes, Nantes France

³ Biostatistical department, CHU Nantes, CIC 1413, CRCINA, University Nantes, Nantes France

Corresponding author

Pr Brigitte Dréno

Department of Dermatology

Nantes University Hospital

1 Place Alexis Ricordeau

44035 Nantes Cedex 01

France

Phone: 00 33 240083118

Fax: 00 33 240083117

E-mail: brigitte.dreno@wanadoo.fr

Funding source

This study was supported by a research grant from Galderma R&D - CUTIS (Sophia Antipolis)

Conflict of interest

The authors S. Corvec, M. Saint-Jean and JM Nguyen have no conflict of interest to declare. The authors B. Dréno (director of the study), A. Khammari (co-director of the study) and MA Dagnelie (Ph.D. student) declare a potential conflict of interest as the study was funded by Galderma R&D - CUTIS (Sophia Antipolis, France).

Abstract

Background

Acne has long been understood as a multifactorial chronic inflammatory disease of the pilosebaceous follicle, where *Cutibacterium acnes* (subdivided into six main phylotypes) is a crucial actor. In parallel, the loss of microbial diversity among the skin commensal communities has recently been shown as often accompanied with inflammatory skin disorders.

Objective

This study investigated the association of *C. acnes* phylotype diversity loss and the impact on Innate Immune System (IIS) activation.

Methods

The IIS response of skin after incubation with phylotypes IA1, II or III individually and with the combination of IA1+II+III phylotypes, was studied in an *in vitro* skin explant system. The inflammatory response was monitored by immunohistochemistry and ELISA assays, targeting a selection of Innate Immune Markers (IIMs) (IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TGF- β).

Results

IIMs were significantly upregulated in skin when being incubated with phylotype IA1 alone compared with the combination IA1+II+III. In parallel, ELISA assays confirmed these results in supernatants for IL-17, IL-8, and IL-10.

Conclusion

We identify the loss of *C. acnes* phylotype diversity as a trigger for IIS activation, leading to cutaneous inflammation. These innovative data underline the possibility to set up new approaches to treat acne. Indeed, maintaining the balance between the different phylotypes of *C. acnes* may be an interesting target for the development of drugs.

Introduction

Acne has long been understood as a complex multifactorial inflammatory disease. Currently, three key factors are described as being implicated in acne development: hormonally-stimulated sebum production, abnormal keratinization of the pilosebaceous duct, and skin colonization by *Cutibacterium acnes*, formerly *Propionibacterium acnes* (1). Over the last five years, the Innate Immune System (IIS) started to be highlighted as the fourth key player and microbiota as the fifth key player in acne physiopathology (2–5).

Cutibacterium acnes (*C. acnes*) is a Gram-positive bacterium, growing in anaerobiosis. It is usually found as living in pilosebaceous units, and *C. acnes* mainly uses lipids as a source of energy, and its metabolism produces propionic acid (6). This bacterium has been described both as a commensal of the human skin playing a role in the balance of normal skin microbiota (7), and as a pathogen bacterium (8). For instance, *C. acnes* implication was previously reported in cutaneous dermatoses such as acne and folliculitis (3,9), but also in other types of affections including deep medical device infections, prostate cancer, and sarcoidosis (10–12). *Cutibacterium acnes* strains have long been classified into several subtypes, currently, it is subdivided into six main phylotypes : IA1, IA2, IB, IC, II and III (13,14).

Recent studies on acne have begun to determine how far these four factors interact, and the role of the IIS is nowadays better appreciated. On one hand, inflammation has been demonstrated in all steps of acne lesions: as soon as the microcomedo, then comedo, inflammatory lesion, and even ‘post-inflammatory’ erythema (hyperpigmentation), and scars (15). *C. acnes* has a key role in IIS activation and cutaneous inflammation process, as it is able to induce pro-inflammatory cytokines releasing by keratinocytes and immune cells (including macrophages and monocytes): IL-8 (16), IL-17 (17) and IL-1 β (18). It is also

known to induce the expression of TLRs, mainly TLR-2 (19). In parallel, increasing insights into skin microbiota shed the light on an interesting theory, in several cutaneous illnesses as atopic dermatitis, psoriasis and vitiligo: the loss of microbial diversity among the skin commensal communities (dysbiosis) would be associated with cutaneous inflammatory diseases (20–22). Concerning *acne vulgaris*, some recent papers suggest that specific *C. acnes* subtypes could play a key role in the severity of inflammatory acne (23–25). Moreover, we reported a clear loss of *C. acnes* phylotype diversity in severe back acne context (26). Consequently, it appears relevant to elucidate whether not only *C. acnes* phylotype, but also the loss of diversity can modulate IIS activation and thus, could play a role in skin inflammation severity, in acne context. In this original article, we propose an *in vitro* system to clarify this crucial question.

We co-cultured healthy skin explants with different clinical *C. acnes* strains previously well-characterized. We evaluated explants IIS activation level, comparing the impact of *C. acnes* phylotype alone, with a mixture of several phlotypes mimicking the diversity found in healthy context. IIS activation evaluation was performed by ImmunoHistoChemistry (IHC), and ELISA assays.

Materials and Methods

Non-lesional skin origin from acne patients

At the first visit, acne patients were selected according to inclusion criteria: age (16-35 years-old), at least 2 nodules on the back, respect of wash-out periods for acne drugs including systemic antibiotics (1 month), oral retinoids (6 months) and topical treatments (2 weeks). All patients signed informed consent and this translational monocentric study was approved by the French health authorities (ANSM) under number 151141B-42 and ethic committee (CPP) under number 21-15. From these patients, biopsies were performed taking a non-lesional skin, a nodule and a papule.

Healthy skin origin and explants

Healthy skin (abdominoplastie) was kindly provided by the Surgery Department at Nantes University Hospital, as previously validated (25). It is obtained from healthy skin of abdominoplasties as skin biopsies of the face/back of healthy individuals were considered as not ethical. As previously reported (27), this biological system has some limits, but it has been widely used previously (25,28), and it enables to take into account the three layers of cells and also immune effectors that make the normal human skin.

Cutibacterium acnes clinical strains and characterization

Selected bacterial isolates were obtained from the bacteriological collection, stored in the Bacteriology Unit at Nantes University Hospital facilities. All strains used were previously characterized accurately according to three levels of characterization previously described: phylotype, clonal complex and SLST-type (13,14,23). A summary of the clinical strains used and their characterization is presented in table 1.

Bacteria lysates

To ensure bacteriological safety of cell culture incubator and to avoid an excess of bacteria multiplication during the assay, bacteria in lysate forms were preferred to viable bacteria inoculum. Immune and keratinocytes/sebocytes stimulations using bacteria in lysate forms were previously widely described, and based on these publications, we were able to use lysates to perform the experiments (25,29–31). To create bacteria lysates, all bacterial suspensions were calibrated at a DO=1.00±0.15, heat-treated, and entered into a series of freezing/thawing and freezing/sonication cycles to ensure efficient mechanical lysis of their Gram-positive cell walls. Viability controls were systematically performed before and after the lysis process to ensure that no viable bacteria were recovered before cocultures experiments were started. Protein quantifications were then performed using BCA assay (Thermo Fischer Scientific, cat. #23227) and lysates were used at a 5 µg/mL final concentration.

Cocultures experiments

Skin explants were cocultured with *C. acnes* lysates for 6 h, at 5 µg/mL protein final concentration, in DMEM high glucose GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (ThermoFisher Scientific, cat.# 10569010), as previously described (25). Explants were cocultured either with a *C. acnes* phylotype alone (IA1, II or III), or with a combination of phylotypes in order to mimic healthy phylotypes diversity *in vitro* (IA1+II+III). Positive control was performed by incubating explants with LPS from *Escherichia coli* (Sigma Aldrich, L4391-1MG) at a 5 µg/mL final concentration. Negative control condition was performed by incubating explants with culture media only.

ELISA assays

ELISA assays were performed according to the manufacturer's instructions, for following cytokines: IL-1 β , IL-6, IL-8 (also called CXCL-8), IL-10, IL-17 and TGF- β (Affymetrix, IL-1 β cat. #88-7261-22, IL-6 cat. #88-7066-22, IL-8 cat. #88-8086-22, IL-10 cat. #88-7106-22, IL-17 cat. #88-7176-22, and TGF- β cat. #88-8350-22).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistries were performed on Non-Lesional Skin (NLS) from patients with severe acne of the back, and on NLS from healthy individuals, targeting IIMs (IL-1 β , IL-17, IL-10, β -defensin-2, TGF- β , and TLR-2), as previously described (25). The same markers were also investigated in explants after 6h incubation with the different bacterial lysates combinations. The used antibodies are summarized in the table 2. The slides were double-blinded read by two independent readers. The averages of both scores were taken into account for the analysis of the results.

Statistical analysis

First, innate immune markers studied in non-lesional skins (NLS) from acne (n=12) and healthy were compared (n=13). The markers were assessed by two independent readers and the mean of their measures was used for statistical analyses. Comparisons between healthy and acne skins were performed using General linear Models (GLM) and were confirmed using a non-parametric test (Wilcoxon unpaired test). Secondly, the experimental plan analyzed was made of randomized block of 9 conditions repeated within 3 healthy skins. The markers were assessed by two independent readers and the mean of their measures was used for statistical analyses. General linear Models were used to limit the number of t-tests and to focus the comparisons between the control block and the others experimental situations. For

all these analyses, R V3.4 software was used (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

The innate immune system is abnormally activated in acne patients

Firstly, we compared the basal level of cutaneous innate immune system activation in normal skin of healthy subjects with normal skin of patients with nodular acne on the back. Four out of six tested IIMs were significantly upregulated (1.2 to 1.8 fold) in NLS from acne group comparing with NLS from healthy group (Fig. 1).

TLR-2 and β -defensin-2 were respectively nearly 1.8 and 1.7-fold more expressed in NLS from acne group than NLS from healthy individuals (respectively $p < 0.001$ and $p < 0.001$) (Fig. 1). In addition, inflammation modulators such as TGF- β and IL-10 were respectively 1.5 and 1.2-fold more expressed in NLS from acne group than NLS from healthy individuals, but with no significant differences (TGF- β , $p = 0.425$ and IL-10, $p = 0.25$). In contrast, IL-1 β was found to be less expressed in NLS from acne patients than healthy individuals (IL-1 β , $p < 0.001$). There was no significant difference for IL-17 expression between healthy and acne groups (IL-17, $p = 0.34$). Taken together, these data show that IIS in NLS is already up-activated in acne patients, particularly *via* TLR-2 and β -defensin-2 overexpressions.

Phylotypes IA1, II and III individually induced a significant IIS activation comparing with negative control

First, IIS activation was evaluated by immunohistochemistry targeting IIMs on explants incubated with IA1, II or III phylotypes individually, comparing with negative control. First of all, IHC showed a significant overexpression of TLR-2 ($p = 0.00054$), IL-1 β ($p = 0.0223$), IL-10 ($p = 0.00153$), IL-17 ($p = 0.00048$), and β -defensin-2 ($p = 0.00011$) in explants incubated with phylotypes IA1, in comparison with negative control (Figs 2-3). TGF- β was the only marker with no significant variation between the conditions. In addition, IHC showed a significant

increase of IL-1 β (p=0.0176), IL-10 (p=0.01578), TLR-2 (p=0.00803), and β -defensin-2 (p=0.00390) in explants incubated with phylotype III comparing with negative control (Fig. 2). Finally, IHC showed a significant increase of IL-10 (p=0.01578), TLR-2 (p=0.00075), β -defensin-2 (p=0.00261) in explants incubated with phylotype II comparing with negative control (Fig. 2).

Restoration of phylotype diversity decreases the inflammatory response of healthy skin explants in vitro

Our hypothesis is that phylotype diversity (rather associated with healthy skin condition) would be able to induce a lower inflammatory response comparing with phylotypes only (IA1, II and III separately). To elucidate this question, we evaluated the IIMs expression level of skin explants incubated with either *C. acnes* IA1, II or III phylotype singly or with a combination of IA1+II+III phylotypes. We observed a significant increase of markers IL-1 β (p=0.0374), IL-10 (p=0.00630), IL-17 (p=0.00290), TLR-2 (p=0.00406), and β -defensin-2 (0.00290), in explants incubated with phylotype IA1 alone, than with the combination IA1+II+III (Figs 2-3). The only marker which did not show any significant variation was TGF- β (Fig. 2). For example, β -defensin-2 was 4-fold less expressed (p=0.00290) in explants incubated with the mixture of phylotypes IA1+II+III compared to IA1 phylotype used alone (Figs 2-3). In the same manner, IL-1 β was 3-fold less expressed (p=0.0297) in explants incubated with the mixture of phylotypes IA1+II+III (Fig. 2). In parallel, there was a significant increase in IL-1 β (p=0.0297), in explants incubated with phylotype III only, in comparison with the combination (IA1+II+III) (Fig. 2). Also, there was a significant increase in TLR-2 (p=0.00572), in explants incubated with phylotype II only, in comparison with the combination (IA1+II+III) (Figs 2-3).

In summary, IIMs were upregulated in skin when being incubated with only one phylotype

(IA1, II or III) comparing with a mixture of phylotypes (IA1+II+III). Explants incubated with the combination IA1+II+III showed a lower IIS activation than the ones incubated with IA1, II or III separately.

To further investigate IIS activation after incubation either with one phylotype individually or with mixture IA1+II+III, we performed ELISA assays. This way, we compared cytokines levels in supernatants for each condition. ELISA assays confirmed the IHC trends results in supernatants for IL-17, IL-10 and TGF- β (Fig. 4). Indeed, IL-17 concentration in supernatants was significantly decreased by the mixture IA1+II+III compared to IA1 only conditions ($p=0.0166$). The other tested pro-inflammatory cytokines IL-6 ($p=0.02652$) and IL-8, ($p=0.03423$) were also upregulated in supernatants from explants incubated with IA1 phylotype alone, in comparison with the combination IA1+II+III phylotypes (Fig. 4). Besides, the immunomodulator IL-10 showed a significant increase between both IA1 and IA1+II+III conditions ($p<0.001$) (Fig. 4). At the opposite, TGF- β was the only cytokine which did not demonstrate any significant modulation between all tested conditions, which is consistent with IHC results.

Taken together, IHC and ELISA results showed that restoring the phylotype diversity *in vitro* in a skin explant model is able to decrease the IIS activation in the explant comparing with incubation with phylotypes individually (IA1, II or III).

Discussion

Extensive crosstalks between the skin and its bacterial communities (microbiota) regulate local innate immune responses to ensure efficient skin functions and prevent cutaneous inflammation (2,7,32). Skin microbial communities are shaped by physiological characteristics and the individual leading to a complex equilibrium called skin microbial homeostasis. Recently, it has been shown that severe inflammatory acne (nodular) was associated with *C. acnes* phylotype diversity loss, with a high predominance of phylotype IA1 (26). Here, we report the loss of *C. acnes* phylotype diversity as a crucial mechanism capable of triggering skin inflammation. Thus, the association of different *C. acnes* phylotypes could prevent the development of inflammatory acne.

IIS is abnormally activated in acne patients

First of all, our study shows that the level of activation of IIS in normal skin of healthy subjects or with severe acne is not the same. This way, we confirm an upregulation of several IIMs in NLS from acne group comparing with healthy group. Interestingly, it was previously described that TLR-2 and IL-10 were weakly expressed in non-lesional skin from healthy subjects comparing with acne patients (34), which is consistent with our results. In the present study, TLR-2 and β -defensin-2 which are crucial IIS players, were significantly more expressed in NLS from acne group than NLS from healthy group. Previous works also described inflammation events in very early stage of acne lesion initiation (35). In another study, this abnormal IIS activation was previously suggested (3), as microbiological data only were not sufficient to explain the appearance of inflammatory diseases such as acne. Moreover, local skin predispositions, even in non lesional skin condition were observed using a confocal microscopy approach exploring the sebaceous follicles in adult women with acne

(36). These results show that there is a specific immunological pattern enabling the development of abnormal inflammatory reaction against a non-pathogenic bacterium such as *C. acnes*, favoring acne occurrence.

C. acnes subgroups diversity loss on the skin is a trigger for IIS activation

As the increase of IIS basal level activation observed in apparently normal skin of acne patients is not sufficient to explain the different levels of inflammatory severity observed in acne patients, we wanted to explore a worsening factor able to trigger the innate immunity of these patients. Previous studies reported the reduction of the microbiota diversity in inflammatory skin disease context, with most of the times, one genus taking advantage on the others (37,38). The most striking example is found in atopic dermatitis, with *Staphylococcus aureus* skin colonization inducing a dysbiosis (37,39). At the subgroup level, one study recently showed the drastic reduction of phylotype diversity in severe inflammatory acne (26). Thus, taking into account these data, we postulated that the drastic reduction of *C. acnes* phylotypes diversity previously showed, could trigger skin inflammation in a similar manner than in other cutaneous inflammatory disease as atopic dermatitis. Our data show that taken singly, *C. acnes* phylotype IA1, II or III induce a significant IIMs activation. Similar observations have been previously reported in different experimental models (16,25,31). In the present study, we demonstrate that the phylotype diversity loss on the skin is capable of triggering IIS activation, and thus the development of cutaneous inflammation. It suggests that *C. acnes* subpopulation diversity is a crucial factor for down regulating IIS activation *in vitro*. The present study also showed an increase in immune-modulator IL-10 after incubation with IA1 phylotype alone comparing with the combination IA1+II+III. Interestingly, it has been previously mentioned that IL-10 high expression could favor the development of chronic inflammation maintained by the presence of *C. acnes*, and specifically resistant *C. acnes*

strains (34). The chronic inflammation kept by IL-10 could play a central role in the development of nodular lesions. On the other hand, TLR-2 overexpression in keratinocytes after a contact with *C. acnes* has been previously reported (19). Recently, it has also been demonstrated that TLR-2 was able to recognize *C. acnes* CAMP Factor 1 from highly inflammatory strains (40), which is a crucial feature for host cell to induce skin inflammation in acne context. Moreover, in cell cultures, TLR-2 stimulation by *C. acnes* induces secretion of various cytokines (IL-8, IL-12), metalloproteinase MMP-9 and β -defensin-2 (19,41,42). In our study, the only marker that did not show any significant modulation with consistent results from IHC to ELISA assays, was TGF- β .

Interestingly, these data opens the debate to further questions. Indeed, it underlines the crucial role of the interactions between keratinocytes and microbiota, with a central role of the skin commensal *C. acnes* in acne. These interactions are sensed and controlled by the IIS mainly *via* PRRs (Pattern Recognition Receptors). As we observed an obvious upregulation of TLRs in acne skin (non-lesional) comparing with healthy controls, the abnormal inflammatory reaction facing *C. acnes* could be related to PRRs. TLRs represent a major part of PRRs, capable of recognizing PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) either through direct interaction or *via* an intermediate PAMP-binding molecule (43). Indeed, as a Gram-positive bacterium, *C. acnes* can be recognized by IIS through various PAMPs, including lipoteichoic acid, peptidoglycans, and triacyl lipopeptides (43).

Another communication mode was recently described: extracellular vesicles (EVs) are nowadays accepted to enable communication between host cells and bacteria, and *C. acnes* was recently described as a producer of EVs (44–46). Moreover, Choi *et al.* recently demonstrated that *C. acnes*-derived EVs were capable of promoting acne-Like phenotypes in human epidermis, suggesting a possible role of *C. acnes* EVs in acne physiopathology (47). These results provide new paradigms for the mechanisms that trigger skin inflammation and

they depict key data to develop future targets for innovative therapeutic approaches.

Our study shows that the inflammatory response observed in acne context, in addition to be dependent of *C. acnes* phylotype, is triggered by a loss of phylotype diversity at the surface of the skin. These results support the innovative idea that TLR-2 overexpression in patients with severe acne could explain the inappropriate inflammatory response observed against the skin commensal bacterium *C. acnes*, as it has been previously shown that TLR-2 was highly involved in *C. acnes* recognition and inflammation initiation (40,48). These data also support the idea that skin microbiota may be a crucial target in acne and thus, the interest of a therapeutically approach by topical modulators of microbiota both for maintaining and restoring the cutaneous diversity of *C. acnes* phylotypes. It also confirms that topical macrolides should be abandoned as they may participate to the loss of microbiota diversity, in addition to increase the bacterial resistance not only for *C. acnes* but also *S. epidermidis*, *S. aureus*, and *Streptococcus* (24,49–53).

Acknowledgements

We would like to kindly thank Pr F. Duteille and Pr P. Perrot to provide healthy skin from the surgery department at Nantes University Hospital. We thank Dr Knol for technical support on immunohistochemistry experiments.

Author contributions

MA Dagnelie performed the experiments and wrote the paper. S. Corvec contributed to interpretations and analysis of the results. M. Saint-Jean contributed to reagents/materials/analysis tools. JM Nguyen performed the statistical analysis. A. Khammari and B. Dréno were co-directors of this work, designed the study and contributed to results analysis. All authors reviewed and commented critically drafts of the manuscript for important intellectual content and gave final approval to submit for publication.

References

1. Scholz CFP, Kilian M. The natural history of cutaneous *propionibacteria*, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016 Nov;66(11):4422–32.
2. Dreno B, Gollnick HPM, Kang S, Thiboutot D, Bettoli V, Torres V, et al. Understanding innate immunity and inflammation in acne: implications for management. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2015 Jun;29 Suppl 4:3–11.
3. Paugam C, Corvec S, Saint-Jean M, Le Moigne M, Khammari A, Boisrobert A, et al. *Propionibacterium acnes* phylotypes and acne severity: an observational prospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2017 Mar 10;
4. Fitz-Gibbon S, Tomida S, Chiu B-H, Nguyen L, Du C, Liu M, et al. *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J Invest Dermatol*. 2013 Sep;133(9):2152–60.
5. McDowell A, Barnard E, Nagy I, Gao A, Tomida S, Li H, et al. An Expanded Multilocus Sequence Typing Scheme for *Propionibacterium acnes*: Investigation of “Pathogenic”, “Commensal” and Antibiotic Resistant Strains. *PLoS ONE*. 2012 Jul 30;7(7):e41480.
6. Tax G, Urbán E, Palotás Z, Puskás R, Kónya Z, Bíró T, et al. Propionic Acid Produced by *Propionibacterium acnes* Strains Contributes to Their Pathogenicity. *Acta Derm Venereol*. 2016 Jan;96(1):43–9.
7. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jan 15;
8. Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Médecine Mal Infect*. 2014 Jun;44(6):241–50.
9. Frenard C, Dagnelie M-A, Khammari A, Saint-Jean M, Boisrobert A, Corvec S, et al. Do *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* define two different types of folliculitis? *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2018 Jan 16;
10. Aubin GG, Lavigne J-P, Foucher Y, Dellièrè S, Lepelletier D, Gouin F, et al. Tropism and virulence of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* involved in implant-associated infection. *Anaerobe*. 2017 Apr 25;47:73–8.
11. Mak TN, Yu S-H, De Marzo AM, Brüggemann H, Sfanos KS. Multilocus Sequence Typing (MLST) Analysis of *Propionibacterium acnes* Isolates From Radical Prostatectomy Specimens. *The Prostate*. 2013 May;73(7):770–7.

12. Minegishi K, Watanabe T, Furukawa A, Uchida K, Suzuki Y, Akashi T, et al. Genetic profiles of *Propionibacterium acnes* and identification of a unique transposon with novel insertion sequences in sarcoid and non-sarcoid isolates. *Sci Rep*. 2015 May 12;5:9832.
13. Barnard E, Nagy I, Hunyadkürti J, Patrick S, McDowell A. Multiplex Touchdown PCR for Rapid Typing of the Opportunistic Pathogen *Propionibacterium acnes*. *J Clin Microbiol*. 2015 Apr;53(4):1149–55.
14. Lomholt HB, Kilian M. Population Genetic Analysis of *Propionibacterium acnes* Identifies a Subpopulation and Epidemic Clones Associated with Acne. *PLoS ONE* [Internet]. 2010 Aug 19 [cited 2016 Jul 13];5(8). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2924382/>
15. Tanghetti EA. The Role of Inflammation in the Pathology of Acne. *J Clin Aesthetic Dermatol*. 2013 Sep;6(9):27–35.
16. Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol*. 2005 May;124(5):931–8.
17. Agak GW, Qin M, Nobe J, Kim M-H, Krutzik SR, Tristan GR, et al. *Propionibacterium acnes* Induces an IL-17 Response in Acne Vulgaris that Is Regulated by Vitamin A and Vitamin D. *J Invest Dermatol*. 2014 Feb;134(2):366–73.
18. Kistowska M, Gehrke S, Jankovic D, Kerl K, Fettelschoss A, Feldmeyer L, et al. IL-1 β drives inflammatory responses to *Propionibacterium acnes* in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*. 2014 Mar;134(3):677–85.
19. Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quereux G, Khammari A, et al. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol*. 2005 Dec;153(6):1105–13.
20. Bieber T. Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol*. 2010 May;22(2):125–37.
21. Ganju P, Nagpal S, Mohammed MH, Nishal Kumar P, Pandey R, Natarajan VT, et al. Microbial community profiling shows dysbiosis in the lesional skin of Vitiligo subjects. *Sci Rep*. 2016 Jan 13;6:18761.
22. Salava A, Pereira P, Aho V, Väkevä L, Paulin L, Auvinen P, et al. Skin Microbiome in Small- and Large-plaque Parapsoriasis. *Acta Derm Venereol*. 2017 Feb 8;
23. Scholz CFP, Jensen A, Lomholt HB, Brüggemann H, Kilian M. A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of *Propionibacterium acnes* in vivo. *PloS One*. 2014;9(8):e104199.
24. Nakase K, Hayashi N, Akiyama Y, Aoki S, Noguchi N. Antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in Japan between 2013 and 2015. *J Dermatol*. 2017 Jun 17;

25. Jasson F, Nagy I, Knol AC, Zuliani T, Khammari A, Dréno B. Different strains of *Propionibacterium acnes* modulate differently the cutaneous innate immunity. *Exp Dermatol*. 2013 Sep;22(9):587–92.
26. Dagnelie M-A, Corvec S, Saint-Jean M, Bourdès V, Nguyen J-M, Khammari A, et al. Decrease in Diversity of *Propionibacterium acnes* Phylotypes in Patients with Severe Acne on the Back. *Acta Derm Venereol*. 2017 Nov 14;
27. Dajnoki Z, Béke G, Kapitány A, Mócsai G, Gáspár K, Rühl R, et al. Sebaceous Gland-Rich Skin Is Characterized by TSLP Expression and Distinct Immune Surveillance Which Is Disturbed in Rosacea. *J Invest Dermatol*. 2017 May;137(5):1114–25.
28. Isard O, Knol A-C, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dréno B. Cutaneous induction of corticotropin releasing hormone by *Propionibacterium acnes* extracts. *Dermatoendocrinol*. 2009 Mar;1(2):96–9.
29. Huang Y-C, Yang C-H, Li T-T, Zouboulis CC, Hsu H-C. Cell-free extracts of *Propionibacterium acnes* stimulate cytokine production through activation of p38 MAPK and Toll-like receptor in SZ95 sebocytes. *Life Sci*. 2015 Oct 15;139:123–31.
30. Nagy I, Pivarsci A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, et al. *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect*. 2006 Jul;8(8):2195–205.
31. Yu Y, Champer J, Agak GW, Kao S, Modlin RL, Kim J. Different *Propionibacterium acnes* phylotypes induce distinct immune responses and express unique surface and secreted proteomes. *J Invest Dermatol*. 2016 Jul 1;
32. Dreno B, Martin R, Moyal D, Henley JB, Khammari A, Seité S. Skin microbiome and acne vulgaris: *Staphylococcus*, a new actor in acne. *Exp Dermatol*. 2017 Jan 17;
33. Szabó K, Erdei L, Bolla BS, Tax G, Bíró T, Kemény L. Factors shaping the composition of the cutaneous microbiota. *Br J Dermatol*. 2016 Aug 12;
34. Saint-Jean M, Khammari A, Jasson F, Nguyen J-M, Dréno B. Different cutaneous innate immunity profiles in acne patients with and without atrophic scars. *Eur J Dermatol EJD*. 2016 Feb 1;26(1):68–74.
35. Jeremy AHT, Holland DB, Roberts SG, Thomson KF, Cunliffe WJ. Inflammatory events are involved in acne lesion initiation. *J Invest Dermatol*. 2003 Jul;121(1):20–7.
36. Muguet Guenot L, Vourc'h Jourdain M, Saint-Jean M, Corvec S, Gaultier A, Khammari A, et al. Confocal microscopy in adult women with acne. *Int J Dermatol*. 2018 Mar;57(3):278–83.
37. Hanifin JM, Rogge JL. Staphylococcal infections in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol*. 1977 Oct;113(10):1383–6.
38. Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 1974 May;90(5):525–30.

39. Abeck D, Mempel M. *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br J Dermatol*. 1998 Dec;139 Suppl 53:13–6.
40. Lheure C, Grange PA, Ollagnier G, Morand P, Désiré N, Sayon S, et al. TLR-2 Recognizes *Propionibacterium acnes* CAMP Factor 1 from Highly Inflammatory Strains. *PLoS One*. 2016;11(11):e0167237.
41. Kim J. Review of the Innate Immune Response in Acne vulgaris: Activation of Toll-Like Receptor 2 in Acne Triggers Inflammatory Cytokine Responses. *Dermatology*. 2005 Nov 4;211(3):193–8.
42. Schaller M, Loewenstein M, Borelli C, Jacob K, Vogeser M, Burgdorf W h. c., et al. Induction of a chemoattractive proinflammatory cytokine response after stimulation of keratinocytes with *Propionibacterium acnes* and coproporphyrin III. *Br J Dermatol*. 2005 Jul 1;153(1):66–71.
43. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Apr;22(2):240–73.
44. Jan AT. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front Microbiol*. 2017;8:1053.
45. Jeon J, Mok HJ, Choi Y, Park SC, Jo H, Her J, et al. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Propionibacterium acnes*. *Proteomics Clin Appl*. 2017 Jan;11(1–2):1600040.
46. Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jun;15(6):375–87.
47. Choi E-J, Lee HG, Bae I-H, Kim W, Park J, Lee TR, et al. *Propionibacterium acnes*-Derived Extracellular Vesicles Promote Acne-Like Phenotypes in Human Epidermis. *J Invest Dermatol*. 2018 Jan 31;138(6):1371–9.
48. Su Q, Grabowski M, Weindl G. Recognition of *Propionibacterium acnes* by human TLR2 heterodimers. *Int J Med Microbiol* [Internet]. [cited 2017 Feb 20]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422116302880>
49. Notay M, Foolad N, Vaughn AR, Sivamani RK. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for the Treatment and Prevention of Adult Dermatological Diseases. *Am J Clin Dermatol*. 2017 Dec;18(6):721–32.
50. Fan Y, Hao F, Wang W, Lu Y, He L, Wang G, et al. Multicenter cross-sectional observational study of antibiotic resistance and the genotypes of *Propionibacterium acnes* isolated from Chinese patients with acne vulgaris. *J Dermatol*. 2015 Oct 1;43(4):406–13.
51. Beylot C, Auffret N, Poli F, Claudel J-P, Leccia M-T, Del Giudice P, et al. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014 Mar 1;28(3):271–8.

52. Burnham CA, Hogan PG, Wallace MA, Deych E, Shannon W, Warren DK, et al. Topical Decolonization Does Not Eradicate the Skin Microbiota of Community-Dwelling or Hospitalized Adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(12):7303–12.
53. Tanghetti E. The impact and importance of resistance. *Cutis*. 2007 Jul;80(1 Suppl):5–9.

Tables

Strain n#	Phylotype	Clonal Complex	SLST-type	Origin
1	IA1	CC18	A1	severe acne
2	II	CC53	K2	severe acne
3	III	CC43	L7	severe acne

Table 1: Summary of *C. acnes* strains characterization and origins, used in the present study.

Target	Manufacturer	Reference
TLR-2	SantaCruz	SC-10739
TGF- β	Serotec	MCA797
IL-17	Abcam	AB79056
IL-1 β	Abcam	AB2105
IL-10	R&D Systems	AF-217-NA
β -Defensin-2	Abcam	AB63982

Table 2: Summary of antibodies used for immunohistochemistry experiments.

Figures

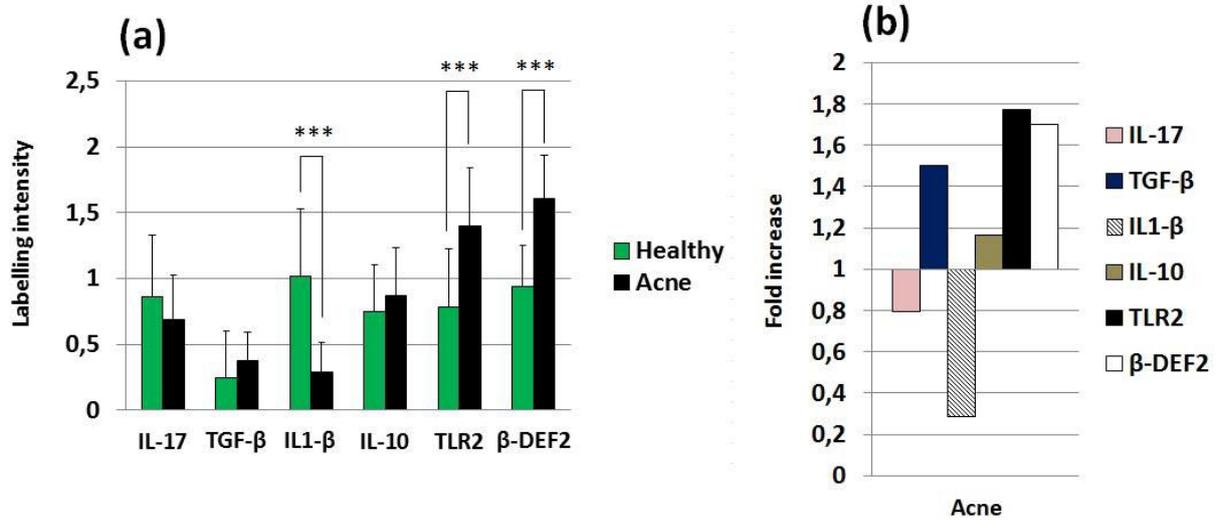


Figure 1: Innate immune markers studied in non-lesional skins (NLS) from acne (n=12) and healthy (n=13) groups. (a) Raw data of labelling intensity are presented according to the considered markers: IL-17, TGF-β, IL-1β, IL-10, TLR-2 and β-defensin-2. Data from acne and healthy groups were respectively combined and the variations are shown as mean +/- standard deviation *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05. Intensity labelling was evaluated using the following scale: null labelling (0), very weak labelling (1), weak labelling (2), moderate labelling (3), strong labelling (4). (b) The results are presented as the fold increase expression of IIMs comparing with NLS from healthy group.

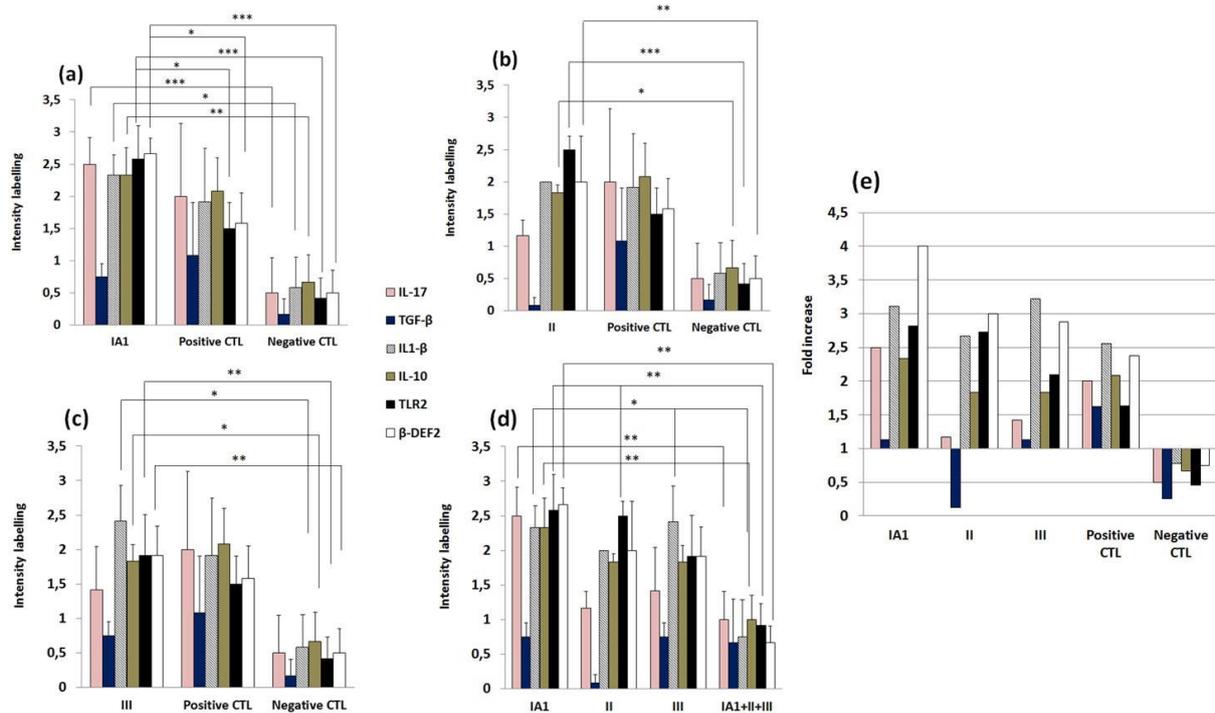


Figure 2: Immunohistochemistry performed on healthy skin explants which have been in contact with phylotypes IA1, II and III singly or a mixture of IA1+II+III (n=3). The results from three donors were combined and the variation is shown as mean +/- standard deviation *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05. Slides were double-blinded read by two independent readers. Intensity labelling was evaluated using the following scale: null labelling (0), very weak labelling (1), weak labelling (2), moderate labelling (3), strong labelling (4). (a) Intensity labelling obtained after IHC experiments on three independent experiments, comparing explants after incubation with phylotype IA1, positive and negative controls. (b) Intensity labelling obtained after IHC experiments on three independent experiments, comparing explants after incubation with phylotype II, positive and negative controls. (c) Intensity labelling obtained after IHC experiments on three independent experiments, comparing explants after incubation with phylotype III, positive and negative controls. (d) Intensity labelling obtained after IHC experiments on three independent experiments, comparing explants after incubation with phylotype IA1, II, III and IA1+II+III to test whether

the restoration of the phylotype diversity have an impact on the explant inflammatory response. (e) Results of IHC labelling intensity scores, presented as fold increase/decrease taking IA1+II+III condition as reference.

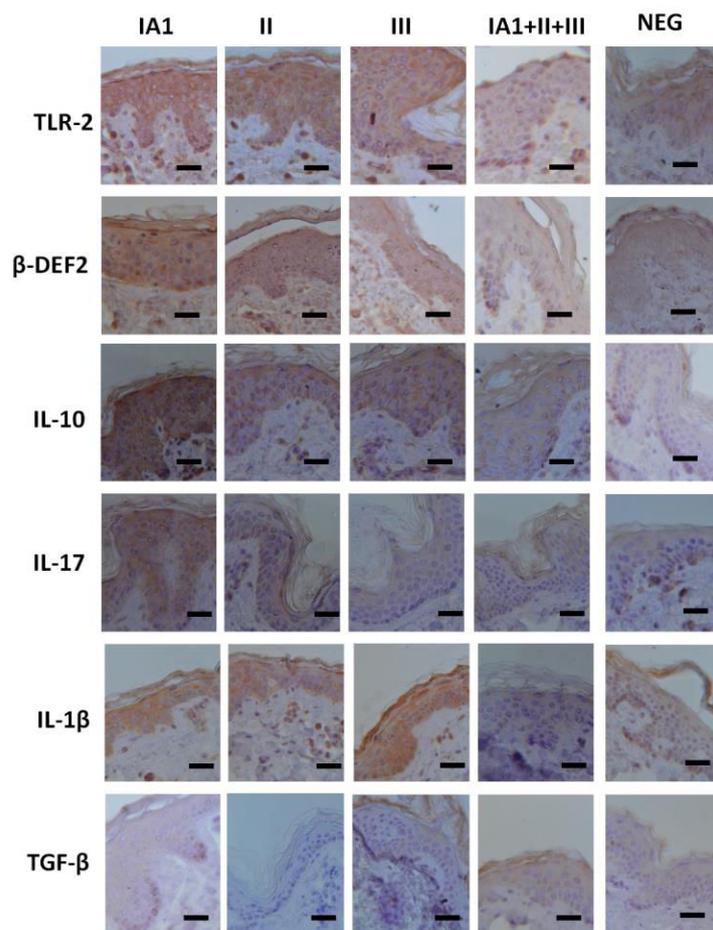


Figure 3: Immunohistochemistry performed on skin explants after 6h-incubation with either *C. acnes* IA1, II or III phylotype alone, or with a combination of IA1+II+III phylotypes. The studied markers are innate immunity-related markers (TLR-2, β -defensin-2, IL-10, IL-17, IL-1 β , and TGF- β). Negative control was obtained by incubating skin explant in culture media alone. Results from three donors were combined and the variation is shown as mean \pm standard deviation *** $p < 0.001$. Labelling appeared mainly in the epidermis for both markers. Intensity labelling was evaluated using the following scale: null labelling (0), very weak labelling (1), weak labelling (2), moderate labelling (3), strong labelling (4). Scale bars correspond to 300 μ m.

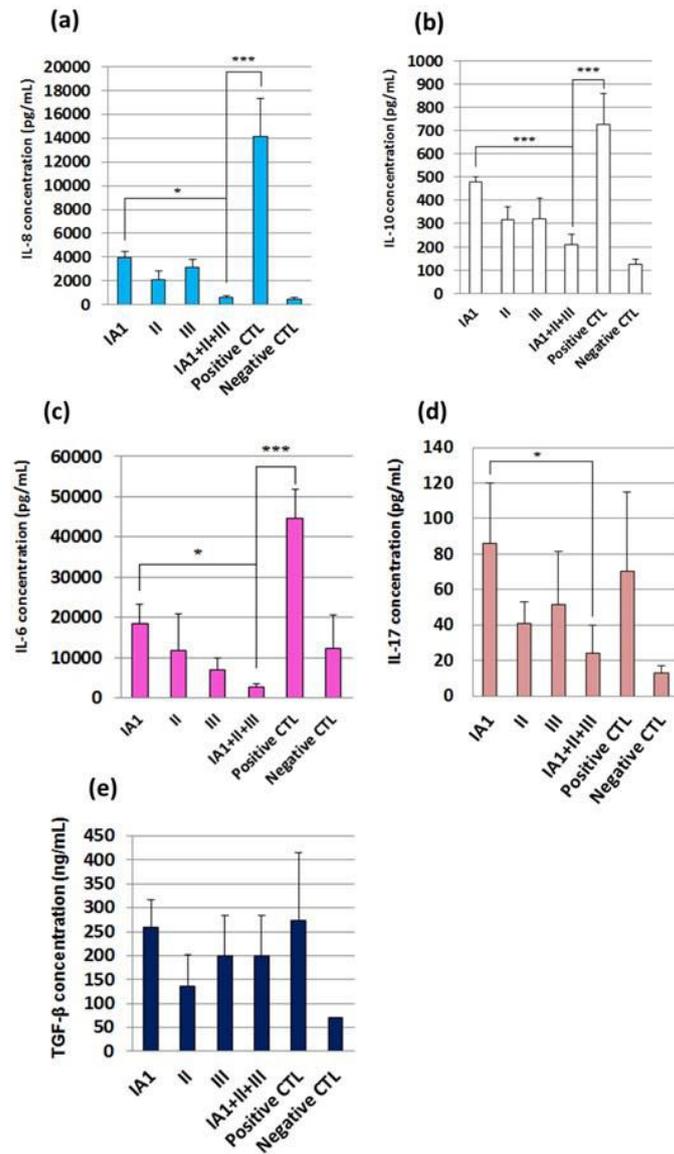


Figure 4: Evaluation of cytokines concentrations released by normal skin explants after 6 h incubation with *C. acnes* phylotypes IA1, II or III singly, comparing with the combination of phylotypes IA1+II+III (n=3). Positive control was obtained by incubating skin explants with *E. coli* LPS, and negative control was obtained by incubating skin explant in culture media alone. The results from three donors were combined and the variation is shown as mean +/- standard deviation *** p<0.001. (a) IL-8 concentration (pg/mL), (b) IL-10 concentration (pg/mL), (c) IL-6 concentration (pg/mL), (d) IL-17 concentration (pg/mL), (e) TGF-β concentration (ng/mL).

Par ailleurs, quatre marqueurs caractéristiques de la matrice extracellulaire et impliqués dans son remodelage au niveau de la peau ont été étudiés (Figure 55, p.127) (TIMP-2, MMP-2, MMP-9, et la laminine- α 5).

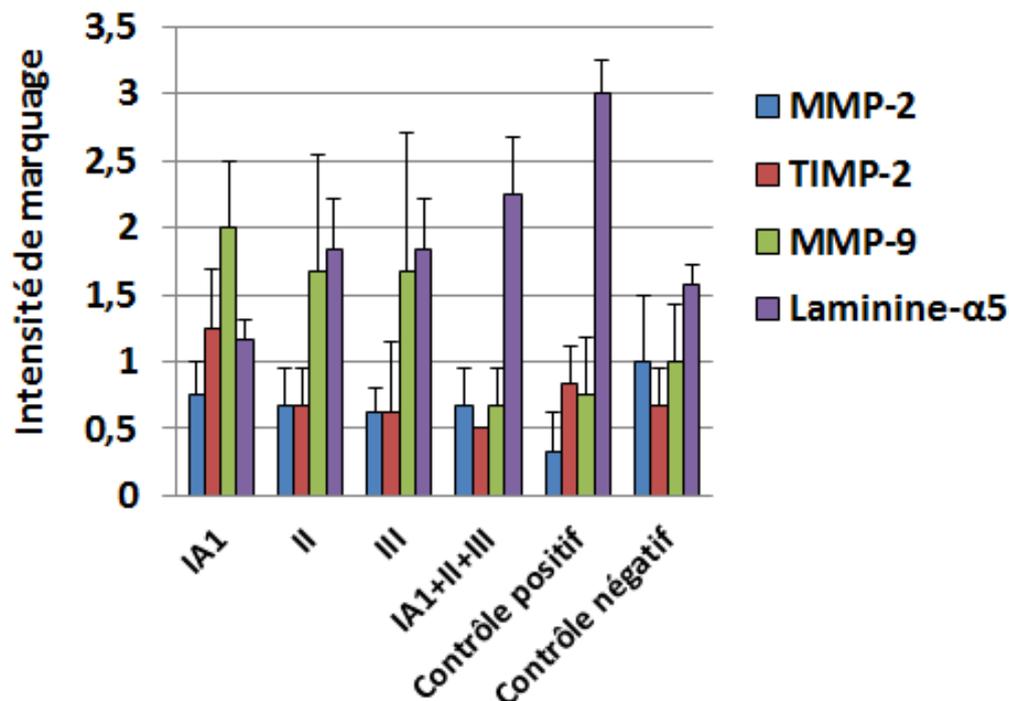


Figure 55 : Intensité de marquage obtenue après immunohistochimie réalisée sur les explants de peau après incubation avec différentes combinaisons de phylotypes de *C. acnes* (n=3).

Les résultats montrent des tendances d'expression différentes selon les conditions d'incubation testées. Par exemple, TIMP-2 a démontré un score moyen d'intensité de marquage de 1,25 dans les explants incubés avec le phylotype IA1 alors qu'il était de 0,5 dans les explants incubés avec la combinaison des trois (Figure 55, p.127). Il en est de même pour MMP-9, qui montre un score moyen d'intensité de marquage de 2 après incubation avec le phylotype IA1, alors qu'il était de 0,7 après incubation avec la combinaison des trois phylotypes (Figure 55, p.127). Cette tendance n'est pas retrouvée pour le marqueur laminine- α 5 qui démontre un score d'intensité de marquage maximum après incubation avec du LPS bactérien, qui était le contrôle positif de la coculture (Figure 55, p.127). De même, le marqueur MMP-2 n'a pas démontré de tendance spécifique à une condition de coculture par rapport aux autres, avec un score moyen d'intensité de marquage proche de 0,6 pour toutes les conditions (Figure 55, p.127).

B.5 Résolutions des problèmes rencontrés et limites

B.5.a Test ELISA

Les manipulations ELISA ont demandé une mise au point particulière car les cytokines dosées dans les échantillons s'avéraient être très souvent hors de la gamme étalon réalisée. Or, l'extrapolation n'étant pas possible pour cette technique, il a fallu refaire les manipulations lorsque l'échantillon se trouvait hors gamme étalon. Cela s'est passé pour l'IL-6, l'IL-8 ainsi que l'IL-17 pour lesquels j'ai réalisé entre deux et trois fois les manipulations en testant deux concentrations ($1/100^{\text{ème}}$ et $1/250^{\text{ème}}$) afin d'obtenir un signal fiable.

B.5.b Test des anticorps pour l'immunohistochimie

Les conditions expérimentales pour l'utilisation des anticorps en immunohistochimie sont à déterminer par le manipulateur. Certes, les protocoles d'utilisation sont disponibles sur la fiche du fournisseur, mais il est bien stipulé que les concentrations et les temps de démasquage notamment peuvent varier d'un laboratoire à l'autre et qu'il est donc nécessaire de réaliser une mise au point des anticorps avant utilisation. Ainsi, les 11 anticorps utilisés au cours de ce travail de Thèse ont été mis au point en optimisant quatre paramètres principaux : le temps de démasquage (20, 30, 40 min), le tampon utilisé pour le démasquage (EDTA et citrate), la concentration d'anticorps, le mode d'incubation (nuit à 4°C, ou 1 h à température ambiante). Pour chaque anticorps, une étape préalable de bibliographie était incontournable pour pouvoir identifier des tissus positifs (contrôle positif) et pouvoir commander le nombre de lames requis auprès des fournisseurs pour pouvoir réaliser les tests.

B.5.c Mise au point de la technique de création de lysats membranaires de *C. acnes*

La mise au point de la technique de création de lysats membranaires de *C. acnes* a demandé plus d'un an de manipulations à cause de plusieurs problèmes techniques rencontrés.

La recroissance des bactéries sur géloses après la réalisation du protocole a été l'un des problèmes principaux que j'ai rencontré, et que j'ai levé en réalisant une inactivation par choc thermique en amont du protocole de fragmentation (cycles congélation/décongélation et cycles congélation/sonication).

B.5.d La technique du crystal violet pour l'étude de la production de biofilm bactérien

La technique du crystal violet a demandé plusieurs mois de mise au point. Plusieurs problèmes techniques ont été rencontrés. En effet, si la souche considérée était hautement productrice de biofilm, les lavages successifs décrochaient la plaque de biofilm ainsi formée. Cela était très visible après coloration du biofilm. Il y avait donc une perte majeure d'information et les résultats n'étaient pas fiables. L'opportunité et la disponibilité d'une technique plus standardisée nous a conduit à cesser la mise au point de la technique au crystal violet.

B.5.e Typage moléculaire de *C. acnes*

La caractérisation moléculaire des souches a posé problème sur certains échantillons dont le complexe clonal n'a pas pu être déterminé par le schéma MLST9, étant donné la non amplification de certains gènes, et en particulier *recA*. Dans ce cas, certains paramètres de la PCR ont été modifiés, comme par exemple la concentration en MgCl₂.

Points de synthèse

- Les extraits membranaires issus des souches de *C. acnes* de phylotype IA1, II et III ont induit une réponse inflammatoire significativement plus élevée comparés au contrôle négatif (milieu de culture seul).
- La restauration de la diversité des phylotype *in vitro* induit une baisse de la réponse inflammatoire des explants de peau incubés avec une combinaison de trois phylotypes (IA1+II+III) comparé aux phylotypes seuls (IA1, II ou III).
- La diversité des phylotypes de *C. acnes* apparaît ainsi comme un facteur clé, capable de déclencher l'activation du système immunitaire inné cutané.
- La diversité des phylotypes apparaît comme un facteur capable de moduler (i) l'activation du système immunitaire innée au niveau de la peau ; mais également (ii) l'expression de certains marqueurs impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire au niveau de la peau, principalement MMP-9 et TIMP-2.

VI. Discussion et perspectives

L'acné a longtemps été considérée comme une maladie inflammatoire multifactorielle chronique du follicule pilosébacé complexe. Actuellement, trois facteurs clés sont décrits comme étant impliqués dans le développement de l'acné: la production de sébum stimulée par les hormones, la kératinisation anormale du canal pilosébacé et la colonisation cutanée par *C. acnes*.

A l'heure actuelle, le système immunitaire inné commence à être mis en évidence en tant que quatrième acteur clé et le microbiote en tant que cinquième acteur clé de la physiopathologie de l'acné (Dréno *et al.*, 2015; Koreck *et al.*, 2003). Dans ce contexte de dermatose inflammatoire multifactorielle et au regard des travaux précédemment publiés par notre équipe, il apparaît crucial de décrypter le rôle des communautés bactériennes cutanées et en particulier des sous-types de *C. acnes*, dans la physiopathologie de l'acné sévère. Egalement, le rôle de l'immunité innée dans l'apparition de cette dermatose reste à élucider (Dréno *et al.*, 2016a; Gollnick and Dréno, 2015).

Dans un premier temps, ce travail de Thèse s'est axé autour d'une étude de caractérisation des souches de *C. acnes* retrouvées au niveau du visage et du dos de patients atteints d'acné sévère du dos et de volontaires sains. Puis il s'agissait de déterminer si la perte de diversité des phylotypes observée en contexte d'acné sévère, était une cause ou une conséquence de la maladie. Pour répondre à cette question, un système *in vitro* de cocultures entre des extraits de bactéries et des explants de peau humaine saine a été mis au point.

La mise au point d'une technique d'obtention d'extraits membranaires bactériens a été réalisée

La technique d'obtention d'extraits membranaires à partir d'une suspension bactérienne de *C. acnes* a nécessité environ une année. Ceci a permis de mettre au point une procédure standardisée, que nous avons validé pour *C. acnes* mais également pour trois autres bactéries : *C. avidum*, *C. granulosum* et *C. namnetense*. La mise au point de cette technique était importante pour réaliser les cocultures entre extraits membranaires bactériens et explants de peau dans un incubateur partagé avec le reste de l'équipe, et éviter la contamination des cultures voisines. Cette technique présente également un intérêt tout particulier dans l'optique de mettre au point un vaccin pour l'acné sévère. En effet, l'acné sévère étant une maladie laissant des cicatrices irréversibles (Fabbrocini *et al.*, 2010), la mise au point d'un vaccin reste

une option intéressante, notamment lorsqu'il y a un historique familial (Goulden *et al.*, 1999). Cette orientation fait partie d'un projet actuellement développé par d'autres équipes internationales, notamment celle du Dr Eric (Chun-Ming) Huang du Département de Dermatologie de la Faculté de Médecine de San Diego (Etats-Unis), qui a très récemment publié un article ouvrant la voie au développement d'un vaccin ciblant le CAMP factor de *C. acnes* (Wang *et al.*, 2018).

De plus, cette technique pourra servir pour la mise au point d'un anticorps monoclonal visant *C. acnes* pour le développement d'autres outils, comme les anticorps utilisés pour l'immunohistochimie. Très peu d'anticorps anti-*C. acnes* sont utilisés dans la littérature scientifique car ils ne sont pas commercialisés, et les rares équipes en possédant ne sont pas désireuses de les partager (Jahns *et al.*, 2013).

Ce protocole pourra également servir à l'élaboration de traitement topique à base de probiotiques pour traiter l'acné. L'utilisation de probiotiques dans le traitement de dermatoses inflammatoires a démontré un intérêt croissant durant ces deux dernières années (Mottin and Suyenaga, 2018; Notay *et al.*, 2017). De plus, nous avons montré une perte drastique de la diversité des phylotypes de *C. acnes* chez les patients atteints d'acné sévère du dos en comparaison à un groupe sain (Dagnelie *et al.*, 2018a). Cette perte de diversité pouvait induire une inflammation cutanée *in vitro*, dans un modèle d'explants de peau humaine. De ce fait, des traitements basés sur la restauration de la diversité des sous-types de *C. acnes* devraient être testés dans le cadre d'essais cliniques, basés sur l'utilisation d'extraits membranaires de *C. acnes*. L'utilisation d'extraits de *C. acnes* a déjà été testée par une équipe Italienne dans le traitement de vaginoses bactériennes, de candidoses vulvo-vaginales, et de vaginites mixtes (Melis *et al.*, 2018). L'efficacité d'un tel traitement était expliquée par l'activation du système immunitaire innée provoquée par les extraits de *C. acnes*, qui permettait à la barrière vaginale d'induire une réponse immunitaire suffisamment forte pour éradiquer le pathogène exogène ayant induit l'infection.

Ainsi, de nombreuses perspectives s'ouvrent pour l'utilisation de cette technique d'obtention d'extraits membranaires de *C. acnes*, tant sur un plan clinique que sur un plan de recherche et développement.

Il y a une perte de diversité des phylotypes de C. acnes en contexte d'acné sévère du dos

La caractérisation exhaustive des souches de *C. acnes* collectées au cours de l'étude (phylotype, CC et type SLST), a permis de démontrer que les CC18 et CC53 étaient respectivement associés au groupe acné et au groupe sain. Ce résultat se base sur la caractérisation de la souche prédominante de *C. acnes* en culture, retrouvée en utilisant le « single-picking ». En effet, une étude analysant 20 à 30 isolats avec la technique du « multi-picking », a précédemment permis de mettre en évidence que le clone prédominant en culture constituait 85 à 100 % de l'échantillon total (Lomholt *et al.*, 2017). Ainsi, la méthode du « single-picking » permet d'identifier le clone prédominant de *C. acnes* présent au sein de l'échantillon de flore cutanée.

Ce résultat confirme l'étude menée par Lomholt et Kilian (Lomholt and Kilian, 2010; Lomholt *et al.*, 2017). Par ailleurs, ce travail de Thèse révèle pour la première fois qu'une perte importante de diversité des phylotypes est observée au niveau du dos des patients atteints d'acné sévère, avec 95,6 % des souches appartenant au phylotype IA1.

Cette prédominance du phylotype IA1 a déjà été décrite dans la littérature scientifique et nous confirmons ce résultat (Lomholt and Kilian, 2010). Par exemple, Lomholt et Kilian ont décrit les CCs retrouvés uniquement chez deux patients présentant une acné du visage et du dos (Lomholt and Kilian, 2014). Sur le visage, ils ont retrouvé notamment du CC3 et du CC18, mais une plus faible diversité de CCs sur le dos. Dans ce travail de Thèse, nous avons également retrouvé une différence de diversité en fonction de la localisation (visage *versus* dos). Pour expliquer cette observation, une de nos hypothèses est liée à la quantité et la qualité du sébum présent à la surface de la peau sur le dos et le visage. De plus, il a été montré que le nombre de follicules pileux était différent d'une zone du corps à l'autre (Otberg *et al.*, 2004), ce qui pourrait influencer la quantité de sébum à la surface de ces deux zones. Enfin, la peau du dos n'est pas en contact avec le même type d'environnement que celle du visage, notamment en raison du contact permanent avec les textiles (dos), les UV (visage), la sécheresse (visage), les frottements (dos). A l'heure actuelle, aucune étude d'impact de tous ces paramètres environnementaux n'est disponible dans la littérature pour expliquer ces différences de diversité des sous-types de *C. acnes* retrouvés à différents endroits du corps humains.

Concernant les types SLST, très peu d'études décrivent à ce jour ceux qui sont retrouvés à la surface de la peau, compte tenu que c'est une méthode de typage moléculaire

récente (Scholz *et al.*, 2014). Lors de l'acceptation de notre étude pour publication dans le journal intitulé « **Acta Dermato-Venereologica** », seules deux études venaient d'être publiées sur cette caractérisation, dont une provenant de notre groupe (Paugam *et al.*, 2017), qui ne retrouvaient pas d'association significative entre un type SLST en fonction du score de sévérité des patients étudiées. La deuxième étude a également été publiée en 2017 par un groupe japonais (Nakase *et al.*, 2017) et décrivait notamment des clones de *C. acnes* retrouvés chez des patients atteints d'acné modérée à sévère. De manière intéressante, Nakase *et al.* ont plus fréquemment retrouvé du type SLST A5 dans leurs prélèvements bactériens issus de patients atteints d'acné sévère. Dans notre étude, nous retrouvons une association significative entre le type SLST A1 et l'acné sévère du dos. Cette différence de type SLST peut être expliquée par l'ethnie (Leung *et al.*, 2015), le climat, les habitudes hygiéniques qui sont différentes en fonction des pays, et également la prise en charge des patients atteints d'acné qui est très différente d'un pays à l'autre (utilisation différente d'antibiotiques, de l'isotrétinoïne et du peroxyde de benzoyle). A ce sujet, la description des types SLST retrouvés sur la peau de patients de différentes ethnies n'a jamais été réalisée et pourrait faire l'objet de futures investigations. Il est néanmoins intéressant de noter que dans l'étude de Nakase *et al.* comme dans ce travail de Thèse, c'est la clade A qui est retrouvée comme prédominante chez les patients atteints d'acné sévère.

Pour expliquer la prédominance du phylotype IA1/CC18/A1 en contexte d'acné sévère du dos, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Certaines études récentes mettent en évidence les différences de potentiels pro-inflammatoires en fonction des sous-types de *C. acnes* (Jasson *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2016). Ce potentiel pro-inflammatoire des souches de *C. acnes* peut être influencé par différents facteurs de virulence présents dans le génome de *C. acnes*. Par exemple, la hyaluronate lyase, qui est connue pour perturber les jonctions cellulaires, et dont deux allèles existent dans le génome de *C. acnes*, en fonction du complexe clonal auquel appartient la souche considérée. De ce fait, une souche appartenant au CC36 aura un allèle différent que celle appartenant au CC18, comme le suggère deux études récentes (Aubin *et al.*, 2017b; Nazipi *et al.*, 2017). Ces études prouvent que différents allèles existent pour le gène de la hyaluronate lyase, et ainsi, tous les sous-groupes de *C. acnes* ne lysent pas l'acide hyaluronique de la même façon et avec la même efficacité. De plus, d'autres facteurs de virulence comme les sialidases, neuraminidases, endoglycoceramidasés (Brüggemann *et al.*, 2004; Holland *et al.*, 2010), les facteurs CAMP (1, 2, 3, 4, and 5) (Lheure

et al., 2016), et le récepteur au fibrinogène (Grange *et al.*, 2017) sont présents dans le génome de *C. acnes*. Pourtant, sur le plan génomique, les différences demeurent faibles et non significatives entre les différents sous-types de cette bactérie, en raison d'un core-génome de 88 %. Ainsi, l'étude à l'échelle génomique peut partiellement expliquer un potentiel pro-inflammatoire différent d'un sous-groupe de *C. acnes* à l'autre.

En accord avec l'activité lipolytique connue de *C. acnes* (Whiteside and Voss, 1973), cette étude a identifié des enzymes lipolytiques dans la fraction sécrétoire de cette bactérie, y compris de la Glycérol-ester hydrolase A (GehA). GehA est reconnu comme l'un des facteurs de virulence impliqués dans la pathogenèse de l'acné (Falcocchio *et al.*, 2006; Gloor *et al.*, 2002; Miskin *et al.*, 1997), et est considéré comme l'enzyme principale responsable de l'hydrolyse des triacylglycérides contenus dans le sébum, conduisant à la libération de glycérol et d'acides gras libres. Ces acides gras libres sont proinflammatoires et favorisent l'hyperkératinisation de l'*infundibulum* et l'augmentation de l'adhérence entre *C. acnes* et les cellules du follicule pileux, favorisant la colonisation de *C. acnes* et la formation de biofilm (Burkhart and Burkhart, 2003; Falcocchio *et al.*, 2006). En outre, GehA lui-même est un facteur chimiotactique fort (Lee *et al.*, 1982). Sur un plan protéomique, un certain nombre de différences majeures ont été détectées entre souches appartenant aux phylotypes IA et IB: en comparaison aux deux souches de type IB, une souche de type IA, présentait une augmentation de la sécrétion de l'enzyme GehA (Holland *et al.*, 2010). Ces données représentent des avancées majeures dans la compréhension des différents potentiels proinflammatoires des sous-types de *C. acnes*, et sont à mettre en relation avec la capacité de produire des biofilms de chaque souche. En effet, Achermann *et al.* ont montré que les protéines synthétisées par *C. acnes* étaient différentes lorsque la bactérie était en phase planctonique ou en phase sessile, dans un modèle *in vivo* (Achermann *et al.*, 2015).

En conséquence, ces données suggèrent l'importance de futures études transcriptomiques pour vérifier les niveaux d'expression de l'ensemble de ces facteurs de virulence, et voir par exemple, si le phylotype IA1 les exprime au même niveau que le phylotype III. Ainsi, à l'heure actuelle, l'hypothèse transcriptomique pour expliquer ces différences de potentiel pro-inflammatoires entre les différents sous-groupes de *C. acnes* semble être la plus prometteuse mais demande de futures investigations.

Il existe une différence d'activation du système immunitaire inné entre les patients atteints d'acné sévère et les individus sains

Grâce à des manipulations d'IHC ciblant des marqueurs impliqués dans l'immunité innée humaine, nous avons pu mettre en évidence une différence d'activation de l'immunité innée entre les deux groupes. Plusieurs études ont précédemment suggéré l'implication d'autres facteurs que la microbiologie dans la physiopathologie de l'acné, et notamment celle du système immunitaire inné (Paugam *et al.*, 2017). De plus, d'autres études ont précédemment décrit l'expression de certains marqueurs de l'immunité innée dans la peau cliniquement saine d'individus sains (Miller, 2008; Patra *et al.*, 2018; Saint-Jean *et al.*, 2016).

Cette différence d'activation du système immunitaire inné entre les deux groupes pourrait représenter un facteur aggravant de l'acné. En effet, les marqueurs TLR-2 et β -défensine-2 sont déjà connus pour être des médiateurs cruciaux de l'inflammation cutanée (Braff and Gallo, 2006; Gariboldi *et al.*, 2008; Lheure *et al.*, 2016; Mogensen, 2009). Dans ce travail de Thèse, ils sont apparus significativement augmentés dans la peau des patients atteints d'acné sévère comparée aux sujets sains. Cela représente une nouvelle hypothèse pour expliquer les réactions inflammatoires inappropriées observées en réponse à *C. acnes* (Lheure *et al.*, 2016) qui est pourtant une bactérie commensale de la peau. Ainsi, ce phénomène de suractivation et de « sur-sensibilité » de l'immunité innée de la peau acnéique, de pair avec un déséquilibre des sous-types de *C. acnes* (prédominance du phylotype IA1), représentent probablement un terrain favorisant le développement de lésions inflammatoires d'acné.

Les phylotypes IA1, II et III de C. acnes induisent une réponse inflammatoire significative par rapport au témoin négatif

Grâce au système de coculture *in vitro* mis au point au cours de ce travail de Thèse, nous avons mis en évidence une suractivation de certains marqueurs de l'immunité innée dans des explants de peau après incubation avec les phylotypes IA1, II ou III, comparé aux explants incubés dans du milieu de culture seuls (contrôle négatif). Ce résultat confirme des résultats de la littérature actuelle concernant le potentiel proinflammatoire des différentes souches de *C. acnes* (Jasson *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2016).

Restaurer la diversité des phylotypes in vitro permet d'abaisser l'activation anormale du système immunitaire inné

Partant du constat qu'il y avait une perte drastique de diversité des phylotypes sur le dos des patients atteints d'acné sévère du dos, nous avons voulu tester *in vitro*, si cette perte de diversité était la cause ou la conséquence de l'inflammation importante observée en contexte d'acné sévère. Pour se faire, nous avons eu l'idée de tester les réponses inflammatoires d'explants de peau saine incubés dans plusieurs conditions : les phylotypes seuls (IA1, II ou III), ou bien un mélange de phylotype (IA1+II+III). Les explants incubés avec la combinaison IA1+II+III ont démontré une réponse inflammatoire (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TLR-2, β -défensine-2) plus faible comparé à ceux incubés avec les phylotypes de *C. acnes* individuellement (IA1, II ou III), particulièrement avec le phylotype IA1, connu pour son implication dans l'acné (Lomholt and Kilian, 2010; Lomholt *et al.*, 2017). De fait, lorsque nous restaurons la diversité des phylotypes de *C. acnes* dans un modèle *in vitro*, nous observons une réponse inflammatoire faible. Ces données démontrent que la diversité des phylotypes apparaît comme un facteur capable de moduler l'activation du système immunitaire inné au niveau de la peau. Ce travail a également mis en évidence que la diversité des phylotypes est un facteur capable de moduler l'expression de deux marqueurs impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire au niveau de la peau (MMP-9 et TIMP-2), en plus de la filagrine et certaines intégrines qui étaient déjà connues (Jarrousse *et al.*, 2007). Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles interrogations, notamment les mécanismes permettant aux cellules de la peau de percevoir ces différences de diversités de phylotypes, et pouvant expliquer ces différences de réponse inflammatoire. Au vu de la littérature actuelle sur l'implication du TLR-2 dans la physiopathologie de l'acné, il est probable que ce récepteur soit la clé de voûte permettant aux cellules cutanées (effecteurs immunitaires et également kératinocytes) de percevoir les signaux envoyés par le microbiote, et notamment les différences de diversité microbienne.

Conclusions générales et perspectives d'études

L'ensemble de ce travail de Thèse nous permet de conclure que la perte de diversité des phylotypes observée chez les patients atteints d'acné sévère du dos s'avère être un facteur essentiel impliqué dans le déclenchement d'une réponse inflammatoire cutanée significative.

Ce résultat pertinent ouvre la voie à d'autres questions, notamment concernant les types de récepteurs qui sont capable de percevoir ce type de signal. Par ailleurs, nous avons observé que deux marqueurs, le TLR-2 et la β -défensine-2, étaient surexprimés dans la peau des patients atteints d'acné sévère. Or, le TLR-2 a été décrit comme largement impliqué dans la reconnaissance de *C. acnes* en contexte d'acné (Gariboldi *et al.*, 2008; Lheure *et al.*, 2016). Il représente donc l'hypothèse la plus pertinente pour expliquer comment la peau humaine est capable de percevoir ces différences de diversité des phylotypes de *C. acnes*. Ainsi, ceci pourra faire l'objet de futures investigations *in vitro*, notamment grâce à l'utilisation d'inhibiteur des TLRs dans les mêmes conditions qu'évoquées dans ce travail de Thèse, et ainsi évaluer l'implication des TLRs dans la perception par la peau, de ces différences de diversité de phylotypes.

L'ensemble de ce travail de Thèse mène également à plusieurs questions cliniques, relatives à la prise en charge des patients atteints d'acné sévère. En effet, les traitements étant parfois mal tolérés (Wolverton and Harper, 2013), et au vue de l'antibiorésistance émergente, il s'avère important de développer de nouvelles approches pour leur prise en charge. Les résultats que nous apportons représentent un travail préliminaire fondamental et solide pour la réalisation d'essais cliniques, dans l'optique de tester les pré et probiotiques cutanés dans l'acné, en restaurant la diversité des phylotypes qui est réduite chez ces patients. Ce traitement topique consisterait d'abord à l'échantillonnage de la flore cutané du patient et ensuite, l'élaboration d'un traitement probiotique personnalisé, à base de souches de *C. acnes* « manquantes » au sein du microbiote de ce patient en particulier. Avec l'avènement de la médecine personnalisée et l'utilisation des Big Data, la mise en place de ce type d'approche thérapeutique personnalisée représente un domaine de choix pour de futurs essais thérapeutiques.

Annexes

Communication	Dates	Lieu	Titre	Format
Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Nantes	décembre 2016	Nantes, France	Diversity of <i>Propionibacterium acnes</i> phylotypes according to body localization in acne patients versus healthy controls	Communication orale, 1er prix remporté
Young Researchers in Life Sciences (YRLS, 8 ^{ème} édition)	15-17 mai 2017	Paris, France	Diversity of <i>Propionibacterium acnes</i> phylotypes according to body localization in acne patients versus healthy controls	Poster
ESDR (European Society for Dermatological Research, 47 ^{ème} édition)	27-30 septembre 2017	Salzburg, Autriche	Diversity of <i>Propionibacterium acnes</i> phylotypes according to body localization in acne patients versus healthy controls	Poster (n°461) Abstract publié dans JID Volume 137, Number 10S, Supplement 2, October 2017
HUGO (Hôpitaux Universitaires du Grand Ouest)	21 novembre 2017	Rennes, France	Diversity of <i>Propionibacterium acnes</i> phylotypes according to body localization in acne patients versus healthy controls	Poster
JDP (Journées Dermatologiques de Paris)	12-16 décembre 2017	Paris, France	La sévérité de l'acné est associée à une perte de la diversité des souches de <i>Propionibacterium acnes</i> en peau acnéique	Communication orale (CO n°150)
IID (International Investigative Dermatology)	16-19 mai 2018	Orlando, Etats-Unis	<i>Cutibacterium acnes</i> phylotypes diversity loss: a trigger for skin inflammation process	Poster (n°914)
CARD (Congrès Annuel de la Recherche Dermatologique)	21-22 juin 2018	Bordeaux, France	L'acné nodulaire du dos est associée à une perte de la diversité des souches de <i>Cutibacterium acnes</i>	Poster (n°CARD00001)
			La perte de diversité des phylotypes de <i>Cutibacterium acnes</i> : un déclencheur de l'immunité innée	Communication orale (n°CARD00003)
EBJIS (The European Bone & Joint Infection Society). Présenté par le Dr S. Corvec.	6-8 septembre 2018	Helsinki, Finlande	<i>In vitro</i> evidence for proinflammatory potential of the osteitis-isolated bacterium <i>Cutibacterium namnetense</i>	Poster (n°66)
JDP (Journées Dermatologiques de Paris)	11-15 décembre 2018	Paris, France	Acné sévère et capacité à produire du biofilm des souches de <i>Cutibacterium acnes</i> : Le phylotype IA1, type SLST D1 est plus biofilmogène !	Soumis
			La perte de la diversité des phylotypes de <i>Cutibacterium acnes</i> : un déclencheur potentiel de l'acné inflammatoire sévère	Soumis
RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse)	17-18 décembre 2018	Paris, France	Acné sévère et capacité à produire du biofilm des souches de <i>Cutibacterium acnes</i> : Le phylotype IA1, type SLST D1 est plus biofilmogène !	Communication orale
		Paris, France	<i>In vitro</i> evidence for proinflammatory potential of the osteitis-isolated bacterium <i>Cutibacterium namnetense</i>	Poster (n°291)

Annexe 1 : Liste des communications réalisées dans le cadre du travail de Thèse.

Communication	Dates	Lieu	Titre	Format
Acta Dermato-Venereologica IF 2018 : 3.2	Publié en novembre 2017 Sélectionné pour être publié sur le facebook https://www.facebook.com/ActaDV dans un post du 12/01/2018 Sélectionné comme « editor's choice » en première page du site pour le numéro 2.		Decrease of <i>Propionibacterium acnes</i> phylotypes diversity in the back of acne patients	Research article
CMI (Clinical Microbiology and Infection) IF2018 : 5.4	05/03/2018		<i>Cutibacterium acnes</i> molecular typing: time to standardize the method	Narrative review
JEADV (Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology) IF 2018 : 4.3	25/07/2018		<i>Cutibacterium acnes</i> phylotypes diversity loss: a trigger for skin inflammation process	Research article
Anaerobe IF 2018 : 2.7	21/08/2018		Assessment of seven protocols to prepare <i>Cutibacterium acnes</i> cell wall membrane extracts and review of the literature	Article of methodology
JID (Journal of Investigative Dermatology) IF 2018 : 6.4	En cours de finalisation		Inflammatory skin is associated with changes in the skin microbiota composition on the back of severe acne patients	Letter to editor

Annexe 2 : Liste des articles rédigés dans le cadre du travail de Thèse.

Références

- Abeck, D., and Mempel, M. (1998). *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br. J. Dermatol.* 139 Suppl 53, 13–16.
- Achermann, Y., Goldstein, E.J.C., Coenye, T., and Shirtliff, M.E. (2014). *Propionibacterium acnes*: from Commensal to Opportunistic Biofilm-Associated Implant Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 419–440.
- Achermann, Y., Tran, B., Kang, M., Harro, J.M., and Shirtliff, M.E. (2015). Immunoproteomic Identification of In Vivo-Produced *Propionibacterium acnes* Proteins in a Rabbit Biofilm Infection Model. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 22, 467–476.
- Alekseyenko, A.V., Perez-Perez, G.I., De Souza, A., Strober, B., Gao, Z., Bihan, M., Li, K., Methé, B.A., and Blaser, M.J. (2013). Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome* 1, 31.
- Aubin, G.G., Portillo, M.E., Trampuz, A., and Corvec, S. (2014). *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Médecine Mal. Infect.* 44, 241–250.
- Aubin, G.G., Lavigne, J.-P., Foucher, Y., Dellière, S., Lepelletier, D., Gouin, F., and Corvec, S. (2017a). Tropism and virulence of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* involved in implant-associated infection. *Anaerobe* 47, 73–78.
- Aubin, G.G., Baud'huin, M., Lavigne, J.-P., Brion, R., Gouin, F., Lepelletier, D., Jacqueline, C., Heymann, D., Asehnoune, K., and Corvec, S. (2017b). Interaction of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* with bone cells: a step toward understanding bone and joint infection development. *Sci. Rep.* 7, 42918.
- Barnard, E., Nagy, I., Hunyadkürti, J., Patrick, S., and McDowell, A. (2015a). Multiplex touchdown PCR for rapid typing of the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1149–1155.
- Barnard, E., Nagy, I., Hunyadkürti, J., Patrick, S., and McDowell, A. (2015b). Multiplex Touchdown PCR for Rapid Typing of the Opportunistic Pathogen *Propionibacterium acnes*. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1149–1155.
- Barnard, E., Liu, J., Yankova, E., Cavalcanti, S.M., Magalhães, M., Li, H., Patrick, S., and McDowell, A. (2016a). Strains of the *Propionibacterium acnes* type III lineage are associated with the skin condition progressive macular hypomelanosis. *Sci. Rep.* 6, 31968.
- Barnard, E., Shi, B., Kang, D., Craft, N., and Li, H. (2016b). The balance of metagenomic elements shapes the skin microbiome in acne and health. *Sci. Rep.* 6, 39491.
- Bayston, R., Ashraf, W., Barker-Davies, R., Tucker, E., Clement, R., Clayton, J., Freeman, B.J.C., and Nuradeen, B. (2007). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* on biomaterials in vitro and in vivo: Impact on diagnosis and treatment. *J. Biomed. Mater. Res. A* 81A, 705–709.
- Bieber, T. (2008). Atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* 358, 1483–1494.
- Bieber, T. (2010). Atopic Dermatitis. *Ann. Dermatol.* 22, 125–137.
- Billroth, T. (1874). Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria septica und den Antheil, welchen sie an der Entstehung und Verbreitung der accidentellen Wundkrankheiten haben

Versuch einer wissenschaftlichen Kritik der verschiedenen methoden antiseptischer Wundbehandlung (Berlin : G. Reimer).

Braff, M.H., and Gallo, R.L. (2006). Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 306, 91–110.

de Brouwer, B., Veltkamp, M., Wauters, C.A., Grutters, J.C., and Janssen, R. (2015). *Propionibacterium acnes* isolated from lymph nodes of patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis. Off. J. WASOG* 32, 271–274.

Brüggemann, H., Henne, A., Hoster, F., Liesegang, H., Wiezer, A., Strittmatter, A., Hujer, S., Dürre, P., and Gottschalk, G. (2004). The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science* 305, 671–673.

Burkhart, C.N., and Burkhart, C.G. (2003). Microbiology's principle of biofilms as a major factor in the pathogenesis of *acne vulgaris*. *Int. J. Dermatol.* 42, 925–927.

Byrd, A.L., Belkaid, Y., and Segre, J.A. (2018). The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 143-155.

Castaño, O., Pérez-Amodio, S., Navarro, C., Mateos-Timoneda, M.Á., and Engel, E. (2018). Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 129, 95-117.

Cattoir, V. (2016). Microbiotes humains. In *Bactériologie Médicale, techniques usuelles*, (Elsevier Masson), p. 600.

Cavaillon, J.-M. (2010). La réponse immunitaire à l'agression: le B.A.-BA — Système immunitaire inné. *Réanimation* 20, 393–405.

Choi, E.-J., Lee, H.G., Bae, I.-H., Kim, W., Park, J., Lee, T.R., and Cho, E.-G. (2018). *Propionibacterium acnes*-Derived Extracellular Vesicles Promote Acne-Like Phenotypes in Human Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 138, 1371-1379.

Choi, J.-Y., Piao, M.S., Lee, J.-B., Oh, J.S., Kim, I.-G., and Lee, S.-C. (2008). *Propionibacterium acnes* stimulates pro-matrix metalloproteinase-2 expression through tumor necrosis factor-alpha in human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 128, 846–854.

Christensen, G.J.M., Scholz, C.F.P., Enghild, J., Rohde, H., Kilian, M., Thürmer, A., Brzuszkiewicz, E., Lomholt, H.B., and Brüggemann, H. (2016). Antagonism between *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and its genomic basis. *BMC Genomics* 17, 152.

Chronnell, C.M., Ghali, L.R., Ali, R.S., Quinn, A.G., Holland, D.B., Bull, J.J., Cunliffe, W.J., McKay, I.A., Philpott, M.P., and Müller-Röver, S. (2001). Human beta defensin-1 and -2 expression in human pilosebaceous units: upregulation in *acne vulgaris* lesions. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1120–1125.

Clausen, M.-L., Slotved, H.-C., Krogfelt, K.A., and Agner, T. (2018). Measurements of AMPs in stratum corneum of atopic dermatitis and healthy skin-tape stripping technique. *Sci. Rep.* 8, 1666.

Coakley, G., Maizels, R.M., and Buck, A.H. (2015). Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends Parasitol.* 31, 477–489.

- Coenye, T., Peeters, E., and Nelis, H.J. (2007). Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res. Microbiol.* *158*, 386–392.
- Cummins, C.S., and Johnson, J.L. (1974). *Corynebacterium parvum*: a synonym for *Propionibacterium acnes*? *J. Gen. Microbiol.* *80*, 433–442.
- Dagnelie, M.-A., Corvec, S., Saint-Jean, M., Bourdès, V., Nguyen, J.-M., Khammari, A., and Dréno, B. (2018a). Decrease in Diversity of *Propionibacterium acnes* Phylotypes in Patients with Severe Acne on the Back. *Acta Derm. Venereol.* *98*, 262–267.
- Dagnelie, M.-A., Khammari, A., Dréno, B., and Corvec, S. (2018b). *Cutibacterium acnes* molecular typing: time to standardize the method. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* S1198-743X(18)30216-7.
- Dajnoki, Z., Béke, G., Kapitány, A., Mócsai, G., Gáspár, K., Rühl, R., Hendrik, Z., Juhász, I., Zouboulis, C.C., Bácsi, A., et al. (2017). Sebaceous Gland-Rich Skin Is Characterized by TSLP Expression and Distinct Immune Surveillance Which Is Disturbed in Rosacea. *J. Invest. Dermatol.* *137*, 1114–1125.
- Dekio, I., Culak, R., Misra, R., Gaulton, T., Fang, M., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Oshima, K., Hattori, M., Klenk, H.-P., et al. (2015). Dissecting the taxonomic heterogeneity within *Propionibacterium acnes*: proposal for *Propionibacterium acnes* subsp. *acnes* subsp. nov. and *Propionibacterium acnes* subsp. *elongatum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *65*, 4776–4787.
- Dolcino, M., Cozzani, E., Riva, S., Parodi, A., Tinazzi, E., Lunardi, C., and Puccetti, A. (2012). Gene expression profiling in dermatitis herpetiformis skin lesions. *Clin. Dev. Immunol.* *2012*, 198956.
- Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., and Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11971–11975.
- Douglas, H.C., and Gunter, S.E. (1946). The Taxonomic Position of *Corynebacterium acnes*. *J. Bacteriol.* *52*, 15–23.
- Dréno, B., Bodokh, I., Chivot, M., Daniel, F., Humbert, P., Poli, F., Clerson, P., and Berrou, J.P. (1999). [ECLA grading: a system of acne classification for every day dermatological practice]. *Ann. Dermatol. Venereol.* *126*, 136–141.
- Dréno, B., Poli, F., Pawin, H., Beylot, C., Faure, M., Chivot, M., Auffret, N., Moysse, D., Ballanger, F., and Revuz, J. (2011). Development and evaluation of a Global Acne Severity Scale (GEA Scale) suitable for France and Europe. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* *25*, 43–48.
- Dréno, B., Gollnick, H.P.M., Kang, S., Thiboutot, D., Bettoli, V., Torres, V., Leyden, J., and Global Alliance to Improve Outcomes in Acne (2015). Understanding innate immunity and inflammation in acne: implications for management. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* *29 Suppl 4*, 3–11.
- Dréno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Gontijo, G., Sanchez Viera, M., Xiang, L.F., Martin, R., and Bieber, T. (2016a). Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV.* *30*, 2038-2047.
- Dréno, B., Lambert, J., and Bettoli, V. (2016b). Are retinoid/antibiotic fixed-dose combination acne treatments associated with antibiotic resistance? *Eur. J. Dermatol. EJD* *26*, 90–91.

- Egert, M., Simmering, R., and Riedel, C.U. (2017). The Association of the Skin Microbiota With Health, Immunity, and Disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* doi: 10.1002/cpt.698.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Traidl-Hoffmann, C., and Biedermann, T. (2018). Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends Immunol.* 39, 315–327.
- Eyraud, A., Milpied, B., Thiolat, D., Darrigade, A.-S., Boniface, K., Taïeb, A., and Seneschal, J. (2018). Inflammasome Activation Characterizes Lesional Skin of Folliculitis Decalvans. *Acta Derm. Venereol.* 98, 570–575.
- Fabbrocini, G., Annunziata, M.C., D’Arco, V., De Vita, V., Lodi, G., Mauriello, M.C., Pastore, F., and Monfrecola, G. (2010). Acne Scars: Pathogenesis, Classification and Treatment. *Dermatol. Res. Pract.* 2010, 893080.
- Falcochio, S., Ruiz, C., Pastor, F.I.J., Saso, L., and Diaz, P. (2006). *Propionibacterium acnes* GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 40, 132–137.
- Fan, Y., Hao, F., Wang, W., Lu, Y., He, L., Wang, G., and Chen, W. (2015). Multicenter cross-sectional observational study of antibiotic resistance and the genotypes of *Propionibacterium acnes* isolated from Chinese patients with *acne vulgaris*. *J. Dermatol.* 43, 406-413.
- Fernández, L., and Hancock, R.E.W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 661–681.
- Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B.-H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfé, M.C., Loncaric, A., Kim, J., et al. (2013). *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J. Invest. Dermatol.* 133, 2152–2160.
- Francuzik, W., Franke, K., Schumann, R.R., Heine, G., and Worm, M. (2018). *Propionibacterium acnes* Abundance Correlates Inversely with *Staphylococcus aureus*: Data from Atopic Dermatitis Skin Microbiome. *Acta Derm. Venereol.* 98, 490-495.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195–4200.
- Frenard, C., Dagnelie, M.-A., Khammari, A., Saint-Jean, M., Boisrobert, A., Corvec, S., and Dréno, B. (2018). Do *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* define two different types of folliculitis? *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV.* 32, e266-e268.
- Gariboldi, S., Palazzo, M., Zanobbio, L., Selleri, S., Sommariva, M., Sfondrini, L., Cavicchini, S., Balsari, A., and Rumio, C. (2008). Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 2103–2110.
- Gilchrist, T. (1900). A bacteriological and microscopical study of over three hundred vesicular and pustular lesions of the skin, with a research upon the etiology of *Acne vulgaris*. *Johns Hopkins Hospital Report* 409–430.
- Gloor, M., Wasik, B., Becker, A., and Höffler, U. (2002). Inhibition of lipase activity in antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* strains. *Dermatol. Basel Switz.* 205, 260–264.
- Gollnick, H. p. m., and Dréno, B. (2015). Pathophysiology and management of acne. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 29, 1–2.

- Gollnick, H., Cunliffe, W., Berson, D., Dréno, B., Finlay, A., Leyden, J.J., Shalita, A.R., Thiboutot, D., and Global Alliance to Improve Outcomes in Acne (2003). Management of acne: a report from a Global Alliance to Improve Outcomes in Acne. *J. Am. Acad. Dermatol.* 49, S1-37.
- Goulden, V., McGeown, C.H., and Cunliffe, W.J. (1999). The familial risk of adult acne: a comparison between first-degree relatives of affected and unaffected individuals. *Br. J. Dermatol.* 141, 297–300.
- Grange, P.A., Raingeaud, J., Morelle, W., Marcelin, A.-G., Calvez, V., and Dupin, N. (2017). Characterization of a *Propionibacterium acnes* Surface Protein as a Fibrinogen-Binding Protein. *Sci. Rep.* 7, 6428.
- Grice, E.A., Kong, H.H., Renaud, G., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Wolfsberg, T.G., Turner, M.L., and Segre, J.A. (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res.* 18, 1043–1050.
- Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., et al. (2009). Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science* 324, 1190–1192.
- Gröne, A. (2002). Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 1–12.
- Guy, R., Green, M.R., and Kealey, T. (1996). Modeling acne *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* 106, 176–182.
- Holland, C., Mak, T.N., Zimny-Arndt, U., Schmid, M., Meyer, T.F., Jungblut, P.R., and Brüggemann, H. (2010). Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*. *BMC Microbiol.* 10, 230.
- Isard, O. (2010). Etude des effets modulateurs de *Propionibacterium acnes* sur l'expression kératinocytaire d'hormones cutanées - Evaluation *in vitro* de l'efficacité d'une molécule thérapeutique à visée anti-acnéique.
- Isard, O., Knol, A.-C., Castex-Rizzi, N., Khammari, A., Charveron, M., and Dréno, B. (2009). Cutaneous induction of corticotropin releasing hormone by *Propionibacterium acnes* extracts. *Dermatoendocrinol.* 1, 96–99.
- Jahns, A.C., Oprica, C., Vassilaki, I., Golovleva, I., Palmer, R.H., and Alexeyev, O.A. (2013). Simultaneous visualization of *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum* with immunofluorescence and fluorescence *in situ* hybridization. *Anaerobe* 23, 48–54.
- Jan, A.T. (2017). Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Front. Microbiol.* 8, 1053.
- Jarrousse, V., Castex-Rizzi, N., Khammari, A., Charveron, M., and Dréno, B. (2007). Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 299, 441–447.
- Jasson, F., Nagy, I., Knol, A.C., Zuliani, T., Khammari, A., and Dréno, B. (2013). Different strains of *Propionibacterium acnes* modulate differently the cutaneous innate immunity. *Exp. Dermatol.* 22, 587–592.

- Jeon, J., Mok, H.J., Choi, Y., Park, S.C., Jo, H., Her, J., Han, J.-K., Kim, Y.-K., Kim, K.P., and Ban, C. (2017). Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Propionibacterium acnes*. *Proteomics Clin. Appl.* *11*, 1600040.
- Jochmann, A., Hower, S., Davis, S., Izakovic, J., and Plano, L.R. (2013). Correlation of Twenty Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* with Severity of Atopic Dermatitis in Children as Compared to Healthy Individuals. *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* *4*, 1–6.
- Jugeau, S., Tenaud, I., Knol, A.C., Jarrousse, V., Quereux, G., Khammari, A., and Dréno, B. (2005). Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br. J. Dermatol.* *153*, 1105–1113.
- Jun, S.H., Lee, J.H., Kim, S.I., Choi, C.W., Park, T.I., Jung, H.R., Cho, J.W., Kim, S.H., and Lee, J.C. (2017). *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles exacerbate skin inflammation in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *47*, 85–96.
- Kalis, C., Gumenscheimer, M., Freudenberg, N., Tchaptchet, S., Fejer, G., Heit, A., Akira, S., Galanos, C., and Freudenberg, M.A. (2005). Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* *174*, 4295–4300.
- Kaparakis-Liaskos, M., and Ferrero, R.L. (2015). Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 375–387.
- Kilian, M., Scholz, C., and Lomholt, H.B. (2011). Multilocus Sequence Typing (MLST) and Phylogenetic Analysis of *Propionibacterium acnes*. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 1158-1165.
- Kim, Y.J., Lee, D.Y., Lee, J.Y., and Yoon, T.Y. (2012). Progressive macular hypomelanosis showing excellent response to oral isotretinoin. *J. Dermatol.* *39*, 937–938.
- Kong, H.H. (2011). Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. *Trends Mol. Med.* *17*, 320–328.
- de Koning, H.D., Rodijk-Olthuis, D., van Vlijmen-Willems, I.M.J.J., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Schalkwijk, J., and Zeeuwen, P.L.J.M. (2010). A comprehensive analysis of pattern recognition receptors in normal and inflamed human epidermis: upregulation of dectin-1 in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 2611–2620.
- Koreck, A., Pivarsci, A., Dobozy, A., and Kemény, L. (2003). The role of innate immunity in the pathogenesis of acne. *Dermatol. Basel Switz.* *206*, 96–105.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int. Rev. Immunol.* *30*, 16–34.
- Langan, E.A., Griffiths, C.E.M., Solbach, W., Knobloch, J.K., Zillikens, D., and Thaçi, D. (2017). The role of the microbiome in psoriasis: moving from disease description to treatment selection? *Br. J. Dermatol.* *178*, 1020-1027.
- Le Moigne, M., Fournier, J.-P., Bulteau, S., Grall-Bronnec, M., Khammari, A., Victorri-Vigneau, C., and Dréno, B. (2017). Psychiatric disorders with systemic retinoids: a systematic review of case reports. *Br. J. Dermatol.* *178*, 278-280.
- Lee, J.W., Kang, Y.J., Choi, H.K., and Yoon, Y.G. (2018). Fractionated *Coptischinensis* extract and its bioactive component suppress *Propionibacterium acnes*-stimulated inflammation in human keratinocytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* *28*, 839-848.

- Lee, W.L., Shalita, A.R., Suntharalingam, K., and Fikrig, S.M. (1982). Neutrophil chemotaxis by *Propionibacterium acnes* lipase and its inhibition. *Infect. Immun.* 35, 71–78.
- Leung, M.H.Y., Wilkins, D., and Lee, P.K.H. (2015). Insights into the pan-microbiome: skin microbial communities of Chinese individuals differ from other racial groups. *Sci. Rep.* 5, 11845.
- Lheure, C., Grange, P.A., Ollagnier, G., Morand, P., Désiré, N., Sayon, S., Corvec, S., Raingeaud, J., Marcelin, A.-G., Calvez, V., et al. (2016). TLR-2 Recognizes *Propionibacterium acnes* CAMP Factor 1 from Highly Inflammatory Strains. *PLoS One* 11, e0167237.
- Lomholt, H.B., and Kilian, M. (2010). Population Genetic Analysis of *Propionibacterium acnes* Identifies a Subpopulation and Epidemic Clones Associated with Acne. *PLoS ONE* 5. e12277.
- Lomholt, H.B., and Kilian, M. (2014). Clonality and anatomic distribution on the skin of antibiotic resistant and sensitive *Propionibacterium acnes*. *Acta Derm. Venereol.* 94, 534–538.
- Lomholt, H.B., Scholz, C.F.P., Brüggemann, H., Tettelin, H., and Kilian, M. (2017). A comparative study of *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* clones from acne patients and healthy controls. *Anaerobe* 47, 57–63.
- Magin, P., Pond, D., and Smith, W. (2005). Isotretinoin, depression and suicide: a review of the evidence. *Br. J. Gen. Pract.* 55, 134–138.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., et al. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3140–3145.
- Mak, T.N., Yu, S.-H., De Marzo, A.M., Brüggemann, H., and Sfanos, K.S. (2013). Multilocus Sequence Typing (MLST) Analysis of *Propionibacterium acnes* Isolates From Radical Prostatectomy Specimens. *The Prostate* 73, 770–777.
- Malvasi, A., Tinelli, A., Buia, A., and De Luca, G.F. (2009). Possible long-term teratogenic effect of isotretinoin in pregnancy. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 13, 393–396.
- Marchesi, J.R., and Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 3, 31.
- Matard, B., Meylheuc, T., Briandet, R., Casin, I., Assouly, P., Cavelier-balloy, B., and Reygagne, P. (2013). First evidence of bacterial biofilms in the anaerobe part of scalp hair follicles: a pilot comparative study in folliculitis decalvans. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 27, 853–860.
- McDonald, D., Hyde, E., Debelius, J.W., Morton, J.T., Gonzalez, A., Ackermann, G., Aksenov, A.A., Behsaz, B., Brennan, C., Chen, Y., et al. (2018). American Gut: an Open Platform for Citizen Science Microbiome Research. *mSystems* 3, e00031-18.
- McDowell, A., Valanne, S., Ramage, G., Tunney, M.M., Glenn, J.V., McLorinan, G.C., Bhatia, A., Maisonneuve, J.-F., Lodes, M., Persing, D.H., et al. (2005). *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. *J. Clin. Microbiol.* 43, 326–334.
- McDowell, A., Perry, A.L., Lambert, P.A., and Patrick, S. (2008). A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. *J. Med. Microbiol.* 57, 218–224.

- McDowell, A., Gao, A., Barnard, E., Fink, C., Murray, P.I., Dowson, C.G., Nagy, I., Lambert, P.A., and Patrick, S. (2011). A novel multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes* and characterization of type I cell surface-associated antigens. *Microbiol. Read. Engl.* *157*, 1990–2003.
- McDowell, A., Hunyadkürti, J., Horváth, B., Vörös, A., Barnard, E., Patrick, S., and Nagy, I. (2012a). Draft genome sequence of an antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* strain, PRP-38, from the novel type IC cluster. *J. Bacteriol.* *194*, 3260–3261.
- McDowell, A., Barnard, E., Nagy, I., Gao, A., Tomida, S., Li, H., Eady, A., Cove, J., Nord, C.E., and Patrick, S. (2012b). An Expanded Multilocus Sequence Typing Scheme for *Propionibacterium acnes*: Investigation of “Pathogenic”, “Commensal” and Antibiotic Resistant Strains. *PLoS ONE* *7*, e41480.
- McDowell, A., Nagy, I., Magyari, M., Barnard, E., and Patrick, S. (2013). The opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*: insights into typing, human disease, clonal diversification and CAMP factor evolution. *PloS One* *8*, e70897.
- McDowell, A., Barnard, E., Liu, J., Li, H., and Patrick, S. (2016). Proposal to reclassify *Propionibacterium acnes* type I as *Propionibacterium acnes* subsp. *acnes* subsp. nov. and *Propionibacterium acnes* type II as *Propionibacterium acnes* subsp. *defendens* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *66*, 5358–5365.
- McGirt, L.Y., and Beck, L.A. (2006). Innate immune defects in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *118*, 202–208.
- Melis, G.B., Piras, B., Marotto, M.F., Neri, M., Corda, V., Vallerino, V., Saba, A., Lello, S., Pilloni, M., Zedda, P., et al. (2018). The stimulation of the vaginal immune system with short-term administration of a vaginal gel containing fraction of *Propionibacterium acnes*, hyaluronic acid and polycarbophil is efficacious in vaginal infections dependent on disorders in the vaginal ecosystem. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* *34*, 1–4.
- Melnik, B.C. (2017). Apoptosis May Explain the Pharmacological Mode of Action and Adverse Effects of Isotretinoin, Including Teratogenicity. *Acta Derm. Venereol.* *97*, 173–181.
- Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Costello, A.J., and Farrell, D.J. (2012). Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Clinical Isolates from U.S. Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 4656–4661.
- Mestas, J., and Hughes, C.C.W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* *172*, 2731–2738.
- Miller, L.S. (2008). Toll-like receptors in skin. *Adv. Dermatol.* *24*, 71–87.
- Miskin, J.E., Farrell, A.M., Cunliffe, W.J., and Holland, K.T. (1997). *Propionibacterium acnes*, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by *gehA*. *Microbiol. Read. Engl.* *143 (Pt 5)*, 1745–1755.
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 240–273.
- Mottin, V.H.M., and Suyenaga, E.S. (2018). An approach on the potential use of probiotics in the treatment of skin conditions: acne and atopic dermatitis. *Int. J. Dermatol.* doi: 10.1111/ijd.13972.

- Muguet Guenet, L., Vourc'h Jourdain, M., Saint-Jean, M., Corvec, S., Gaultier, A., Khammari, A., Le Moigne, M., Boisrobert, A., Paugam, C., and Dréno, B. (2018). Confocal microscopy in adult women with acne. *Int. J. Dermatol.* *57*, 278–283.
- Nagy, I., Pivarcsi, A., Koreck, A., Széll, M., Urbán, E., and Kemény, L. (2005). Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 931–938.
- Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A., Seltsmann, H., Patrick, S., Zouboulis, C.C., and Kemény, L. (2006). *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect.* *8*, 2195–2205.
- Nakase, K., Hayashi, N., Akiyama, Y., Aoki, S., and Noguchi, N. (2017). Antimicrobial susceptibility and phylogenetic analysis of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in Japan between 2013 and 2015. *J. Dermatol.* *44*, 1248-1254.
- Nakase, K., Fukushima, H., Yukawa, T., Nakaminami, H., Fujii, T., and Noguchi, N. (2018). *Propionibacterium acnes* Has Low Susceptibility to Chlorhexidine Digluconate. *Surg. Infect.* *19*, 298–302.
- Nakatsuji, T., Chen, T.H., Butcher, A.M., Trzoss, L.L., Nam, S.-J., Shirakawa, K.T., Zhou, W., Oh, J., Otto, M., Fenical, W., et al. (2018). A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Sci. Adv.* *4*, eaao4502.
- Nazipi, S., Stødkilde-Jørgensen, K., Scavenius, C., and Brüggemann, H. (2017). The Skin Bacterium *Propionibacterium acnes* Employs Two Variants of Hyaluronate Lyase with Distinct Properties. *Microorganisms* *5*. 1-16.
- Newman, M.D., Bowe, W.P., Heughebaert, C., and Shalita, A.R. (2011). Therapeutic considerations for severe nodular acne. *Am. J. Clin. Dermatol.* *12*, 7–14.
- Nguyen, C.T., Sah, S.K., and Kim, T.-Y. (2018). Inhibitory effects of superoxide dismutase 3 on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation. *Sci. Rep.* *8*, 4024.
- Nordstrom, N.K., and Noble, W.C. (1984). Colonization of the axilla by *Propionibacterium avidum* in relation to age. *Appl. Environ. Microbiol.* *47*, 1360–1362.
- Notay, M., Foolad, N., Vaughn, A.R., and Sivamani, R.K. (2017). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics for the Treatment and Prevention of Adult Dermatological Diseases. *Am. J. Clin. Dermatol.* *18*, 721–732.
- Nutten, S. (2015). Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Ann. Nutr. Metab.* *66 Suppl 1*, 8–16.
- Ogston, A. (1880). Ueber Abscesse. *Arch. Klin. Chir.* *25*, 588.
- Ogston, A. (1882). Micrococcus poisoning. *J. Anat. Physiol.* *17*, 24–58.
- Okuda, K.-I., Nagahori, R., Yamada, S., Sugimoto, S., Sato, C., Sato, M., Iwase, T., Hashimoto, K., and Mizunoe, Y. (2018). The Composition and Structure of Biofilms Developed by *Propionibacterium acnes* Isolated from Cardiac Pacemaker Devices. *Front. Microbiol.* *9*, 182.

- Omer, H., McDowell, A., and Alexeyev, O.A. (2017). Understanding the role of *Propionibacterium acnes* in *acne vulgaris*: The critical importance of skin sampling methodologies. *Clin. Dermatol.* 35, 118–129.
- Orla-Jensen, S. (1909). Die hauptlinien der natürlichen bakteriensystems. *Zentralbl bakteriol parasitenk infektionskr Hyg Abt* 305–346.
- Otberg, N., Richter, H., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., Sterry, W., and Lademann, J. (2004). Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. *J. Invest. Dermatol.* 122, 14–19.
- Park, K.-D., Pak, S.C., and Park, K.-K. (2016). The Pathogenetic Effect of Natural and Bacterial Toxins on Atopic Dermatitis. *Toxins.* 9, doi: 10.3390/toxins9010003.
- Pasparakis, M., Haase, I., and Nestle, F.O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 289–301.
- Patra, V., Mayer, G., Gruber-Wackernagel, A., Horn, M., Lembo, S., and Wolf, P. (2018). Unique profile of antimicrobial peptide expression in polymorphic light eruption lesions compared to healthy skin, atopic dermatitis, and psoriasis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 34, 137–144.
- Paugam, C., Corvec, S., Saint-Jean, M., Le Moigne, M., Khammari, A., Boisrobert, A., Nguyen, J.M., Gaultier, A., and Dréno, B. (2017). *Propionibacterium acnes* phylotypes and acne severity: an observational prospective study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV.* 31, e398-e399.
- Pawin, H., Chivot, M., Beylot, C., Faure, M., Poli, F., Revuz, J., and Dréno, B. (2007). Living with acne. A study of adolescents' personal experiences. *Dermatol. Basel Switz.* 215, 308–314.
- Petersen, R.L.W., Scholz, C.F.P., Jensen, A., Brüggemann, H., and Lomholt, H.B. (2017). *Propionibacterium acnes* Phylogenetic Type III is Associated with Progressive Macular Hypomelanosis. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 7, 37–45.
- Peyrefitte, G. (1995). *Biologie de la Peau.*
- Rodondi, N., Darioli, R., Ramelet, A.-A., Hohl, D., Lenain, V., Perdrix, J., Wietlisbach, V., Riesen, W.F., Walther, T., Medinger, L., et al. (2002). High risk for hyperlipidemia and the metabolic syndrome after an episode of hypertriglyceridemia during 13-cis retinoic acid therapy for acne: a pharmacogenetic study. *Ann. Intern. Med.* 136, 582–589.
- Rosenbach, F. (1884). *Micro-Organismen bei den Wund-Infektionskrankheiten des Menschen.* (Wiesbaden, Germany: Bergmann JF.).
- Saint-Jean, M., Khammari, A., Jasson, F., Nguyen, J.-M., and Dréno, B. (2016). Different cutaneous innate immunity profiles in acne patients with and without atrophic scars. *Eur. J. Dermatol. EJD* 26, 68–74.
- Salava, A., Pereira, P., Aho, V., Väkevä, L., Paulin, L., Auvinen, P., Ranki, A., and Lauerma, A. (2017). Skin Microbiome in Small- and Large-plaque Parapsoriasis. *Acta Derm. Venereol.* 97, 685–691.
- SanMiguel, A., and Grice, E.A. (2015). Interactions between host factors and the skin microbiome. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 1499–1515.
- Schneider, H., Mühle, C., and Pacho, F. (2007). Biological function of laminin-5 and pathogenic impact of its deficiency. *Eur. J. Cell Biol.* 86, 701–717.

- Scholz, C.F.P., and Kilian, M. (2016). The natural history of cutaneous *propionibacteria*, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidi Propionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudo Propionibacterium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *66*, 4422–4432.
- Scholz, C.F.P., Jensen, A., Lomholt, H.B., Brüggemann, H., and Kilian, M. (2014). A novel high-resolution single locus sequence typing scheme for mixed populations of *Propionibacterium acnes* in vivo. *PLoS One* *9*, e104199.
- Schön, M.P., and Boehncke, W.-H. (2005). Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* *352*, 1899–1912.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* *164*, 337–340.
- Silverberg, J.I., and Silverberg, N.B. (2014). Epidemiology and extracutaneous comorbidities of severe acne in adolescence: a U.S. population-based study. *Br. J. Dermatol.* *170*, 1136–1142.
- Spittaels, K.-J., and Coenye, T. (2018). Developing an in vitro artificial sebum model to study *Propionibacterium acnes* biofilms. *Anaerobe* *49*, 21–29.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Cirković, I., and Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *115*, 891–899.
- Symoens, S., Syx, D., Malfait, F., Callewaert, B., De Backer, J., Vanakker, O., Coucke, P., and De Paepe, A. (2012). Comprehensive molecular analysis demonstrates type V collagen mutations in over 90% of patients with classic EDS and allows to refine diagnostic criteria. *Hum. Mutat.* *33*, 1485–1493.
- Tomi, N.S., Kränke, B., and Aberer, E. (2005). Staphylococcal toxins in patients with psoriasis, atopic dermatitis, and erythroderma, and in healthy control subjects. *J. Am. Acad. Dermatol.* *53*, 67–72.
- Trinchieri, G., and Sher, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 179–190.
- Unno, M., Cho, O., and Sugita, T. (2017). Inhibition of *Propionibacterium acnes* lipase activity by the antifungal agent ketoconazole. *Microbiol. Immunol.* *61*, 42–44.
- Urban, Z., Huchtagowder, V., Schürmann, N., Todorovic, V., Zilberberg, L., Choi, J., Sens, C., Brown, C.W., Clark, R.D., Holland, K.E., et al. (2009). Mutations in LTBP4 cause a syndrome of impaired pulmonary, gastrointestinal, genitourinary, musculoskeletal, and dermal development. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 593–605.
- Valanne, S., McDowell, A., Ramage, G., Tunney, M.M., Einarsson, G.G., O’Hagan, S., Wisdom, G.B., Fairley, D., Bhatia, A., Maisonneuve, J.-F., et al. (2005). CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 1369–1379.
- Vos, T., Flaxman, A.D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Shibuya, K., Salomon, J.A., Abdalla, S., Aboyans, V., et al. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* *380*, 2163–2196.

- Wang, Y., Hata, T.R., Tong, Y.L., Kao, M.-S., Zouboulis, C.C., Gallo, R.L., and Huang, C.-M. (2018). The anti-inflammatory activities of *Propionibacterium acnes* CAMP factor-targeted acne vaccines. *J. Invest. Dermatol.* doi: 10.1016/j.jid.2018.05.032.
- Wegner, J., Loser, K., Apsite, G., Nischt, R., Eckes, B., Krieg, T., Werner, S., and Sorokin, L. (2016). Laminin $\alpha 5$ in the keratinocyte basement membrane is required for epidermal-dermal intercommunication. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 56, 24–41.
- Welch, W. (1891). Conditions underlying the infection of wounds. *Am. J. Med. Sci.* 102, 439–465.
- Whiteside, J.A., and Voss, J.G. (1973). Incidence and lipolytic activity of *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium acnes* group I) and *P. granulosum* (*C. acnes* group II) in acne and in normal skin. *J. Invest. Dermatol.* 60, 94–97.
- Whiteside, S.A., Razvi, H., Dave, S., Reid, G., and Burton, J.P. (2015). The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat. Rev. Urol.* 12, 81–90.
- Wolff, H., Fischer, T.W., and Blume-Peytavi, U. (2016). The Diagnosis and Treatment of Hair and Scalp Diseases. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 113, 377–386.
- Wolverton, S.E., and Harper, J.C. (2013). Important controversies associated with isotretinoin therapy for acne. *Am. J. Clin. Dermatol.* 14, 71–76.
- Yamazaki, Y., Nakamura, Y., and Núñez, G. (2017). Role of the microbiota in skin immunity and atopic dermatitis. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* 66, 539–544.
- Yu, Y., Champer, J., Agak, G.W., Kao, S., Modlin, R.L., and Kim, J. (2016). Different *Propionibacterium acnes* phylotypes induce distinct immune responses and express unique surface and secreted proteomes. *J. Invest. Dermatol.* 136, 2221–2228.
- Zouboulis, C.C. (2009). *Propionibacterium acnes* and Sebaceous Lipogenesis: A Love–Hate Relationship? *J. Invest. Dermatol.* 129, 2093–2096.

Thèse de Doctorat

Marie-Ange DAGNELIE

Etude d'acquisition de connaissances sur l'acné nodulaire du dos

Knowledge acquisition study about nodular acne of the back

Résumé

L'acné est une dermatose inflammatoire multifactorielle affectant jusqu'à 85 % de la population mondiale âgée de 11 à 30 ans. *Cutibacterium acnes* est une bactérie jouant un rôle majeur dans la physiopathologie de cette maladie. Ces dernières années, le microbiote cutané et l'immunité innée ont commencé à faire leur apparition comme deux entités pouvant être impliquées dans l'acné. Ainsi, ce travail de Thèse visait à mieux comprendre l'impact du microbiote cutané et de l'immunité innée dans la physiopathologie de l'acné sévère du dos. L'étude clinique, déposée au Comité de Protection des Personnes (CPP) sous le numéro 21-15, a permis le recrutement de 24 patients atteints d'acné sévère du dos et 12 volontaires sains, sur lesquels plusieurs prélèvements ont été réalisés (protocole n°RD.03.SPR.105704 et n°ID-RCB 2015-A01139-40). Ce travail a d'abord eu pour but de faire une caractérisation moléculaire des isolats de *C. acnes* provenant des patients et des sujets sains. A l'issue de cette première partie, la prédominance importante du phylotype IA1 (CC18/A1) en contexte d'acné sévère du dos a orienté l'étude sur une nouvelle question. En effet, la Thèse a ensuite visé à décrypter l'impact de la diversité des phylotypes de *C. acnes* sur le niveau d'activation de l'immunité innée en contexte d'acné sévère. Il s'agissait de déterminer si cette perte de diversité des phylotypes observée en contexte d'acné sévère était une cause ou une conséquence de la maladie. Un système de cocultures *in vitro* entre bactéries et explants de peau humaine saine a été mis au point et l'évaluation de la réponse inflammatoire par immunohistochimie et ELISA à la suite de ces cocultures a permis de démontrer que la perte de diversité des phylotypes était une cause très probable de l'inflammation cutanée observée en contexte d'acné sévère.

En parallèle de ce travail, une caractérisation du niveau d'activation de l'immunité innée de la peau cliniquement saine de patients atteints d'acné sévère en comparaison à des sujets sains a été réalisée, en ciblant les marqueurs TGF- β , TLR-2, IL-1 β , IL-10, IL-17, et β -défensine-2. L'étude de ces marqueurs a également été réalisée dans deux types de lésions inflammatoires d'acné (papule et nodule) en comparaison à de la peau cliniquement saine. A l'issue de ce travail, nous avons mis en évidence une activation anormale du système immunitaire innée, notamment *via* la surexpression du TLR-2 et de la β -défensine-2 dans la peau des patients atteints d'acné sévère comparée aux individus sains.

Ce travail de Thèse ouvre la voie à de nouveaux paradigmes pour expliquer la physiopathologie de l'acné sévère, notamment par le déséquilibre relatif observé entre les sous-groupes de *C. acnes*, qui, de pair avec la suractivation du TLR-2 et de la β -défensine-2, expliquerait l'inflammation cutanée importante observée dans cette dermatose et l'apparition de nodules inflammatoires. Ce travail ouvre également la voie au développement de nouvelles approches thérapeutiques, basées sur les pré et pro-biotiques cutanés pour restaurer une flore microbienne équilibrée, ou encore des stratégies basées sur la modulation de l'immunité innée chez les patients souffrants d'acné sévère.

Abstract

Acne is a multifactorial inflammatory skin disease affecting up to 85% of the world's population between 11 to 30 years-old. *Cutibacterium acnes* is a bacterium that plays a major role in acne physiopathology. Recently, skin microbiota and innate immunity have begun to appear as two entities that may be involved in this skin inflammatory disease. Thus, this Thesis aimed to better understand the impact of skin microbiota and innate immunity in the physiopathology of severe back acne. The clinical study, filed with the Committee for the Protection of Persons (CPP) under the number 21-15, allowed the recruitment of 24 patients with severe back acne and 12 healthy volunteers, from whom several samples were performed (protocol n°RD.03.SPR.105704 and N°ID-RCB 2015-A01139-40). The aim of this work was first to make a molecular characterization of *C. acnes* isolates from patients and healthy subjects. At the end of this first part, the important predominance of the IA1 (CC18/A1) phylotype in the context of severe back acne guided the study to a new question. Indeed, the Thesis then aimed to decipher how far the diversity of *C. acnes* phylotypes could impact on the activation level of innate immunity in the context of severe acne. The question was whether this loss of phylotype diversity observed in the context of severe acne was a cause or consequence of the disease. To answer this new question, an *in vitro* coculture system between bacteria and healthy human skin has been developed. The evaluation of the skin inflammatory response by immunohistochemistry and ELISA after different coculture conditions showed that the loss phylotype diversity was a possible cause of cutaneous inflammation observed in acne context. In parallel with this work, a characterization of the activation level of the innate immunity of non lesional skin from severe acne patients comparing with healthy subjects was carried out, targeting the TGF- β , TLR-2, IL-1 β , IL-10, IL-17, and β -defensin-2 markers. These markers study was also performed in two types of inflammatory lesions of acne (papule and nodule) in comparison to non lesional skin. At the end of this work, we were able to demonstrate an abnormal activation of the innate immune system, notably *via* the overexpression of TLR-2 and β -defensin-2 in the skin of severe acne patients comparing with healthy individuals.

This Thesis work paves the way for new paradigms to explain severe acne physiopathology, including the relative imbalance observed between *C. acnes* subgroups, which, together with TLR-2 and β -defensin-2 overactivations, would explain the important cutaneous inflammation observed in this dermatosis and the appearance of inflammatory nodules. Besides, this work paves the way for the development of new therapeutic approaches, based on skin pre- and pro-biotics to restore a balanced microbial flora, and also for strategies based on the modulation of innate immunity in patients suffering from severe acne.

Key Words

acne, skin microbiota, innate immunity, *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes*, molecular typing, phylotypes, MLST, SLST, skin biology

Mots clés

acné sévère, microbiote cutané, immunité innée, *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes*, typage moléculaire, phylotypes, MLST, SLST, biologie cutanée