HAL
open science

Rôle de l'activité inhibitrice des propionibactéries dans la structuration des populations microbiennes

Janina Duda-Ferrand

To cite this version:

Janina Duda-Ferrand. Rôle de l'activité inhibitrice des propionibactéries dans la structuration des populations microbiennes. Ingénierie des aliments. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0253 . tel-02556063

HAL Id: tel-02556063

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02556063v1

Submitted on 14 Dec 2021

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

THESE

pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université de Lorraine

Ecole Doctorale SIReNa - Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles
Spécialité : Génie Biotechnologique et Alimentaire

Présentée et soutenue publiquement par
DUDA (épouse FERRAND) Janina
le 5 décembre 2019

ROLE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES PROPIONIBACTERIES DANS LA STRUCTURATION DES POPULATIONS MICROBIENNES

Directrice de thèse **: Anne-Marie Revol-Junelles**
Co-directeurs de la thèse **: Alain Lozniewski, Frédéric Borges**

Membres du jury

Mme Florence Mathieu, Professeur, LGC UMR 5503, Toulouse-INP/ENSAT	Rapporteur
Mr Benoît Foligné, Professeur Faculté de Pharmacie, Lille	Rapporteur
Mme Anne-Marie Revol-Junelles, Professeur, LIBio, Université de Lorraine	Directrice de thèse
Mr Gwénaël JAN, Directeur de Recherche, UMR 1253 STLO, Rennes	Examinateur
Mme Séverine Zirah, Maitre de conférences, UMR 7245 CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris	Examinateur
Mr Fredéric Borges, Maitre de conférences LIBio, Université de Lorraine	Examinateur
Mr Alain Lozniewski, Professeur - Praticien Hospitalier SIMPA, Université de Lorraine- CHRU, Nancy	Invité

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio). La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je remercie tout d'abord les membres du jury, Madame Florence MATHIEU, Professeur à l'ENSAT de Toulouse et Monsieur Benoit FOLLIGNE, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Lille, rapporteurs de cette thèse, Madame Séverine ZIRAH, Maitre de conférences au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris et Monsieur Gwénaël JAN, Directeur de Recherche au STLO de Rennes, examinateurs de ces travaux de thèse, pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime ensuite toute ma reconnaissance à mes encadrants, Madame Anne-Marie REVOL-JUNELLES, Directrice de thèse, Monsieur Fréderic BORGES, Co-directeur de thèse et Monsieur Alain LOZNIEWSKI, Co-directeur de thèse pour avoir accepté de diriger ce travail. Merci tout d'abord d'avoir accepté de me soutenir dans cette démarche, qui n'a pas été des plus faciles. Merci pour votre aide scientifique, pour votre soutien et votre confiance infaillible en ce projet. Merci à Madame Cécile MAGNAVEL, Ingénieur de recherche au LiBio d'avoir grandement participé à ces travaux.

Je tiens à remercier également tout le personnel du LIBio, enseignants-chercheurs, doctorants, techniciens et stagiaires. C'était un grand plaisir de vous connaitre. Un grand merci à toutes les personnes intervenant en microbiologie, pour leur soutien et leur bonne humeur.

Résumé

En prenant comme modèle d'étude les espèces de propionibactéries laitières (*Propionibacterium* spp., *Acidipropionibacterium* spp.) et cutanées (*Cutibacterium* spp.), proches phylogénétiquement mais présentes dans des habitats très différents, nous avons étudié l'influence du type d'habitat sur la fréquence et la spécificité des comportements de type compétitif, par deux approches complémentaires, phénotypique et génomique. La fréquence des interactions de compétition, l'intensité et le spectre des activités inhibitrices des propionibactéries était significativement différente selon le type d'habitat et était directement liée au genre bactérien considéré : 25 % des souches de *Cutibacterium* et 22,5 % des souches d'*Acidipropionibacterium* sp. inhibaient au moins une souche cible, alors que les souches de *Propionibacterium* sp. ne présentaient aucune activité inhibitrice. L'activité inhibitrice était non spécifique pour les souches de *C. acnes* et spécifique pour les souches d'*Acidipropionibacterium* sp. En accord avec les données phénotypiques, aucun cluster de gènes de métabolites spécialisés n'a été détecté dans les 34 génomes de *Propionibacterium freudenreichii*, alors qu'ils étaitent présents dans la majorité de souches de *Cutibacterium* sp. et dans quelques souches d'*Acidipropionibacterium* sp. L'exemple de *P. freudenreichii* suggère que les habitats très sélectifs, avec un stress abiotique important tel que celui des fromages à pâte pressée cuite, privilégient les espèces très résistantes mais non antagonistes, puisque le nombre de concurrents potentiels dans ces conditions est très limité. *Acidipropionibacterium* sp. et *a fortiori Cutibacterium* sp., sont caractéristiques d'habitats mois sélectifs, avec une grande diversité bactérienne, et présentent une forte proportion de souches à activité inhibitrice. Au sein des génomes de *Cutibacterium* sp., une grande diversité de clusters codant des composés antimicrobiens (NRPS, bactériocines) est détectée, ce qui donne un avantage compétitif face à un panel de concurrents diversifié.

Lors du criblage phénotypique, une activité inhibitrice importante d'une souche laitière d'*Acidipropionibacterium* vis-à-vis d'une souche de *Streptococcus pyogenes* a été détectée. La substance antibactérienne détectée dans le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 présente une masse moléculaire apparente de moins de 3,5 kDa. Elle est résistante à la protéolyse, à la température et aux variations de pH. Plusieurs clusters de gènes d'antimicrobiens, dont un lasso peptide qui pourrait être responsable de l'activité anti-streptococcique, sont présents dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, Les propriétés de la substance pourraient être intéressantes pour son utilisation dans l'éradication de portage de *S. pyogenes* diminuant ainsi son réservoir et la probabilité d'infections récurrentes.

Mots-clés : propionibactéries, *Cutibacterium acnes*, habitat, antagonisme, bactériocines, *Streptococcus pyogenes*

Summary

To study the influence of habitat on the frequency and the specificity of bacterial competition, we examined a model of phylogenetically close species of propionibacteria living in two very different habitats: dairy propionibacteria (*Propionibacterium* spp., *Acidipropionibacterium* spp.) and cutaneous propionibacteria (*Cutibacterium* spp.). The frequency of competition was studied by complementary, phenotypic and genotypic approaches. The frequency of antagonisms was significantly different depending on the type of habitat and was directly influenced by bacterial genus. Indeed, 25 % of *Cutibacterium* strains and 22.5 % of *Acidipropionibacterium* strains inhibited at least one target strain, whereas *Propionibacterium* sp. were completely devoid of inhibitory activity. In accordance with phenotypic findings, no antagonistic metabolite biosynthetic gene cluster were found in 34 genomes of *Propionibacterium freudenreichii,* whereas the majority of *Cutibacterium* sp. and some *Acidipropionibacterium* sp. genomes contained at least one antagonistic gene cluster. The exemple of *P. freudenreichii* suggests that very selective habitats, with a high number of abiotic stress, like swiss-type cheeses, favours very resistant but not antagonistic species, as the number of potential concurrents is very limited in these conditions. On the contrary, *Acidipropionibacterium* sp. and *a fortiori Cutibacterium* sp. are characteristic of less selective habitats, with high bacterial diversity, and they present a high proportion of antagonistic strains. *Cutibacterium* sp. genomes contain a high diversity of antimicrobial components gene clusters (NRPS, bacteriocins) which may give them a competitive advantage to face a diversified panel of concurrents.

During phenotypic screenging, we detected an important inhibitory activity of one strain of dairy *Acidipropionibacterium* against a pathogenic strain of *Streptococcus pyogenes.* The antibacterial substance detected in *Acidipropionibacterium jensenii* CIRM-BIA 1785 culture supernatant had an apparent molecular weight of less than 3.5 kDa. It was resistant to proteolysis, to temperature and to pH variations. In the genome of *A. jensenii* CIRM-BIA 1785, we detected several clusters of antimicrobial metabolite genes, including a lasso peptide which could potentially be responsible for anti-streptococcal activity. The characteristics of the substance make it a good candidate for therapeutic use in eradication of *S. pyogenes* carriage with the aim of reducing its reservoir and the probability of recurrent infections.

Keywords : propionibacteria, *Cutibacterium acnes*, habitat, antagonism, bacteriocins, *Streptococcus pyogenes*

Table des matières

Remerciements

Résumé

Summary

Table des matières

Liste des abréviations

Introduction 1

1 Revue bibliographique 3

1.1 Compétition bactérienne 3

1.1.1 Quelques définitions 3

1.1.2 Types de compétition 4

1.1.2.1 Compétition par exploitation 5

1.1.2.2 Compétition par interference 8

1.1.2.2.1 Compromis entre exploitation et interférence 8

1.1.2.2.2 Cannibalisme et fratricide 8

1.1.2.3 Parasitisme et prédation 10

1.1.2.3.1 Parasitisme 10

1.1.2.3.2 Prédation 10

1.1.3 Molécules à activité antibactérienne 13

1.1.3.1 Définitions 13

1.1.3.2 Peptides de synthèse ribosomale avec modifications post-traductionnelles 14

1.1.3.2.1 Définition 14

1.1.3.2.2 Classification et mécanismes d'action 15

1.1.3.3 Polycétides et peptides non ribosomaux 17

1.1.3.3.1 Définition 17

1.1.3.3.2 PKS 18

1.1.3.3.3 NRPS 19

1.1.3.4 Terpènes 24

1.1.3.5 Détection bio-informatique des clusters de gènes de métabolites spécialisées 24

1.1.4 Rôle écologique de molécules antimicrobiennes 26

1.1.4.1 Comportement social des microorganismes 26

1.1.4.1.1 Le problème de la coopération 28

1.1.4.1.2 La production d'antimicrobiens comme comportement social 30

1.1.4.2 Production de molécules antagonistes et théories des jeux 31

1.1.4.3 Quel habitat sélectionne les comportements antagonistes ? 38
1.1.4.3.1 Culture continue *versus* culture en batch : le modèle de prédation intraguilde 38
1.1.4.3.2 Habitat sélectif versus habitat peu sélectif 41
1.2 Bactéries propioniques comme source potentielle de molécules antagonistes 41
1.2.1 Taxonomie des « propionibactéries » 42
1.2.2 Propionibactéries « cutanées » 44
1.2.2.1 Habitat 45
1.2.2.2 Caractéristiques physiologiques 47
1.2.2.2.1 Caractéristiques générales 47
1.2.2.2.2 Adaptations à la colonisation de l'habitat cutané 48
1.2.2.2.3 Rôle pathogène de *Cutibacterium acnes* 52
1.2.3 Propionibactéries « laitières » 53
1.2.3.1 Habitat 55
1.2.3.2 Caractéristiques physiologiques 57
1.2.3.2.1 Caractéristiques générales 57
1.2.3.2.2 Adaptations à la colonisation des habitats naturels 58
1.2.3.2.3 Activités immunomodulatrices et anti-cancéreuses 66
1.2.3.2.4 Potentiel pathogène 66
1.3 Rôle des antagonismes bactériens dans l'équilibre du microbiote cutané 68
1.3.1 La structure de l'épiderme façonne la flore cutanée 68
1.3.2 Définition et composition du microbiote cutané à l'état d'équilibre 70
1.3.3 Déséquilibre du microbiote cutané et pathologies 72
1.3.3.1 *Acne vulgaris* 74
1.3.3.2 Infections liées à la rupture de la barrière cutanée 77
1.3.3.2.1 Infections nosocomiales liées aux dispositifs médicaux 78
1.3.3.2.2 Infections des plaies chroniques du patient diabétique 79
1.3.3.3 Infections liées à *Streptoccoccus* sp. 80
1.3.3.3.1 Streptococcus pyogenes 80
1.3.3.3.2 Streptococcus agalactiae 82
1.3.4 Rôle des microorganismes commensaux dans le maintien de l'équilibre du microbiote cutané 83
1.3.4.1 Le rôle barrière des microorganismes commensaux : une « compétition saine » avec les microorganismes pathogènes 83
1.3.4.2 Pistes thérapeutiques alternatives à l'antibiothérapie : probiotiques, bactériocines… 84
Objectifs des travaux de thèse 89
2 Résultats et discussion 91

2.1 Activité antagoniste des propionibactéries et rôle écologique 91
2.1.1 Contexte 91
2.1.2 Objectifs..... 93
2.1.3 Méthodes 93
2.1.3.1 Souches bactériennes..... 93
2.1.3.2 Milieux et conditions de culture..... 96
2.1.3.3 Tests d'inhibitions par la méthode de contact (double couche d'agar)..... 96
2.1.3.4 Analyse statistique des résultats des criblages d'antagonismes..... 96
2.1.3.5 Détection bio-informatique des gènes candidats codant des antimicrobiens putatifs dans les génomes de propionibactéries..... 97
2.1.4 Résultats 97
2.1.4.1 Cartographie des antagonismes des propionibactéries vis-à-vis des souches cibles 97
2.1.4.1.1 Proportion d'interactions inhibitrices dans les différents groupes de propionibactéries cliniques ou alimentaires 98
2.1.4.1.2 Spectre d'activité des propionibactéries..... 101
2.1.4.1.3 Relation entre statut-nature des souches et activité inhibitrice..... 106
2.1.4.2 Analyse des clusters de gènes des métabolites spécialisés dans les génomes des propionibactéries 107
2.1.4.2.1 Clusters de gènes des NRPS 110
2.1.4.2.2 Clusters de gènes des PKS 113
2.1.4.2.3 Clusters de gènes des bactériocines 116
2.1.5 Conclusions..... 122
2.1.6 Discussion 124
2.2 Conclusions : relation habitat / comportement antagoniste 128
2.3 Activité anti-*Streptococcus pyogenes* d'*Acidipropionibacterium jensenii* CIRM-BIA 1785 131
2.3.1 Contexte 131
2.3.2 Objectifs..... 133
2.3.3 Méthodes 134
2.3.3.1 Souches bactériennes..... 134
2.3.3.2 Tests d'activité : méthode de diffusion des surnageants de culture en milieu gélosé 135
2.3.3.3 Tests de stabilité de l'activité antibactérienne du surnageant 135
2.3.3.4 Purification partielle du composé antimicrobien..... 136
2.3.3.5 Protocole de purification des lasso peptides 136
2.3.3.6 Détection de clusters de gènes des métabolites spécialisés..... 137
2.3.4 Résultats 138
2.3.4.1 Activité antibactérienne d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 138

2.3.4.2 Caractérisation des propriétés du surnageant d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 139
2.3.4.3 Purification partielle du composé inhibiteur produit par *A. jensenii* CIRM-BIA 1785... 142
2.3.4.4 Purfication spécifique au lasso peptide..... 143
2.3.4.5 Conclusions : propriétés biologiques et physico-chimiques du composé antibactérien 144
2.3.4.6 Clusters de gènes de métabolites spécialisés présents dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785..... 144
2.3.4.6.1 Le cluster de gènes d'un lasso peptide 145
2.3.4.6.2 Les clusters de la polycétide synthase (PKS) et de la synthase de peptides non ribosomaux (NRPS)..... 148
2.3.4.7 Conclusions : candidats potentiels suite à l'analyse des clusters de gènes de métabolites spécialisés présents dans le génome 158
2.3.5 Discussion 159
2.3.6 Conclusion 162
3 Conclusions et perspectives 163
Références..... 167
Annexes 184
Annexe 1.1 – 1 Souches de propionibactéries laitières utilisées pour le criblage 184
Annexe 1.1 – 2 Souches de propionibactéries cutanées utilisées pour le criblage 186
Annexe 1.1 – 3 Souches cibles laitières utilisées dans le criblage et conditions de culture 189
Annexe 1.1 – 4 Souches cibles cliniques utilisées dans le criblage et conditions de culture..... 191
Annexe 1.2 – 1 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de *C. acnes* 192
Annexe 1.2 – 2 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de *Cutibacterium* sp. (autres que C. *acnes*) 196
Annexe 1.2 – 3 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de propionibactéries cutanées non classifiées 197
Annexe 1.2 – 4 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de *Propionibacterium* sp. 198
Annexe 1.2 – 5 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de Pseudop*ropionibacterium* sp. 200
Annexe 1.2 – 6 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein d' *Acidipropionibacterium* sp. 201
Annexe 1.2 – 7 Représentation détaillée du cluster de gènes de NRPS au sein de *Cutibacterium* sp. 202
Annexe 1.2 – 8 Représentation détaillée des clusters de gènes de NRPS au sein de *Propionibacterium* sp. 203

Annexe 1.2 – 9 Représentation détaillée d'un fragment de cluster de gènes de NRPS au sein du génome de *Propionibacterium acidifaciens* 204

..... 204

Annexe 1.2 – 10 Représentation détaillée de clusters de gènes de NRPS au sein de *Pseudopropionibacterium* sp. 205

Annexe 1.2 – 11 Représentation détaillée des clusters de gènes de PKS au sein de *Propionibacterium* sp. 206

Annexe 1.2 – 12 Représentation détaillée des clusters de gènes de PKS au sein de *Pseudopropionibacterium* sp. 207

Annexe 1.2 – 13 Représentation détaillée des clusters de gènes de bactériocine non modifée au sein de *Cutibacterium* sp. 208

Annexe 1.2 – 14 Représentation détaillée du cluster de gènes de LAP au sein de *Cutibacterium* sp. 209

Annexe 1.2 – 15 Représentation détaillée des clusters de gènes de lanthipeptide au sein de *Cutibacterium* sp. 210

Annexe 1.2 – 16 Représentation détaillée des clusters de gènes de thiopeptides au sein de propionibactéries 211

Annexe 1.2 – 17 Représentation détaillée du cluster de gènes de peptide circulaire tête-queue au sein de propionibactéries cutanées 212

Annexe 1.2 – 18 Représentation détaillée du cluster de gènes d'un lasso peptide 213

Annexe 1.2 – 19 Représentation détaillée du cluster de gènes d'un sactipeptide 214

Liste des abréviations

°C degré Celsius

µL microlitre

µM micromole

A domaine d'adénylation

aa acides aminés

ADN acide désoxyribonucléique

ARN acide ribonucléique

AT acyl transferase

ATP adénosine triphosphate

BALOs *Bdellovirbio-like organisms*.

bp (pb) base pair (paires des bases)

CC complexe clonal

CDS coding DNA sequence

CGMS clusters de gènes de métabolites spécialisés

CIRM-BIA Centre International de Ressources Microbiennes – Bactéries d'Intérêt Alimentaire

Da dalton

GC Guanine et Cytosine

GRAS generally recognized as safe

Hb hémoglobine

HGT (THG) transfert horizontal des gênes

IL interleukine

LAB Lactic Acid Bacteria (bactéries lactiques)

LBN Laboratoire de bactériologie de Nancy

MLST Multi Locus Sequence Typing

ng nanogramme

NH_3 ammoniac

NRPS Non Ribosomal Peptide Synthase

ORF Open reading frame

PAB propionic acid bacteria (propionibactéries)

PCR Polymerase Chain Reaction

PCP peptidyl carrier protein

PKS Polyketide synthase

QPS Qualified presumption of safety

RiPP ribosomally synthetized and post-translationally modified peptide

sec seconde

SGA streptocoque du groupe A

SLST Single Locus Sequence Typing

SP Signal Peptide

TLR toll-like receptor

$UFC.cm^{-2}$ Unités formant les colonies par centimètre carré

Introduction

Le projet scientifique du LIBio est axé sur la compréhension de l'ensemble des phénomènes intervenant dans la structuration de la matière molle, afin de concevoir de façon rationnelle des architectures complexes, à fonctionnalités ciblées et/ou adaptées à la vectorisation de différents composés actifs. La prise en compte de la composante biotique (bactéries, cellules eucaryotes) permet de prendre en compte l'influence des systèmes biologiques dans la structuration de ces architectures complexes.

Un des deux volets du projet scientifique du LIBio est axé sur la conception rationnelle de matrices alimentaires. Ce volet a comme objectif de décrypter l'impact du procédé, des composantes abiotiques et biotiques sur la stabilité, les propriétés fonctionnelles, la structuration physico-chimique et biologique de systèmes alimentaires. En effet, les interactions abiotiques entre la surface de la matrice, l'environnement et les procédés, influeront sur la structuration et la fonctionnalité des systèmes alimentaires. Les interactions, notamment adhésives, entre cette matrice et la composante biotique, représentée par les bactéries présentes dans de nombreux aliments, auront un impact sur la structuration et la fonctionnalité des matrices alimentaires. Par ailleurs, les communautés microbiennes présentes dans les aliments sont complexes et les interactions entre bactéries pourront moduler la structuration des écosystèmes microbiens ainsi que leur fonctionnalité.

Au sein des systèmes alimentaires, les interactions entre bactéries étudiées sont majoritairement les interactions de compétition entre microorganismes bénéfiques présents dans l'aliment et bactéries pathogènes alimentaires. Leur compréhension permet de développer de nouvelles technologies de biopréservation afin d'améliorer la qualité et la sécurité microbiologique des aliments. Si ces interactions ont fait l'objet de nombreux travaux, la compétition entre l'ensemble des bactéries constitutives du microbiote alimentaire reste peu étudiée. Ainsi, l'objectif des travaux menés au laboratoire est d'appréhender d'un point de vue écologique ces interactions entre les microorganismes de l'aliment et d'analyser leur influence sur la structuration, la diversité de l'écosystème et l'efficacité des procédés de biopréservation.

Le rôle écologique des molécules antibactériennes et leur impact sur le comportement social des bactéries sont deux éléments qui sont pris en considération dans les études relatives aux phénomènes de compétition bactérienne. Pour survivre et proliférer dans des habitats naturels, les microorganismes doivent faire face aux différents types de stress : stress abiotique (pression, température, …) et stress compétitif (compétition par exploitation de nutriments et compétition par

production de substances antagonistes), limitant la croissance des concurrents. Une hypothèse retrouvée dans la bibliographie est que, selon le type de stress et de concurrence rencontré par les bactéries dans leur habitat, la stratégie de compétition peut être sélectionnée ou perdue au cours de l'évolution, selon la balance coût-bénéfice qu'elle apporte.

Dans ce contexte, les propionibactéries constituent un modèle intéressant pour étudier, au niveau fondamental, l'influence du type d'habitat sur la sélection des comportements de type compétitif, notamment *via* la compétition par interférence liée à la production de substances antagonistes : les propionibactéries laitières (*Propionibacterium* spp., *Acidipropionibacterium* spp.) et cutanées (*Cutibacterium* spp.) sont proches phylogénétiquement mais présentes dans des habitats très différents. Au niveau appliqué, ce modèle devrait permettre d'identifier des souches produisant des substances antimicrobiennes pour des applications en santé humaine et notamment en dermatologie.

La revue bibliographique va faire le point sur les phénomènes de compétitions bactériennes, les différentes molécules à activité antibactérienne, leur rôle écologique et les problématiques de déséquilibre du microbiote cutané. Ces différents points seront détaillés spécifiquement pour les propionibactéries laitières et cutanées. Cette analyse va permettre de préciser les questions scientifiques pertinentes, les objectifs de ce travail et la méthodologie à suivre.

Ce travail de thèse couple deux domaines de la microbiologie, la microbiologie alimentaire, compétences du LIBio, et la microbiologie clinique, compétences de Janina Duda-Ferrand, docteur en médecine et Praticien Hospitalo-Universitaire au service de bactériologie du CHRU de Nancy dirigé par le Professeur A. Lozniewski. Cette collaboration avec le CHRU de Nancy a permis d'avoir accès à la collection de souches bactériennes du Laboratoire de bactériologie du CHRU de Nancy, qui comprend un ensemble de souches de propionibactéries cutanées et des souches cibles, pathogènes ou non, d'origine clinique.

Une Collaboration avec Dr Gwénaël Jan du Laboratoire Science & Technologie du Lait & de l'Œuf (STLO), UMR 1253 INRA / AGROCAMPUS OUEST de Rennes a permis d'avoir accès à la collection de souches de propionibactéries laitières.

1 Revue bibliographique

Les bactéries doivent constamment s'adapter aux changements environnementaux, dont ceux incluant les changements dans la communauté microbienne et dans l'accessibilité des ressources.

L'aptitude de certaines bactéries à coloniser et persister dans un habitat donné est déterminée par leur capacité de compétition avec d'autres microorganismes concurrents. Il existe différents types de compétition bactérienne dont les mécanismes et les rôles écologiques seront discutés dans le chapitre 1.1 de cette revue bibliographique. L'un des mécanismes de compétition consiste en une production d'armes chimiques, telles que les bactériocines, qui inhibent la croissance d'autres microorganismes.

Les bactéries propioniques, dont certaines sont utilisées dans l'industrie fromagère et d'autres font partie de la flore cutanée, pourraient constituer une source intéressante de ce type de composés. La biologie des propionibactéries et leur potentiel antimicrobien seront revus dans la partie 1.2 de cette revue. L'utilisation des propionibactéries laitières et cutanées comme source des substances antimicrobiennes ou comme probiotiques pourrait être envisagée dans différentes applications cliniques, telles que le traitement des plaies chroniques ou de l'acné. L'adaptation des propionibactéries laitières et cutanées à des habitats exigeants, tels que la peau humaine, les rend particulièrement adaptées à ce type d'applications, ce qui sera abordé dans le chapitre 1.3. Les approches probiotiques peuvent constituer une alternative à l'antibiothérapie, ce qui est particulièrement recherché à l'ère de l'émergence des bactéries multirésistantes aux antibiotiques.

1.1 Compétition bactérienne

Afin de mieux comprendre les différents types de compétition bactérienne, il faut tout d'abord rappeler quelques notions fondamentales d'écologie, science étudiant les interactions entre les organismes et entre les organismes et leur environnement (Encyclopedia Britannica, https://www.britannica.com).

1.1.1 Quelques définitions

Un écosystème est « une unité écologique formée d'un biotope correspondant à l'ensemble des paramètres abiotiques (ou physico-chimiques) et d'une biocénose correspondant à l'ensemble des organismes y vivant (Frontier and Pichod-Viale, 2004). Les termes de biotope et de biocénose se rapportent à des communautés d'organismes. A l'échelle d'une espèce donnée, on utilise de manière analogue des concepts d'habitat et de niche écologique. L'habitat est un environnement naturel dans lequel vit une espèce donnée. Il comporte des caractéristiques physiques et biologiques nécessaires pour sa survie et sa reproduction (espace de vie, protection, ressources nutritionnelles, partenaires pour la reproduction). La niche écologique est une notion fonctionnelle, qui décrit la position et le rôle d'une espèce au sein d'une communauté donnée. L'ensemble habitat et niche écologique est appelé écotope, qui est défini comme un ensemble de variables environnementales et biologiques affectant toute une espèce (Whittaker et al., 1973).

Au sein d'un écosystème, les espèces entretiennent des nombreux types d'interactions, qui sont des processus impliquant des échanges ou des relations réciproques entre deux ou plusieurs acteurs. Les interactions peuvent concerner les individus issus d'espèces différentes (interactions interspécifiques). Elles peuvent aussi survenir entre les individus d'une même espèce (interactions intraspécifiques). Enfin, les organismes peuvent interagir avec leur habitat. L'écologie des communautés (ou synécologie) étudie comment ces différentes interactions affectent l'abondance, la distribution et la diversité des espèces dans les communautés (Johnson and Stinchcombe, 2007). Les interactions peuvent être classées selon leur effet sur la croissance d'un individu ou d'une population (classification phénoménologique). On distingue ainsi quatre types d'interactions : (i) le neutralisme (où les organismes n'ont pas d'influence sur leur croissance mutuelle), (ii) le commensalisme (où un des partenaires influence de manière positive la croissance de l'autre), (iii) le mutualisme (où les deux partenaires bénéficient de l'interaction) et (iv) la compétition (où au moins un des partenaires est négativement impacté par l'interaction) (Barton and Northup, 2011). Les interactions peuvent également être classées selon le mécanisme biologique impliqué (classification mécanistique). Une interaction directe nécessite un contact physique entre les organismes comme c'est le cas dans les relations de type parasitisme ou prédation (cf. paragraphe 1.1.2.3). L'interaction indirecte peut résulter d'une modification de facteurs physico-chimiques par les organismes, de possibilité d'accès à un substrat ou à un site ou d'une production de toxines (Fredrickson 1977). L'organisation d'une communauté biologique en fonction d'interactions écologiques est appelée « structure communautaire » (*community structure*) (Morin, 2011).

1.1.2 Types de compétition

La compétition est un processus selon lequel un organisme affecte négativement la survie ou la capacité d'autres micro-organismes à se reproduire. On distingue trois types de compétition : la compétition par exploitation, la compétition par interférence et le parasitisme/prédation (Figure 1.1.2 – 1). Certains auteurs assimilent le parasitisme/prédation à une compétition par interférence.

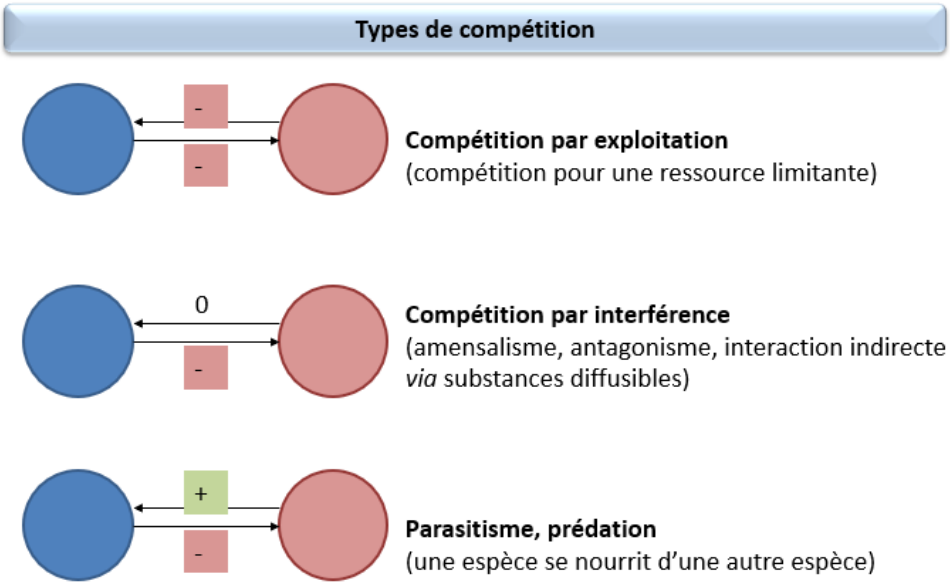


Figure 1.1.2 – 1

Types de compétition (les signes +, - et 0 symbolisent l'effet de l'interaction sur le partenaire).

1.1.2.1 Compétition par exploitation

Les espèces possèdent des caractéristiques fonctionnelles uniques adaptées à leur niche écologique. La compétition par exploitation est indirecte et survient quand deux organismes partagent une même niche écologique. Selon le principe d'exclusion compétitive, quand deux acteurs utilisent une même ressource limitante, le compétiteur le plus faible est amené à disparaître ou subit une adaptation évolutive pour occuper une autre niche écologique (Hardin, 1960). Ce principe est déjà évoqué dans la théorie Darwinienne de l'évolution des espèces, selon laquelle dans la lutte pour la survie des espèces, les individus le mieux adaptés produisent vraisemblablement plus de descendants que les individus moins bien adaptés, ce qui provoque une modification progressive de la population avec une accumulation de caractères le plus favorables chez les descendants (Darwin, 1859).

L'exclusion compétitive peut être modélisée par les équations de Lotka-Volterra (Taylor, 1988). Soit x la taille d'une population à un moment donné, r sa capacité de croissance *per capita* et K la

capacité porteuse d'un habitat (la taille maximale de la population qui peut être maintenue indéfiniment par un environnement donné), le changement de la taille d'une population au cours du temps peut être décrit par un modèle logistique :

$$\frac{dx}{dt} = rx\left(1 - \frac{x}{K}\right)$$

Si l'on considère deux populations, x_1 et x_2, on ajoute dans le modèle logistique la notion d'interaction de deux espèces : α_{12} qui représente l'effet inhibiteur de l'espèce 2 sur la population de l'espèce 1 et α_{21} qui représente l'effet inhibiteur de l'espèce 1 sur la population de l'espèce 2.

$$\frac{dx_1}{dt} = r_1 x_1 \left(1 - \left(\frac{x_1 + \alpha_{12} x_2}{K_1}\right)\right)$$
$$\frac{dx_2}{dt} = r_2 x_2 \left(1 - \left(\frac{x_2 + \alpha_{21} x_1}{K_2}\right)\right)$$

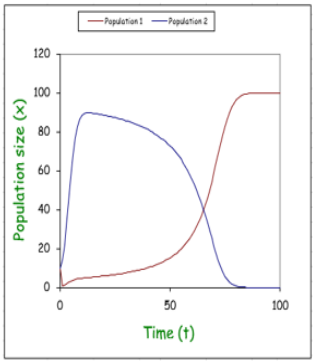
Selon les valeurs relatives de α et de K, quatre issues de la compétition sont possibles (Figure 1.1.2 – 2) :

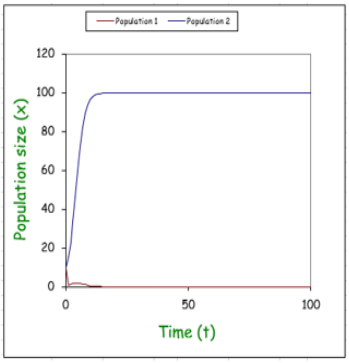
- l'espèce 1 gagne
- l'espèce 2 gagne
- les deux espèces coexistent (mais uniquement si les effets inhibiteurs α sont très faibles)
- aucune des espèces ne peut gagner – il se produit un équilibre instable dépendant de la taille initiale relative de chacune des espèces.

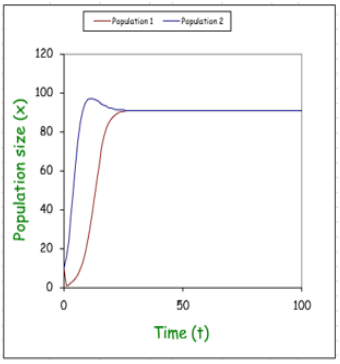
Population 1 gagne		
	Population 1	Population 2
K	100	100
r	0.4	0.5
α	2	1
X (t0)	10	10

Population 2 gagne		
	Population 1	Population 2
K	100	100
r	0.4	0.5
α	1	2
X (t0)	10	10

Coexistence		
	Population 1	Population 2
K	100	100
r	0.4	0.5
α	0.1	0.1
X (t0)	10	10

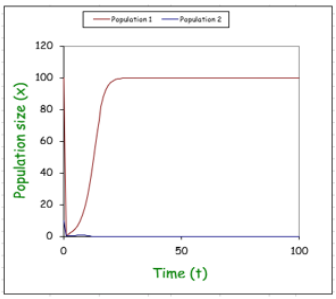






Equilibre instable		
	Population 1	Population 2
K	100	100
r	0.4	0.5
α	10	10
X (t0)	100	10

	Population 1	Population 2
K	100	100
r	0.4	0.5
α	10	10
X (t0)	10	100



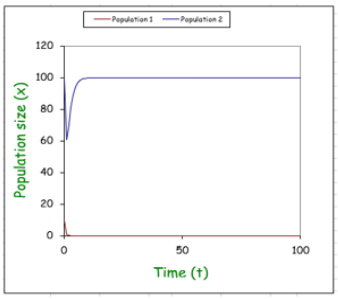


Figure 1.1.2 – 2

Différentes issues du modèle compétitif de Lotka-Volterra pour deux espèces ; x(t0) - taille initiale de la population, r - capacité de croissance *per capita,* K - capacité porteuse de l'habitat, *α* - effet inhibiteur de l'une des espèces sur la population de l'autre espèce.

Dans les écosystèmes naturels, l'exclusion compétitive est rarement observée. Une des explications peut être un chevauchement seulement apparent de niches écologiques. Dans un autre cas, la ressource peut cesser d'être limitante, ce qui permet un relâchement de la compétition. Enfin, dans la coexistence compétitive, la compétition par exploitation reste forte mais un facteur extrinsèque (ex. prédation) rend la coexistence possible (Tokeshi, 1999).

1.1.2.2 Compétition par interference

La compétition entre organismes résultant de la production de composés délétères pour la survie est qualifiée d'antagonisme, d'amensalisme ou de compétition par interférence. Certains auteurs utilisent le terme de « compétition par interférence » pour toute action d'agression. Dans ce cas, on peut distinguer l'interférence directe (parasitisme et prédation) et l'interférence indirecte *via* des substances diffusibles (amensalisme) (Barton and Northup, 2011). De nombreuses molécules bioactives présentent des activités antagonistes. Elles seront décrites dans le paragraphe 1.1.3.

Un comportement antagoniste se traduit généralement par une inhibition de croissance dans un site particulier, non pas parce que l'espace est requis mais pour empêcher les autres micro-organismes d'utiliser de ressources nutritionnelles limitantes. La compétition interférentielle permet ainsi d'éliminer la compétition par exploitation (Barton and Northup, 2011). Les substances antagonistes peuvent aussi être utilisées dans les stratégies de prédation (cf. paragraphe 1.1.2.3).

1.1.2.2.1 Compromis entre exploitation et interférence

Lors d'une compétition pour des ressources limitées, les microorganismes peuvent nuancer la part de compétition par exploitation et par interférence. En effet, Russel et al. (2017) ont montré que, bien que la compétition survienne entre les espèces évolutionairement et métaboliquement similaires, il existe un phénomène de « compromis entre la compétition et la colonisation » (*competition-colonization trade off*). Au sein d'un même habitat, il existe des espèces « spécialistes », qui exploitent de manière efficace un faible nombre de ressources et des espèces « généralistes » qui peuvent exploiter diverses ressources, mais doivent inhiber les « spécialistes » pour y accéder. Les « spécialistes » vont donc adopter une stratégie de compétition par exploitation, alors que les « généralistes » doivent privilégier les mécanismes de compétition par interférence.

1.1.2.2.2 Cannibalisme et fratricide

Un des exemples intéressants d'utilisation de molécules antagonistes est le comportement de cannibalisme chez *Bacillus subtilis*. Dans les conditions environnementales défavorables (ex. carences nutritionnelles), *Bacillus* peut utiliser une stratégie de cannibalisme pour retarder le processus de

sporulation. En effet, la fabrication de spores est un processus coûteux et chronophage, qui est une stratégie ultime de survie, difficilement réversible. C'est pourquoi, quand la population isogénique de *Bacillus subtilis* rencontre des conditions défavorables, elle se différencie en deux sous-groupes (ang. *bistable switch*). Une petite proportion de la population déclenche une forte phosphorylation de la protéine Spo0A responsable de bascule dans la voie de sporulation (population Spo0A-ON). Cette population secrète aussi des bactériocines (peptides à activité antibactérienne) qui tuent la sous-population non-sporulante (Spo0A-OFF). La population Spo0A-ON est, quant à elle, protégée contre ces bactériocines par un système de protéines d'immunité. Les nutriments libérés de la population non-sporulante permettent de retarder le processus de sporulation de *B. subtilis* Spo0A-ON en attendant des conditions plus favorables (Figure 1.1.2 – 3) (Claverys and Håvarstein, 2007).

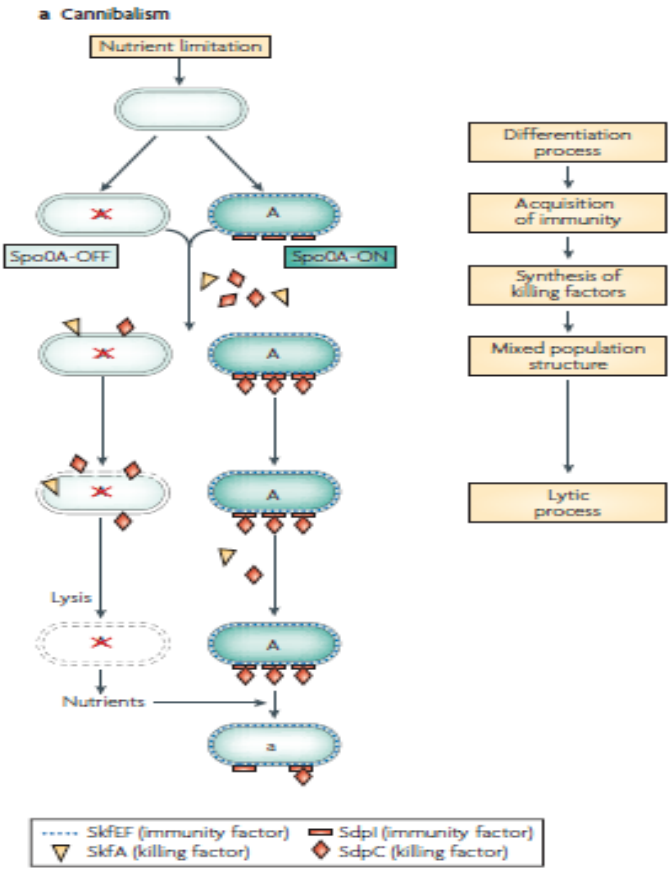


Figure 1.1.2 – 3

Utilisation de molécules antagonistes dans une stratégie de cannibalisme (Claverys and Håvarstein, 2007).

Un exemple similaire d'utilisation de molécules antagonistes est le comportement fratricide de *Streptococcus pneumoniae*. Dans ce cas, *S. pneumoniae* exposé à un stress environnemental (ex. présence d'antibiotique) va tuer ses confrères à l'aide de bactériocines pour libérer leur ADN et avoir

ainsi l'accès à un répertoire de nouveaux gènes qu'il peut acquérir par transformation (Claverys and Håvarstein, 2007).

1.1.2.3 Parasitisme et prédation

1.1.2.3.1 Parasitisme

Le parasitisme est une interaction directe dans laquelle le parasite se développe sur la surface ou au sein d'un organisme d'une autre espèce dont il puise des ressources nécessaires à sa survie. Le parasite est adapté structurellement à ce mode de vie (Poulin, 2007).

De nombreux pathogènes bactériens peuvent être considérés comme des parasites des mammifères (ex. *Borreliella* sp., agent de la maladie de Lyme ou *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose). Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires, hautement spécialisés dans leur mode de vie parasitaire. Tous les types de microorganismes (bactéries, champignons, protozoaires) peuvent être parasités par leurs virus. Il a été suggéré que les virus jouent un rôle important dans la structuration de populations microbiennes.

Contrairement aux prédateurs, les parasites en général ne tuent pas leur hôte, établissant une relation stable à long terme. Dans la lysogénie, le provirus est hébergé dans le chromosome et transmis à d'autres individus sans dommage apparent pour l'hôte. Même si, le plus souvent, la relation de parasitisme est évidente, il peut exister à de degrés variables : de parasitioidisme (qui est inévitablement fatal pour l'hôte), jusqu'à une atténuation de l'interaction qui acquiert un caractère de mutualisme (Poulin, 2007).

1.1.2.3.2 Prédation

Le terme prédation est réservé aux « chasseurs » qui tuent leur proie et consomment les macromolécules libérées. La première étude sur la prédation bactérienne au sein du genre *Myxobacterium* a été publiée il y a 75 ans. Depuis, beaucoup d'espèces prédatrices ont été décrites. Les conséquences environnementales et les applications potentielles de ces phénomènes sont actuellement intensément étudiées (Pérez et al., 2016).

Deux principales stratégies de chasse bactérienne ont été observées, la stratégie épibiotique et la stratégie endobiotique. Dans la stratégie épibiotique, le prédateur digère sa proie de l'extérieur.

Chez *Vampirococcus* et *Micavibrio* les enzymes lytiques sont injectées dans le cytoplasme de la victime par un système de sécrétion de type IV (Figure 1.1.2 – 5). Chez *Cupriaviridus* et *Stenotrophomonas,* la digestion est possible grâce aux facteurs diffusibles. Ce dernier phénomène se place à la frontière entre l'antagonisme et la prédation (Pérez et al., 2016).

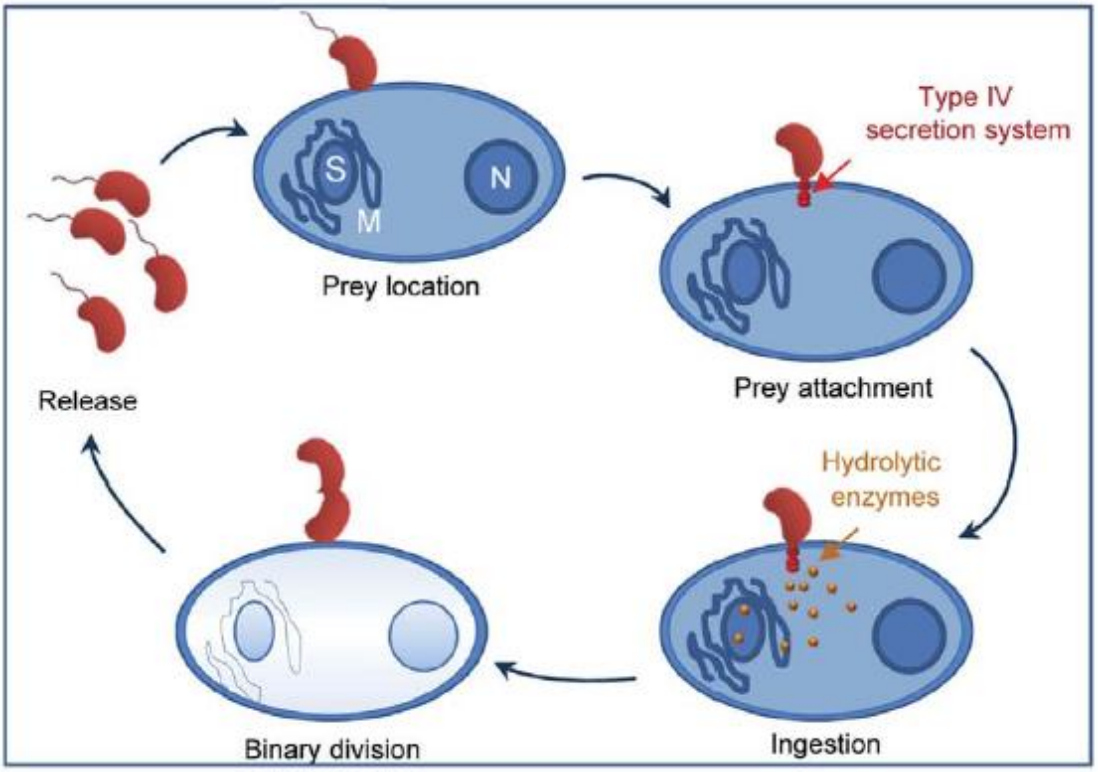


Figure 1.1.2 – 5

Stratégie de chasse épibiotique de *Vampirovibrio chlorellavorus* sur *Chlorella vulgaris* (Pérez et al., 2016).

Certains auteurs assimilent le comportement cannibale de *Bacillus subtilis* (cf. paragraphe 1.1.2.2.2) à une stratégie de prédation épibiotique par facteurs diffusibles (Pérez et al., 2016).

Les prédateurs épibiotiques peuvent développer des comportements de chasse en groupe, soit par sécrétion d'enzymes diffusibles soit en attachant les enzymes à la surface ou dans la matrice extracellulaire de leur proie (Figure 1.1.2 – 6). Lors de cette chasse de groupe, les molécules libérées profitent aussi bien aux producteurs d'enzymes lytiques qu'aux autres cellules non-sécrétrices (cf. paragraphe 1.1.4) (Pérez et al., 2016).

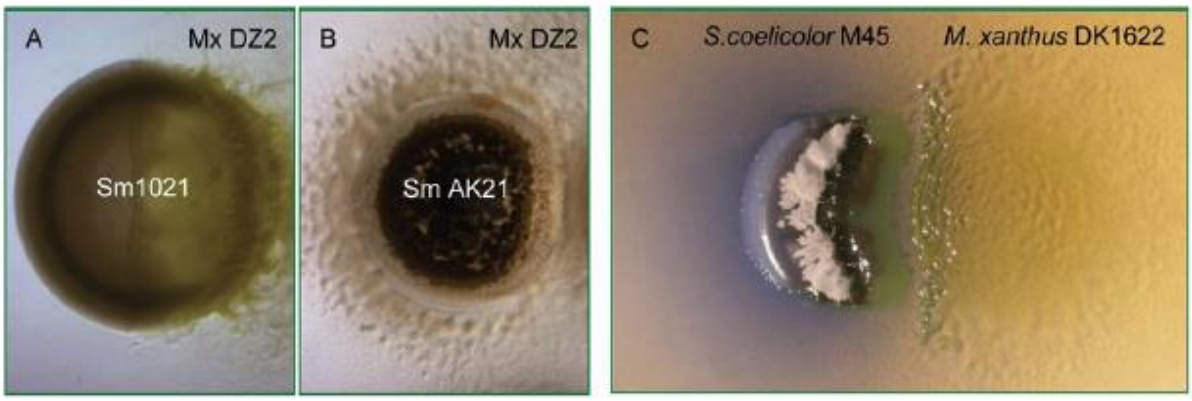


Figure 1.1.2 – 6

Stratégies de chasse en groupe. A – attaque frontale de *Myxococcus xanthus* DZ2 contre une colonie de *Sinorhizobium meliloti* 1021 ; B – chasse en meute de *M. xanthus* DZ2 contre une colonie de *S. meliloti* AK21 ; C – induction de formation de mycélium aérien (structures blanches) et production de l'antibiotique actnorhodine (bleue) par *Streptomyces coelicolor* M45 en réponse à l'attaque de *M. xanthus* DK1622 (Pérez et al., 2016).

La deuxième stratégie de chasse est appelée endobiotique. Elle consiste en une invasion du périplasme ou du cytoplasme de la proie par le prédateur. L'invasion du cytoplasme porte le nom de diacytose et a été décrite chez *Daptobacter* qui se divise et croit à l'intérieur de sa proie (bactérie du genre *Chromatium*), laissant intacte seulement sa paroi cellulaire. Il a été suggéré que ce comportement pouvait être à l'origine d'organelles intracellulaires dans le cas où la pénétration du prédateur n'induisait pas la mort de la proie (Guerrero et al., 1986). L'invasion du périplasme est observée chez les chasseurs du genre *Bdellovibrio* et BALOs (*Bdellovirbio-like organisms*). La chasse commence par une attaque extracellulaire, pendant laquelle *Bdellovibrio* poursuit sa proie (bactérie à Gram négatif), propulsé par un flagelle polaire. Il est intéressant de noter que *Bdellovibrio* sont des bactéries les plus rapides actuellement connues et peuvent se déplacer à une vitesse de 100 fois leur longueur cellulaire par seconde. Dans la seconde phase d'attaque, le prédateur s'attache à la cellule et pénètre dans son espace périplasmique, où il croît, se multiplie puis tue sa proie, en libérant de nouveaux prédateurs (Figure 1.1.2 – 7) (Pérez et al., 2016).

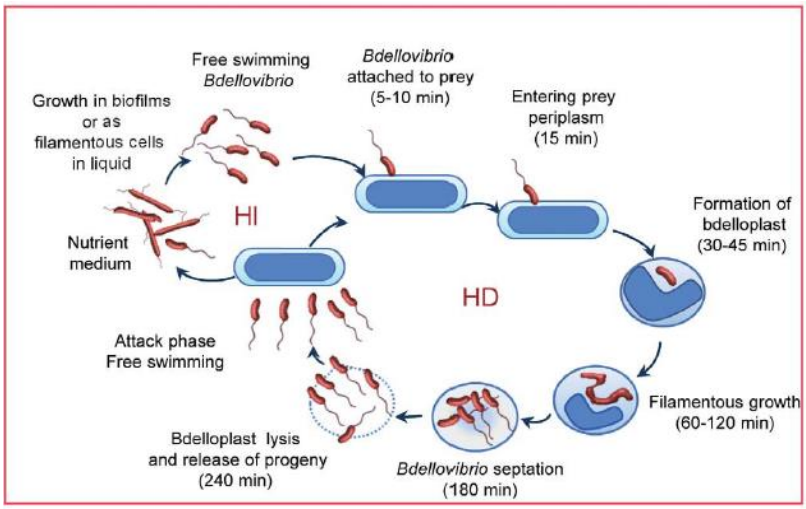


Figure 1.1.2 – 7

Stratégie de chasse endobiotique de *Bdellovibrio* par invasion du périplasme. HD – phase de prédation (*host dependent*) ; HI – phase de croissance indépendante de l'hôte (*host independent*) (Pérez et al., 2016).

1.1.3 Molécules à activité antibactérienne

1.1.3.1 Définitions

Les organismes vivants sont capables de produire une grande diversité de molécules bioactives. Les découvertes des antibiotiques dans les années 1940 par Fleming (pénicilline) et plus tard par Schatz et Waksman (streptomycine), ont ouvert la voie à la découverte de ces nombreux « produits naturels » (ang. *natural products*). Depuis, ces molécules ont fait l'objet d'intenses investigations, compte tenu de leur grand potentiel thérapeutique (antimicrobiens, anticancéreux, immunosuppresseurs, antiinflammatoires…) (Davies, 2013).

Les molécules bactériennes bioactives sont traditionnellement appelées « métabolites secondaires". Cette dénomination est basée sur une interprétation anthropocentrique de la physiologie microbienne, cherchant des analogies avec le comportement humain. En effet, dans des conditions de laboratoire, la production de deux types de métabolites, appelés « primaires » et « secondaires », est observée. Les métabolites primaires, produits en général dans la phase de croissance exponentielle, sont directement impliqués dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme. Ils sont habituellement présents dans différents taxons. Ce sont des produits intermédiaires ou finals d'une voie métabolique, tels qu'alcools, acides aminés, nucléotides, acides organiques, polyols, vitamines ou enzymes. Les métabolites secondaires, souvent

produits dans des phases tardives de croissance, sont considérés comme ancillaires, n'étant pas directement impliqués dans des processus physiologiques fondamentaux. Ils sont habituellement spécifiques d'un ensemble taxonomique restreint. Cependant, l'appellation « métabolite secondaire » est basée sur des observations *in vitro*, qui diffèrent de conditions de croissance *in situ*. Dans les milieux naturels, les bactéries présentent des vitesses de croissance lentes et existent principalement dans des phases stationnaires de croissance, dans des cultures mixtes (microbiomes). Les molécules bioactives y jouent des rôles multiples, encore très mal élucidés. Avec l'accroissement de connaissances sur ces métabolites, il semble plus approprié de les appeler « métabolites spécialisés » afin de souligner leur rôle important dans l'écologie microbienne, qui n'est en aucun cas un rôle « secondaire ». En effet, certains microorganismes destinent jusqu'à 15 % de leur génome à la production de métabolites spécialisés (Davies, 2013).

Des nombreux métabolites microbiens présentent une activité antagoniste vis-à-vis d'autres microorganismes. Parmi ces molécules, on distingue des métabolites primaires tels que des acides organiques (formique, acétique, propionique, butyrique, lactique, sorbique, fumarique, malique, citrique) et des radicaux libres (anion superoxyde, peroxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle…). D'autre part, des métabolites spécialisés à activité antimicrobienne appartiennent principalement à quatre familles : (i) peptides de synthèse ribosomale (bactériocines), (ii) peptides non-ribosomaux, (iii) polycétides et (iv) terpènes. Ces différentes classes seront décrites dans les paragraphes suivants, afin de préparer l'analyse de différents composés antimicrobiens réalisée lors de ces travaux de thèse.

1.1.3.2 Peptides de synthèse ribosomale avec modifications post-traductionnelles

1.1.3.2.1 Définition

La famille de peptides de synthèse ribosomale avec des modifications post-traductionnelles (*ribosomally synthetized and post-tranlationally modified peptides*, RiPPs) sont synthétisés sous forme de peptides précurseurs de 20 à 110 acides aminés, composés chacun d'un peptide leader et d'un peptide central (*core peptide*). Le peptide leader est souvent très conservé et est facilement reconnu par des enzymes de modification post-traductionnelle, qui participent à la modification du peptide central (méthylases, déhydratases, cyclases…). Le peptide leader est ensuite clivé par des enzymes protéolytiques libérant le peptide central actif (Figure 1.1.3. – 1). Les modifications post-traductionnelles permettent d'obtenir des structures non accessibles lors de la simple synthèse

ribosomale et de générer une grande diversité biochimique de métabolites, tout en subissant un faible coût génétique (Arnison et al., 2013).

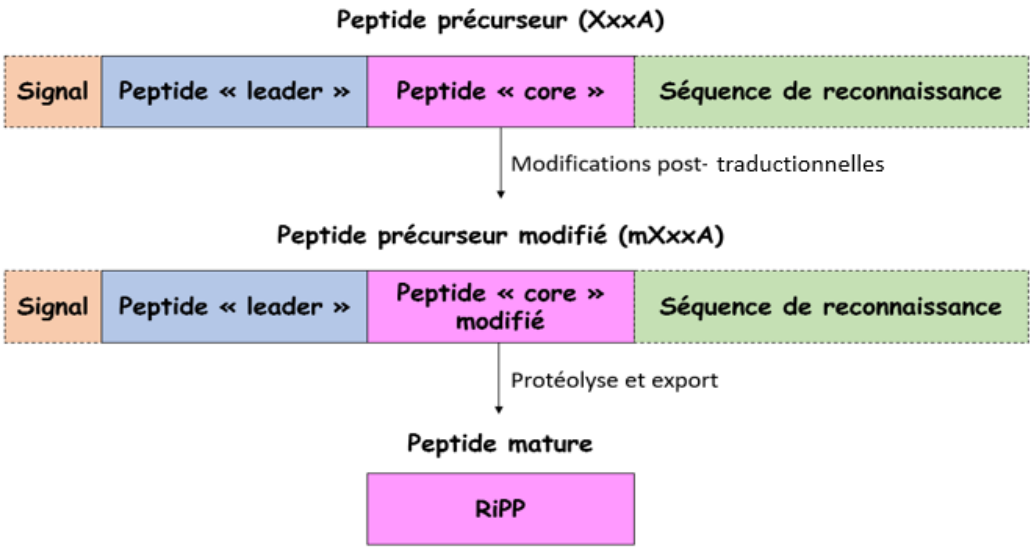


Figure 1.1.3 – 1

Schéma de biosynthèse de RiPPs (*ribosomally synthetized and post-tranlationally modified peptides*). Les modifications post-traductionnelles sont guidées par les peptides « leader » et les « séquences de reconnaissance » (présentes principalement dans les peptides précurseurs des eucaryotes) (Arnison et al., 2013).

Les RiPPs à activité antibactérienne sont appelés bactériocines. En général, le microorganisme producteur est protégé de sa molécule par un système d'immunité. Les bactériocines diffèrent des peptides antibiotiques classiques pour plusieurs raisons. Premièrement, ces derniers sont synthétisés par des systèmes de méga-enzymes (NRPS), qui seront décrits plus loin. Deuxièmement, les bactériocines ont généralement un spectre d'activité étroit, ciblant les souches de la même espèce ou des espèces proches phylogénétiquement, alors que les antibiotiques ont souvent un spectre d'activité beaucoup plus large. Finalement, les bactériocines présentent une activité à des concentrations nanomolaires, tandis que les antibiotiques nécessitent des concentrations beaucoup plus élevées pour être actifs (Cotter et al., 2013).

1.1.3.2.2 Classification et mécanismes d'action

La nomenclature et la classification des bactériocines n'est pas uniforme, parfois même contradictoire. Récemment, des efforts ont été faits par un groupe d'experts internationaux pour fournir une nomenclature uniformisée, basée sur des points communs structuraux et de biosynthèse de ces molécules (Arnison et al., 2013). Les bactériocines ont été classées en deux groupes : peptides

subissant une modification post-traductionnelle (Classe I) et peptides non modifiés (Classe II) (Cotter et al., 2013). Certains auteurs distinguent aussi une troisième classe, les protéines ribosomales de plus de 10 kDa (Classe III) (Tableau 1.1.3 - 1).

Tableau 1.1.3 – 1

Classification des RiPPs (*ribosomally synthetized and post-tranlationally modified peptides*) de classe I et II (d'après Arnison et al. 2013 et Cotter et al. 2013)

Groupe	Caractéristiques	Exemples
Classe I (peptides modifiés)		
Bactériocines de type MccC7-C51	Le peptide a une liaison covalente avec un acide aspartique carboxy-terminal	MccC7-C51
Lasso peptides	Les peptides présentent une structure en lasso	MccJ25
Linear azole- or azoline-containing peptides (LAPs)	Les peptides possèdent des hétérocycles, mais pas d'autres modifications	MccB17
Lanthibiotiques (lanthipeptides)	Possèdent des ponts lanthionine	Nisin, planosporicin, mersacidin, actagardine, mutacin 1140
Linaridines	Présentent une structure linéaire et contiennent des acides aminés déshydratés	Cypemycin
Proteusines	Contiennent des hydroxylations, épimérisations et méthylations multiples	Polythéonamide A
Sactibiotiques (sactipeptides)	Contiennent des liaisons sulfure-carbone alpha	Subtilosine A, thuricine CD
Cyanobactines *patellamide-like*	Possèdent des hétérocycles et subissent une macrocyclisation	Patellamide A
Cyanobactines *anacyclamide-like*	Peptides cycliques contenant des acides aminés protéinogènes avec des résidus prényl	Anacyclamide A10
Thiopeptides	Contiennent un anneau central pyridine, dihydropyridine ou pipéridine et des hétérocycles	Thiostreptone, nocathiacine I, GE2270 A, philipimycine
Bottromycines	Contiennent une amidine macrocyclique, un thiazole C-terminal décarboxylé et des acides aminés avec des carbones méthylés	Bottromycine A2
Glycocines	Contiennent des S- glycopeptides	Sublancine 168
Class II (peptides non modifiés ou cycliques)		
IIa (*pediocin PA-1-like bacteriocins*)	Possèdent un motif conservé YGNGV (N – acide aminé quelconque)	Pédiocine PA-1, entérocine CRL35, carnobactériocine BM1
IIb	Deux peptides non modifiés nécessaires pour une activité	ABP118, lactacine F
IIc	Peptides cycliques	Entérocine AS-48

IId	Peptides non-modifiés, linéaires, non-*pediocin-like*	MccV, MccS, épidermicine NI01, lactococcine A
IIe	Contiennent une région C-terminale riche en sérines avec des modifications non-ribosomales du type sidérophore	MccE492, MccM

Les bactériocines ont plusieurs mécanismes d'action qui diffèrent de ceux décrits pour les antibiotiques : mécanismes ciblant les enveloppes cellulaires et mécanismes ciblant la réplication, la transcription ou la translation.

Parmi les bactériocines agissant sur l'enveloppe, plusieurs lantibiotiques et certaines bactériocines de classe II ciblent le lipide II. Ce dernier est une molécule clé dans la synthèse du peptidoglycane. Le lipide II est aussi ciblé chez les bactéries à Gram positif par l'antibiotique vancomycine, mais à un site différent, ce qui permet l'activité des bactériocines sur certaines souches résistantes à la vancomycine. La liaison au lipide II bloque la synthèse du peptidoglycane. Pour certaines bactériocines, cette liaison permet aussi la formation de pores dans la membrane cellulaire qui entraîne la perte du potentiel membranaire et finalement la mort de la cellule. Les autres bactériocines, par exemple celles de classes IIa, se lient aux autres structures ou récepteurs membranaires pour former des pores (Cotter et al., 2013).

Les bactériocines peuvent également exercer une activité bactéricide ou bactériostatique en perturbant la synthèse de l'ADN, de l'ARN ou des protéines. Les bactériocines traversent la membrane cellulaire *via* les porines et agissent sur différentes cibles intracellulaires. Elles peuvent inhiber, par exemple, l'ADN-gyrase, ce qui perturbe la réplication. Elles peuvent aussi se lier à la polymérase de l'ARN, ce qui empêche la synthèse de l'ARN messager. Les bactériocines de la classe des thiopeptides perturbent la synthèse protéique en se liant à des sous unités ribosomales (Arnison et al., 2013; Cotter et al., 2013; Riley, 2009).

1.1.3.3 Polycétides et peptides non ribosomaux

1.1.3.3.1 Définition

Les polycétides et les peptides non ribosomaux sont synthétisés par des larges enzymes multi modulaires (méga-enzymes), les synthases de polycétides (PKS – *polyketide synthases*) et les synthases de peptides non ribosomaux (NRPS – *non ribosomal peptide synthases*). Ces méga-enzymes sont composées de plusieurs domaines enzymatiques organisés en sous-unités/modules (Figure 1.1.3 – 2).

Elles produisent de manière séquentielle des chaînes des molécules et ajustent leur fonctionnalité par des enzymes modificatrices. L'unité de base incorporée dans les polymères est l'acyl-coenzyme A pour les polycétides et les acides aminés pour les peptides non ribosomaux. Les métabolites spécialisés produits par les PKS et les NRPS ont des multiples utilisations thérapeutiques (antibiotiques, immunosuppresseurs, anti-cancéreux et anti-cholestérol) (Staunton and Weissman, 2001; Strieker et al., 2010).

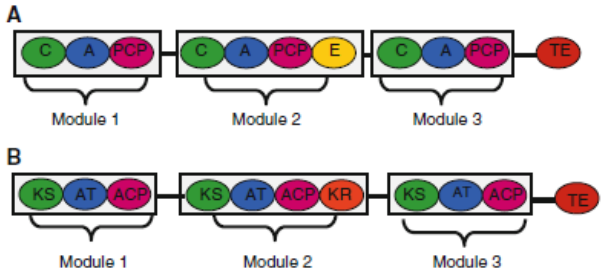


Figure 1.1.3 - 2

Structure de base d'une NRPS (A) et d'une PKS (B). Les méga-enzymes sont composées de plusieurs modules. Chacun des modules incorpore une unité de base. L'incorporation est effectuée grâce au travail coordonné de plusieurs domaines composant chacun de modules. Dans les modules d'une NRPS on distingue : C – domaine de condensation, A – domaine d'adénylation, PCP – *peptidyl carrier protein,* E – domaine d'épimérisation, TE – domaine thioestérase. Dans les modules d'une PKS, on trouve : KS – domaine cétosynthase, AT – domaine acyl-transférase, ACP – domaine porteur d'acyle (*acyl carrier protein*), KR - domaine cétoréductase, TE - domaine thioestérase (d'après Nikolouli & Mossialos, 2012).

1.1.3.3.2 PKS

Les PKS présentent des points communs avec les synthases d'acides gras. En général, un module PKS est composé de trois domaines : (1) un domaine acyl-transférase (AT), qui active et lie un substrat spécifique (acyl-CoA) et le transfère vers (2) un domaine porteur d'acyle (*acyl carrier protein*, ACP), appelé aussi domaine de thiolation (T). ACP bascule l'acyl-CoA vers (3) un domaine cétosynthase (KS) qui catalyse la condensation et la décarboxylation entre l'acyl-CoA et la chaîne polycétide croissante. Certains modules de PKS peuvent en plus contenir des enzymes modificatrices qui permettent une diversification des produits, par exemple cétoréductase (KR), déhydratase (DH) ou énoyl réductase (ER). Finalement un domaine thioestérase achève la synthèse du polymère (Khosla et al., 2014). Alternativement, les PKS peuvent utiliser un domaine AT codé dans une portion distincte du génome (domaine trans-AT) (Piel, 2010) .

La synthèse d'un polycétide commence par l'intégration d'une sous-unité de base (ex. propionyl-CoA) par un domaine de chargement (LD – *loading domain*). La chaîne est ensuite allongée par incorporation d'autres sous-unités (ex. méthylmalonyl-CoA) par des modules d'élongation. Durant ces étapes, la chaîne peut subir des modifications. Finalement le polycétide est libéré par une module de terminaison contenant la thioestérase (Figure 1.1.3 – 3) (Khosla et al., 2014).

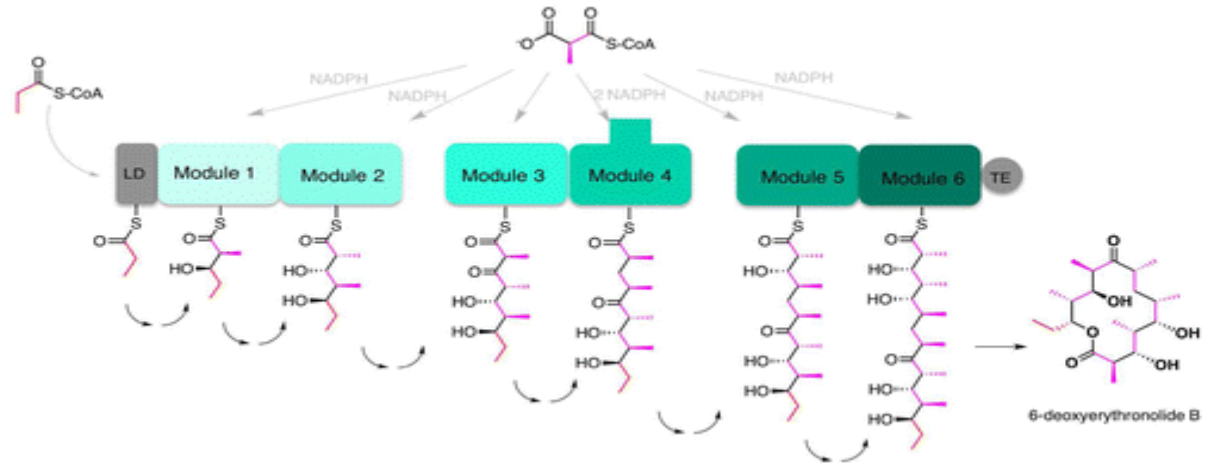


Figure 1.1.3. – 3

Synthèse d'un polycétide par une PKS (Khosla et al., 2014).

On distingue trois types de PKS selon l'organisation et la composition des modules. Les PKS de type I contiennent des multiples modules localisés au sein d'une ou plusieurs protéines qui assemblent les polycétides de manière successive ou itérative. Les PKS de type II sont des protéines mono- ou bi-fonctionnelles utilisées lors de la synthèse de manière itérative. Le domaine acyl-transférase est codé à part (trans-AT). Les PKS de type III sont composées de protéines mono- ou bi-fonctionnelles qui utilisent des substrats qui basculent entre les modules grâce à une liaison à un coenzyme-A à la place d'un domaine ACP.

1.1.3.3.3 NRPS

De manière analogue aux PKS, les NRPS sont composées de modules contenant habituellement trois domaines de base. (1) Le domaine d'adénylation (A) sélectionne et active spécifiquement un acide aminé. Celui-ci est ensuite transféré vers (2) une protéine porteuse de peptide (PCP – *peptidyl carrier protein*) appelé aussi domaine de thiolation (T). Deux acides aminés attachés à des PCP voisines sont ensuite liés par une liaison peptidique grâce à l'activité (3) d'un domaine de condensation (C). Comme

dans les PKS, un domaine thioestérase (TE) termine l'élongation de la chaîne peptidique. Un module de base est composé au minimum des domaines A-PCP-C. Les domaines sont séparés par des courtes séquences espaceur (environ 15 acides aminés). Chaque module incorpore un acide aminé spécifique. Au total, plus de 500 types d'acides aminés peuvent être incorporés par les différents domaines d'adénylation, dont de nombreux acides aminés atypiques, non protéinogènes (par exemple D-acides aminés ou acides aminés N-méthylés), contribuant grandement à la diversité de molécules synthétisées. De plus, des enzymes modificatrices, par exemple oxygénases, glycosyltransférases, méthyltransférases, racémases ou cyclases, augmentent encore la diversité des polypeptides non ribosomaux synthétisés (Strieker et al., 2010). La longueur des peptides synthétisés par les NRPS n'excède pas 50 acides aminés.

Le domaine A d'un module NRPS est composé d'environ 550 acides aminés. Dans son état de base, il reste dans une conformation ouverte afin que les substrats (l'acide aminé et ATP-Mg^{2+}) puissent se fixer. Il y a formation d'un intermédiaire aminoacyl-adénylate qui provoque une conformation fermée du domaine A. L'acide aminé activé est ensuite transféré au domaine PCP (Figure 1.1.3. – 4). Le domaine PCP (80 – 100 acides aminés) est équipé d'un bras 4'- phosphopantéthéine du CoA attaché à un résidu sérine dans son site actif. Ce bras peut lier de manière covalente, par une liaison thioester, les substrats aminoacyl (Figure 1.1.3 – 4). Une fois attachés, ces substrats peuvent être basculés entre les différents modules de NRPS durant les cycles d'élongation du peptide non ribosomal (Hur et al., 2012). Après le transfert, le domaine A retourne dans une conformation ouverte. Le domaine A peut catalyser l'activation d'un acide aminé de manière indépendante, sans être relié à d'autres domaines (trans-A).

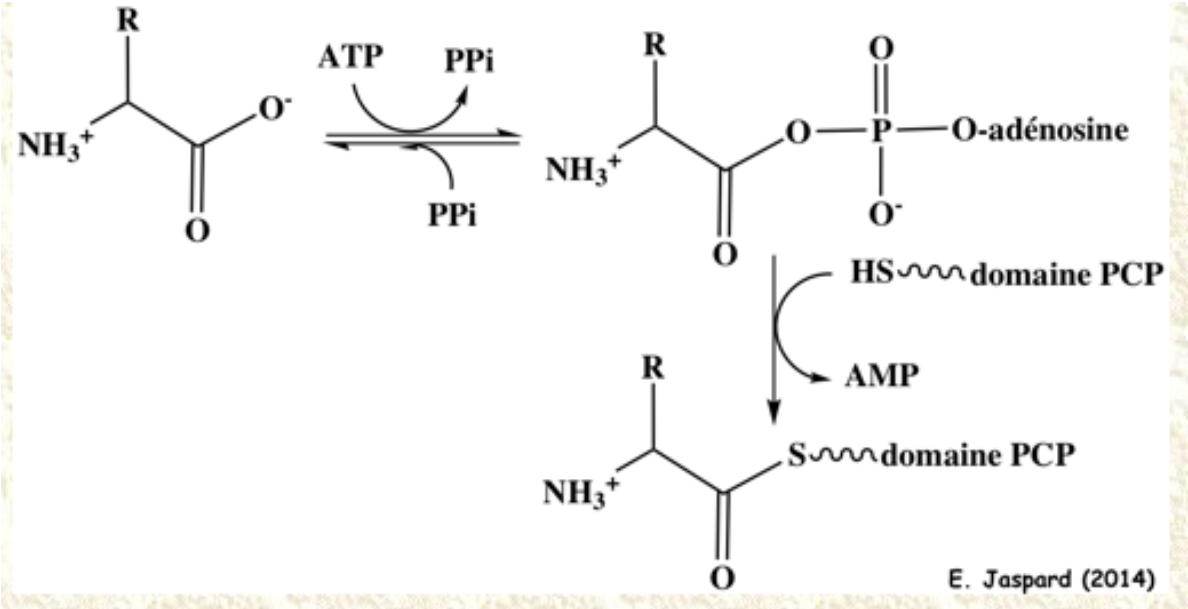


Figure 1.1.3 – 4

Fonctionnement des domaines A et PCP (ou T)

(http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/6BiochMetabSUITE/2MetabolismeSecondaire/1MetabolismeSecondaire.htm).

En général le premier module d'une NRPS est composé uniquement des domaines A et PCP, qui activent le premier acide aminé. Le module suivant contient les trois domaines de base (A-PCP-C). Le domaine de condensation d'environ 450 résidus lie par une liaison peptidique les acides aminés activés fixés sur les domaines PCP des modules voisins (Figure 1.1.3 – 5)

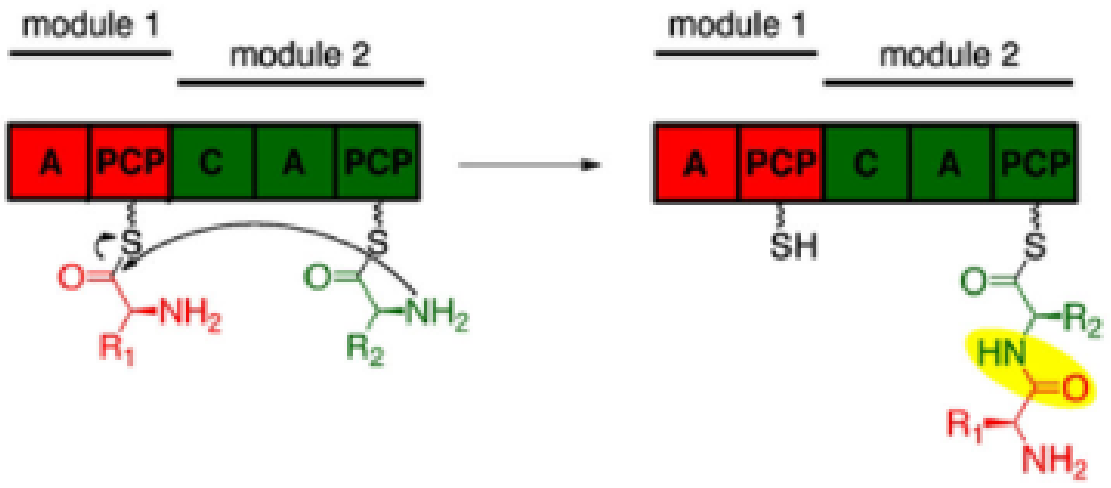


Figure 1.1.3. – 5

Formation d'une liaison peptidique par le domaine de condensation C (Hur et al., 2012).

La terminaison de la synthèse d'un peptide non ribosomal est effectuée par un domaine thioestérase d'environ 250 acides aminés. Ce domaine possède un résidu sérine dans son site actif qui peut libérer par une attaque nucléophile le peptide attaché par une liaison thioester à la PCP. Après cette attaque, la chaîne peptidique peut subir une hydrolyse pour produire un peptide linéaire (ex. vancomycine) ou une macrocylisation pour former un peptide cyclique (ex. surfactine ou daptomycine).

Au total, une NRPS est en général composée d'un module d'initiation (A-PCP), de modules d'élongation (A-PCP-C+ enzymes modificatrices) et d'un module de terminaison (A-PCP-C-TE) (Figure 1.1.3 – 6) (Strieker et al., 2010).

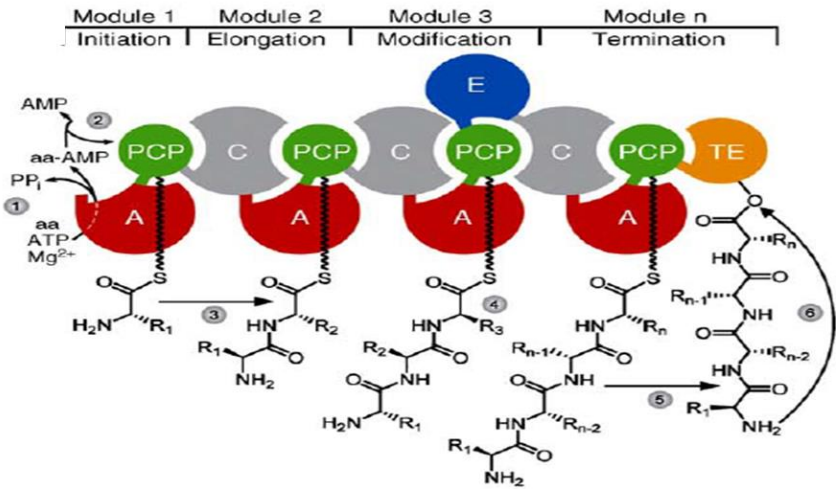


Figure 1.1.3 – 6

Synthèse d'une chaîne peptidique par les modules d'une NRPS (Strieker et al., 2010).

Les modules de NRPS contiennent également des courtes séquences de 15-25 acides aminés appelées domaines de communication (*communication-mediating*, COM) (ou domaines espaceurs), qui ont un rôle de régulation dans l'interaction des modules. Les domaines COM des modules adjacents contribuent de manière sélective à la condensation des peptides. Les expériences de modifications des domaines COM permettent d'obtenir des peptides alternatifs, augmentant la diversité potentielle de peptides non ribosomaux (Hur et al., 2012).

On distingue trois classes de NRPS. Les NRPS de classe A (linéaires) sont composées d'une suite de modules qui incorporent les acides aminés dans la chaîne peptidique de manière séquentielle. Le nombre et l'ordre d'acides aminés dans le peptide correspond au nombre et à la séquence de modules dans les NRPS (règle de colinéarité). Dans les NRPS de classe B (itératifs), les modules ou les domaines sont utilisés à plusieurs reprises pour synthétiser un peptide contenant des séquences répétées. Les NRPS de classe C (non linéaires) génèrent des peptides dans lesquels la séquence d'acides aminés ne corrèle pas avec l'enchaînement de modules de la synthase (Hur et al., 2012) (Figure 1.1.3 – 7).

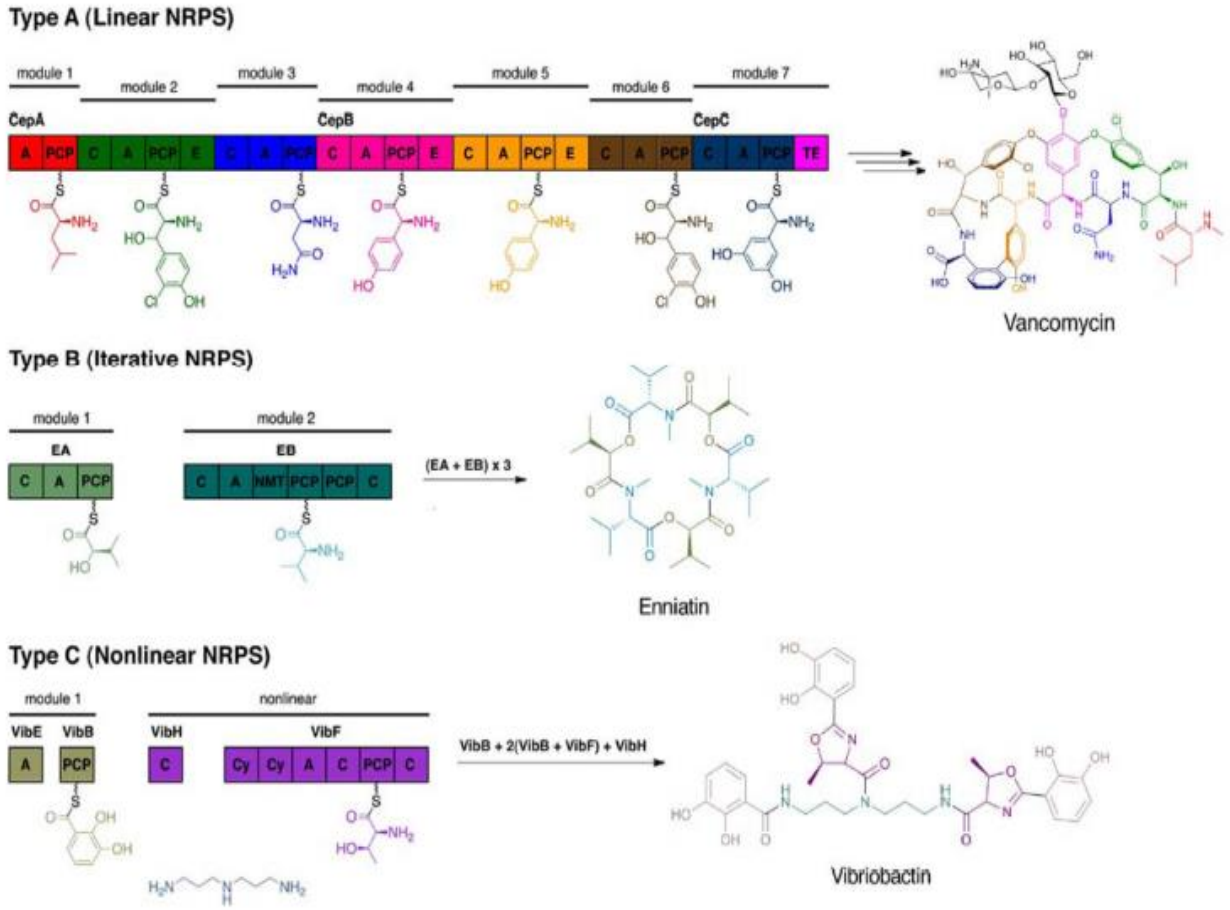


Figure 1.1.3 – 7

Stratégies d'assemblage de peptides non ribosomaux. A - NRPS linéaires - composées d'une suite de modules qui incorporent les acides aminés de manière séquentielle ; B – NRPS itératifs - qui utilisent les modules à plusieurs reprises pour synthétiser un peptide avec des séquences répétées ; C – NRPS non linéaires – qui produisent des peptides dont la séquence d'acides aminés ne corrèle pas avec l'enchaînement de modules de la synthase (Hur et al., 2012).

Il existe également les méga-enzymes hybrides PKS/NRPS, dans lesquelles les domaines de condensation sont capables de former des liaisons entre les polycétides et les acides aminés (Komaki et al., 2015).

Les méga-enzymes présentent un grand coût génétique et énergétique pour la cellule. En effet, un module de NRPS de 1000 acides aminés est responsable, par exemple, de l'incorporation d'un seul acide aminé dans un peptide non ribosomal. Cette stratégie coûteuse peut être expliquée par une extrême diversité de produits générés par les méga-synthases, grâce à l'incorporation d'acides aminés inhabituels et à l'action d'un vaste répertoire d'enzymes modificatrices (Nikolouli and Mossialos, 2012). Les NRPS évoluent par la duplication de gènes et par des délétions de domaines. L'omission de

certains modules, les évènements de recombinaison et des mutations ponctuelles contribuent aussi à la diversification des métabolites spécialisés produits (Nikolouli and Mossialos, 2012).

1.1.3.4 Terpènes

Les terpènes constituent une autre classe importante de métabolites spécialisés. Les terpènes (ou leur formes modifiées, appelées terpénoïdes) sont composées d'unités isoprène. Leur biosynthèse est initiée par une ionisation de molécules précurseurs – diphosphate de gérangéryl, diphosphate de farnésyl ou disphosphate de géranyl - qui sont ensuite prises en charge par une cyclase. Les enzymes de modification génèrent ensuite une grande variété de terpénoïdes (Hur et al., 2012).

Les terpènes sont principalement décrits chez les plantes et les champignons, mais ces dernières années, un grand nombre de terpènes ont également été découverts chez les bactéries, grâce à l'analyse bio-informatique des génomes. Les terpènes bactériens connus depuis longue date, tels que la géosmine, sont responsables d'odeurs caractéristiques tels que l'odeur de terre humide. Les terpènes nouvellement décrits pourraient présenter une activité antimicrobienne (Cane and Ikeda, 2012).

1.1.3.5 Détection bio-informatique des clusters de gènes de métabolites spécialisées

Pour l'identification de nouveaux antimicrobiens, on utilisait traditionnellement des stratégies de criblage basées sur la bio-activité. Ces stratégies sont toutefois laborieuses et mènent souvent à des redécouvertes des produits déjà connus. Avec les progrès de séquençage des génomes, les méthodes de criblage bio-informatique ont vu le jour. Elles constituent une approche efficiente de découverte de nouveau produits, dont ceux qui ne sont pas exprimés par les microorganismes dans des conditions expérimentales habituelles (gènes « silencieux » ou « cryptiques »). Plusieurs outils de prédiction de clusters de gènes de métabolites spécialisés (CGMS) ont été développés, dont certains basés sur la détection de gènes-signature, et d'autres recherchant des motifs spécifiques dans les clusters de gènes. Outre l'identification des clusters de gènes, l'analyse informatique permet de prédire les limites des clusters, notamment grâce à des comparaisons avec des bases des métabolites déjà connus ou à la synthénie de gènes au sein d'un groupe taxonomique donné. Les bases de données de plus en plus riches permettent aussi de classer les produits dans des familles de clusters (Weber and Kim, 2016).

Pour une bonne exploitation des données de la fouille bio-informatique des CGMS, une connaissance de mécanismes de synthèse de métabolites spécialisés, de gènes et de domaines fonctionnels typiques est nécessaire. Dans un premier temps, les séquences génomiques microbiennes peuvent être téléchargées à partir des bases des données internationales : National Center for Biotechnology information (NCBI) database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ou Joint Genome Institute (JGI) database (http://jgi.doe.gov) ou obtenues d'un séquençage *de novo.* Les séquences doivent être sauvegardées sous format FASTA ou GenBank. Si la séquence n'est pas annotée, on peut utiliser les programmes d'annotation automatisée tels que PROKKA ou Glimmer3, ou bien l'outil en ligne RAST (Aziz et al., 2008; Delcher et al., 1999; Seemann, 2014). Les séquences peuvent aussi être intégrées dans une plateforme en ligne Microscope MAGE, qui permet une annotation automatisée et experte des génomes et contient des nombreux outils informatiques permettant une visualisation et une expertise génomique facilitées (Vallenet et al., 2017). Un outil de visualisation de la séquence (Artemis) peut aussi être nécessaire, si l'on ne travaille pas avec la plateforme Microscope MAGE (Carver et al., 2012).

Pour l'identification des CGMS, l'outil en ligne le plus utilisé est antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) (Blin et al., 2017; Weber et al., 2015). Cet outil accepte des données génomiques sous format FASTA ou GenBank. AntiSMASH est également intégré dans la plateforme Microscope MAGE pour une utilisation accélérée. Plusieurs critères de recherche peuvent être définis dans les paramétrages d'antiSMASH pour une analyse approfondie des clusters potentiels. Si le cluster identifié par antiSMASH est similaire à un CGMS connu, il est automatiquement lié à la base de données MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) (Medema et al., 2015). Un autre outil de prédiction des CGMS, PRISM (Prediction Informatics for Secondary Metabolomes) a été développé plus récemment, contenant également une base d'environ 50 000 métabolites spécialisés connus. Il est particulièrement spécialisé dans la prédiction des NRPS et des PKS (Skinnider et al., 2015). D'autres programmes ont été développés pour des applications plus spécifiques : NP.searcher, ClustScan et SBSPKS pour la détection de clusters de PKS et NRPS ; BAGEL pour la détection de bactériocines (Anand et al., 2010; van Heel et al., 2013; Li et al., 2009; Starcevic et al., 2008).

AntiSMASH prédit les limites des clusters de gènes de manière automatisée. C'est pourquoi, il peut être nécessaire d'affiner l'analyse en déterminant les limites manuellement. AntiSMASH effectue la recherche de clusters de gènes homologues connus dans la base MIBiG, qui permet de comparer les limites du cluster identifié. Si la base MIBiG ne contient pas de clusters homologues, on peut effectuer la recherche de synthénie de gènes du cluster dans la plateforme Microscope MAGE, qui les compare

automatiquement avec les génomes des microorganismes des différents taxons (Blin et al., 2017; Medema et al., 2015; Vallenet et al., 2017).

1.1.4 Rôle écologique de molécules antimicrobiennes

Avant d'envisager l'utilisation des souches produisant des molécules antimicrobiennes en tant que probiotiques, il est indispensable de se pencher sur les forces écologiques régissant les phénomènes de production de ces molécules et de la résistance.

En 1859 Charles Darwin publie « L'origine des espèces », l'ouvrage dans lequel il expose sa théorie de l'évolution. Elle met en place le concept de « sélection naturelle » (ou « lutte pour l'existence »), qui est le moteur de l'évolution des espèces. Dans la théorie darwiniste, les ressources d'un milieu donné étant limitées, au sein d'une population qui l'habite, il se produit une lutte pour l'existence. Seuls les individus les plus aptes (les mieux adaptés de par leur constitution héréditaire) peuvent survivre. Ceci conduit à une modification graduelle de la population, avec une accumulation de caractères favorables au fil du temps.

Les idées de « lutte » et de « survie du plus apte » fait débat, si on les applique au pied de la lettre. Cependant l'interprétation faite par Darwin donnait un sens beaucoup plus large à ces termes. La lutte pour l'existence n'est pas une lutte violente mais plutôt une coopération des individus d'une même espèce afin d'assurer la survie du plus grand nombre. Le terme de « survie » est aussi utilisé au sens d'un succès de la progéniture et non pas de l'individu lui-même. L'adaptation et la survie du plus apte sont donc synonymes de fécondité. « Le point important n'est pas d'infliger la mort, qui est inévitable, mais de propager la vie, ce qui l'est beaucoup moins » (Margulis and Sagan, 2002). Le moteur de l'évolution serait donc plutôt un comportement social de coopération entre les individus au sein d'une population.

1.1.4.1 Comportement social des microorganismes

Pendant longtemps, il a été considéré que les microorganismes vivaient de manière relativement indépendante les uns des autres et étaient dépourvus de comportements coopératifs contrairement à des formes de vie plus complexes, comme les mammifères ou les insectes. Cependant depuis une vingtaine d'années cette idée a été complètement bousculée par des études qui montrent que les microbes présentent une variété de comportements sociaux, incluant la coopération, la

communication ou la synchronisation. Ces comportements ouvrent des nouvelles perspectives pour l'étude de l'évolution et l'écologie des microorganismes (West et al., 2007).

Un comportement social est un comportement qui a des conséquences pour l'acteur du comportement et pour son receveur. Les comportements sociaux peuvent être expliqués du point de vue théorique par des bénéfices directs ou indirects sur le «fitness» des individus. Selon la théorie de (Hamilton, 1964), les individus augmentent leur « »fitness» »" total en favorisant la reproduction de leurs congénères (l'effet indirect sur le « »fitness» ») ainsi que leur propre reproduction (l'effet direct sur le « »fitness» ») (West et al., 2007).

Un comportement est bénéfique si l'augmentation de «fitness» dépasse le coût du comportement lui-même. Quatre situations sont possibles, selon le bénéfice apporté par le comportement à l'acteur ou au receveur (Figure 1.1.4 – 1). Si les deux partenaires (acteur et receveur) profitent de la coopération, on parle de bénéfice mutuel (*mutual benefit*). Si l'acteur subit le coût du comportement dont bénéficie uniquement le receveur, on parle d'altruisme (*altruism*). Ces deux types de comportements, bénéfiques pour le receveur, sont appelés coopération. L'acteur du comportement peut aussi augmenter son propre «fitness» au détriment du receveur. On parle alors d'égoïsme (*selfishness*). Enfin, les deux partenaires peuvent subir des coûts de comportement qui dépassent les bénéfices sur leur « fitness». Cette situation est appelée « malveillance » (*spite*) (Diggle, 2010).

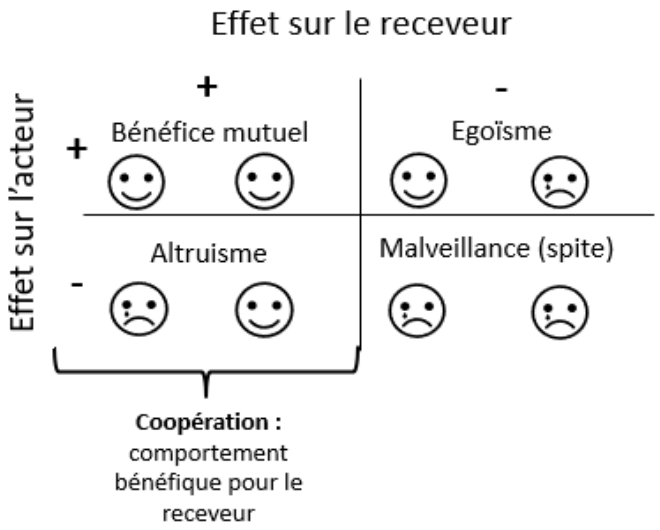


Figure 1.1.4 – 1

Classification de comportements sociaux selon leurs effets sur l'acteur et le receveur (d'après Diggle, 2010).

1.1.4.1.1 Le problème de la coopération

Expliquer les comportements coopératifs reste un défi pour les biologistes, car ils impliquent souvent la diminution de «fitness» de l'acteur. La sélection naturelle favorise les individus qui ont le plus grand succès de reproduction par rapport au reste de la population. Réduire ses chances de succès pourrait donc paraître contraire aux lois de l'évolution. Les exemples de comportements de coopération sont cependant nombreux dans la nature. Pour mieux les comprendre, il faut bien décrire la notion de coopération du point de vue de l'évolution sociale.

Un trait coopératif est celui qui augmente le «fitness» d'un individu autre que l'acteur et qui a évolué, au moins partiellement, en fonction de ce trait. La coopération inclut tous les comportements altruistes et une partie de comportements mutuellement bénéfiques (Diggle, 2010).

Le problème de comportements coopératifs est la possibilité d'exploitation de l'acteur par des « tricheurs » (*cheats*) qui profitent du comportement sans subir son coût. L'illustration de ce problème vient du champ d'économie et de moralité humaine et est connu sous le nom de « tragédie de biens communs » (*tragedy of commons*) (Figure 1.1.4 – 2).

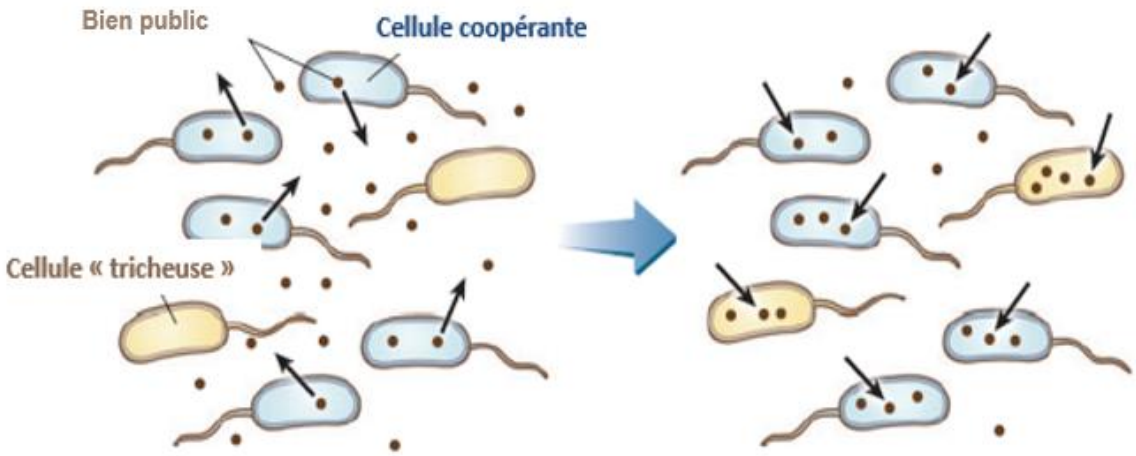


Figure 1.1.4 – 2

La « tragédie de communs » avec les biens publics. Les tricheurs qui ne subissent pas le coût de production de biens publics peuvent tirer bénéfice de ces biens produits par d'autres cellules (d'après West et al., 2007).

La tragédie vient du fait que tous les individus auraient profité de la coopération mais celle-ci n'est pas maintenue puisque chaque individu veut assurer son propre intérêt à court-terme. Chez les microorganismes, beaucoup de comportements ont le caractère de « biens communs/publics » (*public goods*), qui sont coûteux pour le producteur mais profitent aux autres individus de la population,

même ceux qui n'en produisent pas (tricheurs). L'exemple de « biens publics », est la production de sidérophores, d'antibiotiques, de bactériocines, de ß-lactamases, de biosurfactants ou de molécules de signalisation. Les exopolysaccharides sécrétés dans la matrice extracellulaire pour produire un biofilm sont aussi des biens publics (West et al., 2007). Comment alors les acteurs qui coopèrent peuvent se maintenir au cours de l'évolution, face aux « tricheurs » qui ne subissent pas le coût de la coopération ?

Avant de proposer des réponses à cette question, il faut bien distinguer les situations, où la coopération profite à tout le groupe (acteurs et receveurs) et des situations où seuls les receveurs bénéficient du comportement. La production de biens publics est un exemple de comportement profitable à tout le groupe. L'exemple de comportement profitable uniquement aux receveurs est l'autolyse de cellules d'*Escherichia coli* cotribue à libérer des bactériocines qui tuent les compétiteurs.

La coopération est aisément compréhensible dans le cadre d'un bénéfice direct sur le «fitness» de l'acteur. En effet, dans le cadre d'un comportement mutuellement bénéfique (réciprocité), la coopération est souvent bénévole aussi bien avec les individus apparentés qu'avec ceux qui ne le sont pas (Figure 1.1.4 – 3 B). L'exemple peut être le bénéfice tiré de la taille d'un groupe qui augmente les chances de survie de tous les individus. Les acteurs peuvent alors aider à élever la progéniture des autres membres du groupe afin d'accroître sa taille et de s'assurer ainsi une meilleure protection. La coopération mutuelle peut aussi être forcée en récompensant le coopérateur ou en punissant le tricheur (ce qui est appelé « la répression de la compétition »).

Il est plus difficile de comprendre les comportements altruistes, qui diminuent le ««fitness»» de l'acteur. Dans ce cas, le maintien de la coopération peut être expliqué par un bénéfice indirect, qui s'adresse aux individus qui partagent les mêmes gènes. Ce concept porte le nom de « sélection d'individus apparentés » (*kin selection*). En aidant un membre de sa famille, l'individu assure la transmission de ses propres gènes de manière indirecte. Hamilton (1964) indique que la sélection d'individus apparentés peut se produire de deux manières : (i) la reconnaissance de parentèle (*kin discrimination*), où l'acteur peut reconnaître les individus apparentés et diriger préférentiellement son comportement coopératif vers eux ; ou (ii) la viscosité de la population, qui maintient les individus apparentés dans une proximité spatiale, ce qui permet de coopérer avec l'ensemble des voisins (qui sont majoritairement génétiquement proches). L'exemple peut être la production de biens publics dans des populations clonales de microorganismes (Figure 1.1.4 – 3 A et B) (West et al., 2006). Il faut souligner que le degré de parenté doit être mesuré par rapport aux locus (ou loci) qui contrôlent le comportement de coopération. C'est pourquoi, la coopération peut être parfois dirigée vers des individus sans proximité généalogique, mais qui partagent le même gène coopératif (Diggle, 2010). Un

cas particulier de ce type de phénomène est le mécanisme de coopération avec « les barbes vertes » (*greenbeard*). Dans ce cas, le locus de coopération donne en plus un phénotype caractéristique (comme une barbe verte) qui peut facilement être reconnu par l'acteur du comportement (Figure 1.1.4 – 3 D) (West and Gardner, 2010).

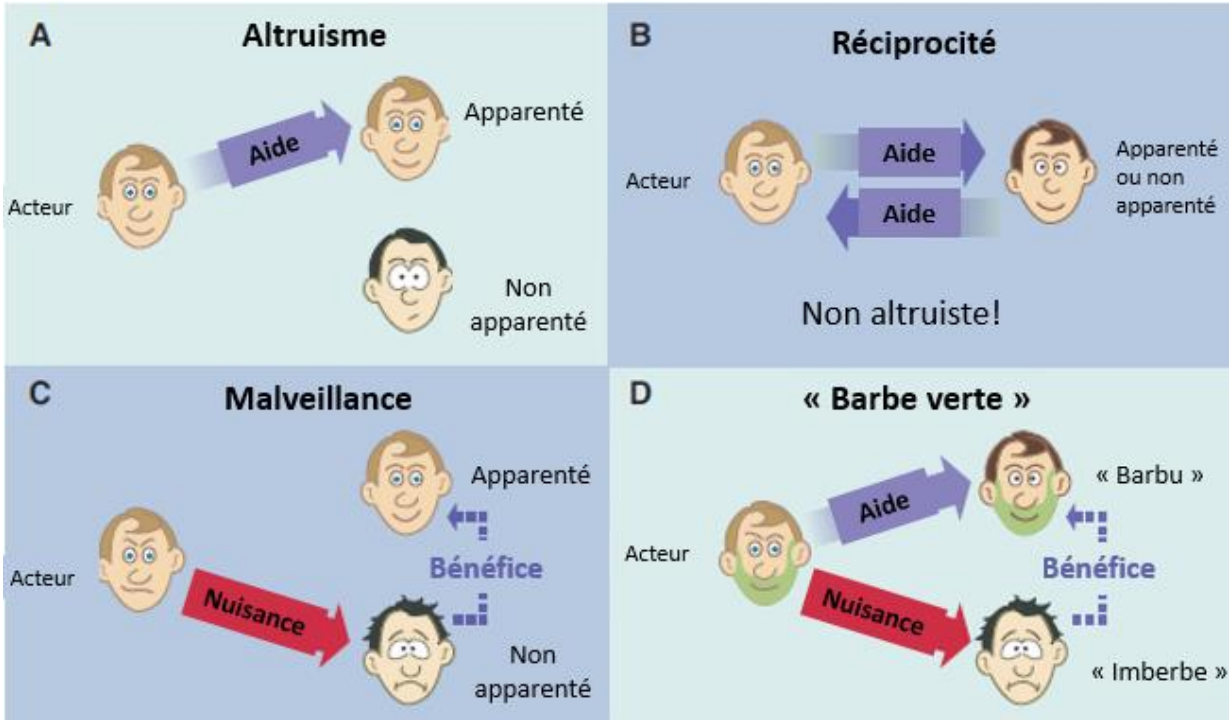


Figure 1.1.4 – 3

Mécanismes sociaux expliquant les comportements d'altruisme, de malveillance et de réciprocité selon le degré de parenté. (A) Altruisme est possible s'il est préférentiellement dirigé vers des individus apparentés. (B) Réciprocité est possible si elle assure un bénéfice direct dans le futur. (C) Malveillance est possible si elle est préférentiellement dirigée vers des individus non apparentés, ce qui procure un bénéfice aux individus apparentés. (D) « Barbes vertes » dirigent leur comportement altruiste vers d'autres individus « barbus » et nuisent aux individus « imberbes ».

1.1.4.1.2 La production d'antimicrobiens comme comportement social

La production d'antimicrobiens est coûteuse pour l'acteur et ces molécules ont un caractère de biens publics. Le maintien de gènes d'antimicrobiens peut être expliqué dans le contexte de comportements sociaux.

L'exemple d'un coût extrême pour l'acteur est la production de bactériocines par *E. coli* (colicines). Dans des conditions de stress (ex. carence nutritionnelle), une petite proportion de souches d'*E. coli* est amenée à produire des colicines. Les molécules sont libérées par la lyse de la cellule du

producteur. Elles s'attachent à des récepteurs spécifiques sur la surface de cellules sensibles et induisent leur mort par formation de pores, dégradation de l'ADN ou inhibition de synthèse protéique (Riley and Gordon, 1999).

Le sacrifice du producteur peut être considéré comme un comportement altruiste. Dans ce cas, la reconnaissance de souches apparentées (*kin discrimination*) justifie son maintien. Cette discrimination est possible grâce aux récepteurs spécifiques de chacune des colicines, garantissant un spectre d'activité très étroit, agissant quasi-exclusivement sur des lignées d'*E. coli* non apparentées. Plus de 25 types de colicines ont été décrites. Cette diversité permet de cibler les souches d'*E. coli* faiblement apparentées. Dans des études des populations d'*E. coli,* on constate en effet qu'environ 30 % de souches sont productrices et 70 % de souches sont résistantes à au moins une colicine, ce qui donne des populations avec différentes combinaisons de types de bactériocines et de types de résistance (Riley and Gordon, 1999; West et al., 2007).

La production de colicines peut aussi être assimilée à une situation de « malveillance », puisque les gènes de colicines sont associés, au sein d'un même cluster de gènes, aux gènes d'immunité. Le produit de ces gènes, exprimé de manière constitutive, inhibe l'activité de la colicine en se liant à son extrémité carboxy-terminale. Les cellules apparentées, porteuses du cluster de gènes, seront donc protégées tandis que les cellules non-apparentées pourront être tuées par la colicine. Parfois le gène de colicine est perdu alors que le gène d'immunité est maintenu. Ceci permet l'émergence de souches « tricheuses » qui ne subissent pas le coût de la production tout en étant immunisées contre la colicine. Selon la proportion initiale de producteurs, de tricheurs, de souches sensibles, de souches résistantes et le type d'environnement, différents scénarios peuvent être envisagés selon les principes de théories de jeux (cf. paragraphe 1.1.4.2) (Riley and Gordon, 1999; West et al., 2006).

1.1.4.2 Production de molécules antagonistes et théories des jeux

La compétition et la production de molécules antagonistes peuvent être étudiées par les écologistes en appliquant les théories de jeux. Selon ces théories : (i) le jeu est une compétition entre les joueurs, (ii) chaque joueur utilise une stratégie qui donne une certaine récompense (*payoff*), (iii) la récompense du joueur dépend de la stratégie utilisée par les autres joueurs (Conlin et al., 2014).

Une illustration simple de ces principes est le jeu de « pierre-papier-ciseaux », qui est un jeu à deux joueurs avec trois stratégies. Ce jeu est non-transitif : chaque stratégie bat une autre stratégie et

est vaincue par la troisième (la pierre casse les ciseaux, les ciseaux coupent le papier et le papier recouvre la pierre). Les résultats de ce jeu entre deux personnes sont représentés dans le Tableau 1.1.4 – 1, qu'on appelle « la matrice de récompenses » (*payoff matrix*). Cet exemple illustre comment la « récompense » d'un joueur est conditionnée par la stratégie de l'autre joueur.

Tableau 1.1.4 – 1

« La matrice de récompenses » pour un jeu de « pierre-papier-ciseaux ».

	La stratégie de votre partenaire		
	Pierre	**Papier**	**Ciseaux**
Votre stratégie			
Pierre	Match nul	Perdu	Gagné
Papier	Gagné	Match nul	Perdu
Ciseaux	Perdu	Gagné	Match nul

Dans la théorie de jeux de l'évolution, on observe une très grande population d'individus jouant à plusieurs parties de jeux en parallèle. Les stratégies sont déterminées génétiquement et les « récompenses » sont exprimées en tant qu'impact sur le «fitness», ce qui peut être représenté sous forme de « matrice de fitness» ». Le «fitness» du génotype le plus performant se traduit par sa grande capacité de reproduction. Comme ses descendants héritent de la stratégie de leurs parents, la proportion de génotypes les plus performants augmente dans la population. Si un génotype rare utilise à un moment donné la stratégie la plus performante, il peut vite se multiplier et « envahir » la population (Conlin et al., 2014).

Dans le modèle de jeux de l'évolution (*evolutionary game model*), on observe une population soumise aux règles d'un jeu de compétition influençant les vitesses de reproduction des joueurs. Après reproduction, on aboutit à une nouvelle population (n+1) qui recommence le jeu. Avec le temps, la population atteint un état évolutionnairement stable. La stratégie gagnante est appelée « état évolutionairement stable » (ESS - *evolutionarily stable state*).

Comme illustration, prenons un jeu à deux joueurs, dans lequel il est possible de produire un bien public qui profite au producteur et à son partenaire. Deux génotypes sont possibles dans ce jeu : producteur (P) et non-producteur (N). Une de matrices de «fitness» possibles est représentée sur la Figure 1.1.4 – 4a. Le coût de production du bien dépasse ici le bénéfice qu'en retire le producteur. Quand P est un génotype commun et N rare, les deux génotypes s'apparient le plus souvent avec les partenaires P, si les paires se forment de manière aléatoire. Si l'on compare le succès reproductif de

ces deux associations (colonne de gauche), P s'appariant avec P a un «fitness» de 3 ; et N avec P un «fitness» de 4, donc supérieur. Dans ce cas, le génotype N peut envahir la population. De même, si le génotype N est initialement prédominant, le génotype P périt rapidement (le «fitness» de N face à un autre N = 2 et le «fitness» de P s'appariant avec N = 1 ; colonne de droite). Dans la théorie des jeux, ce cas de figure est appelé « le Dilemme du Prisonnier ». L'ESS après plusieurs parties de jeu est représenté sur la Figure 1.1.4 – 4b. Dans ce cas, l'évolution favoriserait les « tricheurs » (Conlin et al., 2014).

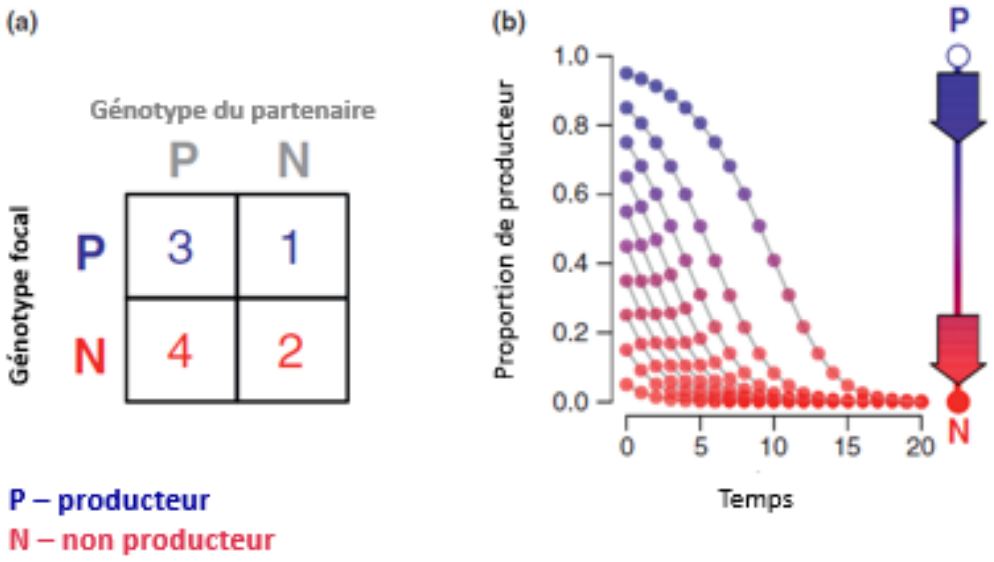


Figure 1.1.4 – 4

Jeu de l'évolution à deux joueurs et à deux stratégies. (a) matrice de «fitness» pour le jeu entre producteurs (P) et non producteurs (N) d'un bien public coûteux. (b) dynamique de la population soumise au jeu (d'après (Conlin et al., 2014).

Plus généralement, les inégalités dans la matrice de «fitness» prédisent quel génotype est évolutionairement stable (ESS). Dans les jeux à deux joueurs avec deux stratégies, quatre configurations de ESS sont possibles : prédominance de N, prédominance de P, coexistence et bi-stabilité (Figure 1.1.4 – 5). Elles sont déterminées par les matrices de «fitness» et parfois par les proportions initiales de génotypes.

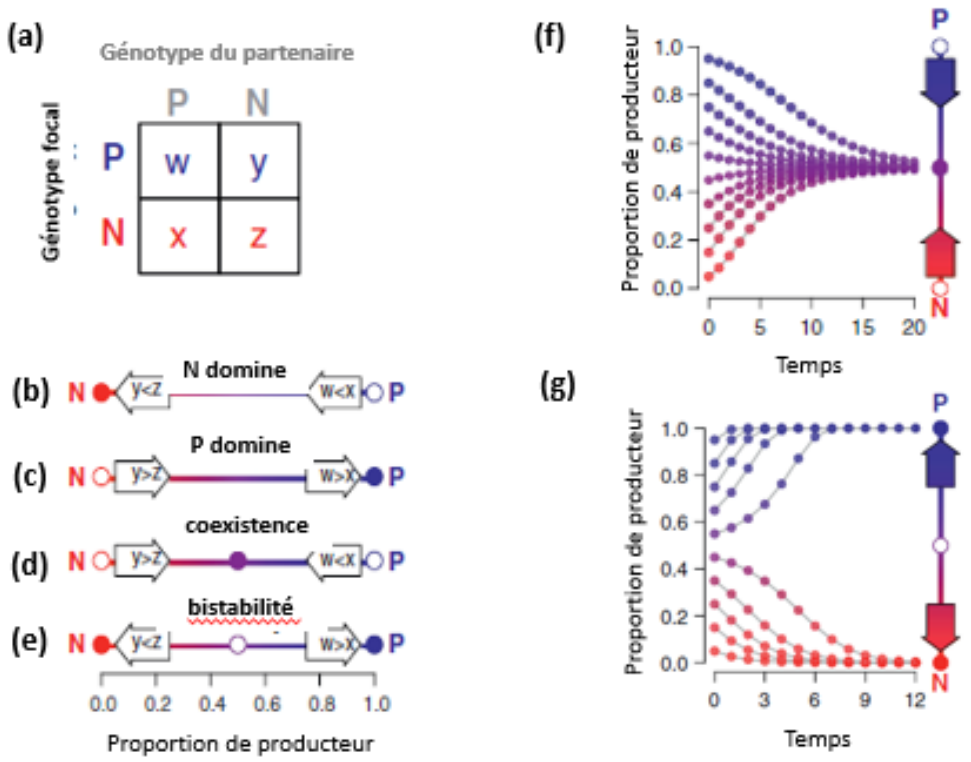


Figure 1.1.4 – 5

(a) Matrice générale de «fitness» pour un jeu à deux joueurs avec deux stratégies. Le «fitness» d'un individu P (en bleu) est w et y quand il s'apparie avec un partenaire de génotype P et N, respectivement. Le «fitness» d'un individu N (en rouge) est x et z quand il est face à un partenaire P et N, respectivement. (b - e) Quatre stratégies sont évolutionairement stables selon la combinaison de «fitness» de génotypes P et N. Si w < x, N envahit la population de P. Si y > z, P envahit la population de N. Inversement, si w > x ou y < z, P ou N, respectivement, sont les ESS. (b) Pour « le Dilemme du Prisonnier", la fixation de P est instable et la seule ESS stable s'avère être N. (c) Quand les inégalités de «fitness» sont inversées, le P est la seule ESS. (d et f) Quand les deux stratégies sont évolutionairement instables, une coexistence est possible. (e et g) Quand les deux stratégies sont évolutionairement stables, chaque stratégie peut dominer en fonction de la proportion initiale de P qui dépasse ou non un état d'équilibre instable. Cette dynamique est appelée bi-stabilité (d'après Conlin et al., 2014).

Si l'on s'intéresse à l'exemple de la production d'une molécule antimicrobienne, on aboutit à un modèle de « Jeu mortel dans lequel il faut choisir son camp ». Dans le cas le plus simple, la souche qui possède des gènes de bactériocine, héberge aussi des gènes d'immunité contre celle-ci. La souche non productrice ne possède aucun des deux et donc ne subit pas les coûts qui y sont associés. Dans une population mixte de producteurs et de non producteurs, la bactériocine tue uniquement les non producteurs. Comme les producteurs sont en compétition avec les non producteurs pour des ressources limitées, les producteurs s'entraident en éliminant les compétiteurs mutuels. Le bénéfice pour leur «fitness» peut donc ici être direct et indirect et la bactériocine est un « bien commun »

indirect. Dans l'étude sur la production de colicine chez *E. coli*, il a été montré que le résultat de cette compétition entre le producteur et le non producteur sensible dépend de la proportion du producteur. La production s'avère avantageuse uniquement si les producteurs sont relativement fréquents (>2 %). Si les producteurs sont trop rares, le coût de la production dépasse le bénéfice qui peut en être retiré. On aboutit donc à une dynamique bi-stable (Figure 1.1.4 – 6) (Chao and Levin, 1981; Conlin et al., 2014).

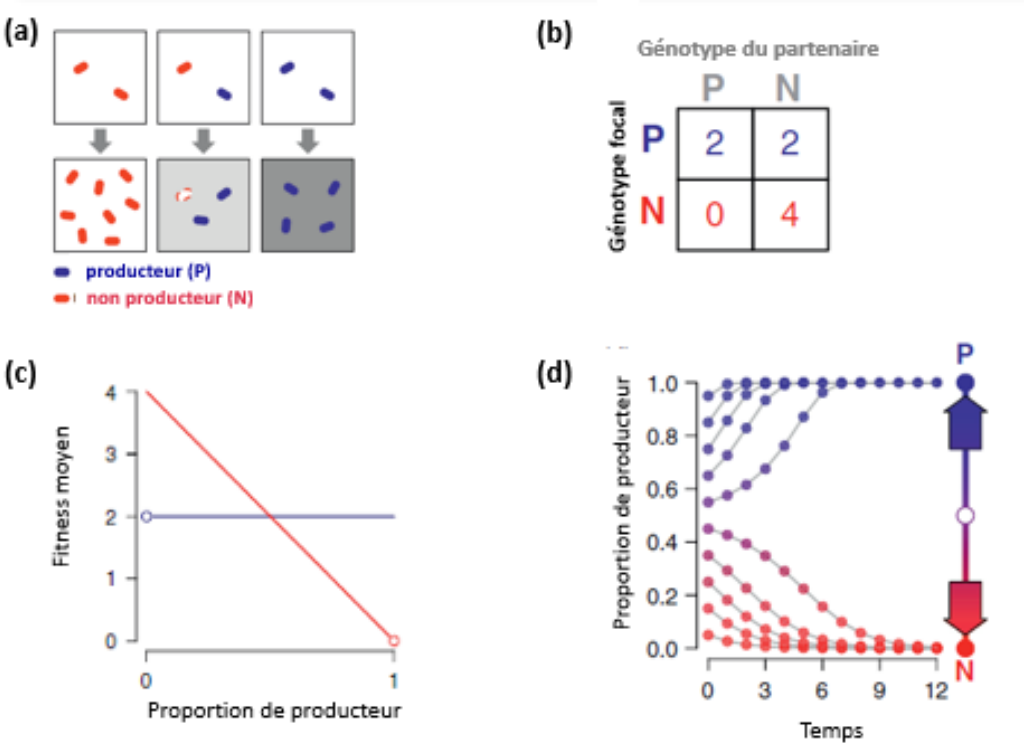


Figure 1.1.4 – 6

Choisir son camp. (a) Représentation de deux génotypes : producteurs de bactériocine pour laquelle ils sont immunisés (cellules bleues) et non producteurs, sensibles à la bactériocine (cellules rouges). Trois types d'interactions deux à deux sont possibles (carrés du haut) et donnent trois résultats différents (carrés du bas). L'intensité de la couleur grise dans les carrés du bas symbolise la concentration en bactériocine dans l'environnement. Le producteur subit le coût de production et a donc un moindre «fitness» quand il est face à d'autres producteurs que le non producteur quand il est face à un autre non producteur. (b) Matrice de «fitness» pour cette interaction. Le producteur a un «fitness» plus grand quand le partenaire est un producteur (première colonne), tandis que le non producteur a un «fitness» plus grand quand il est face à un non producteur (deuxième colonne). (c) Prédiction de «fitness» moyens pour chacun de génotypes en cas d'appariement aléatoire. Le point où les lignes bleue et rouge se croisent est un point d'équilibre. (d) Dynamique de population prédite pour ce modèle de jeu. La proportion de producteurs augmente quand les producteurs sont fréquents et diminue quand les producteurs sont rares. L'équilibre interne est instable et il existe deux stratégies évolutionairement stables (ESS), production ou non production.

En appliquant les principes de théories de jeux, Gardner et al., 2004 ont étudié comment le degré de parenté (*r*) influence la probabilité de production de bactériocines. On considère un mélange bactérien comprenant n lignées tirées d'une population de bactéries se reproduisant asexuellement. Dans ce mélange, une proportion r=1/n de bactéries sera un clone (*kin*) et les autres 1 – r individus seront dérivés d'autres lignées non apparentées (*non-kin*). Selon la modélisation des auteurs, la production de bactériocine est favorisée à de degrés de parenté intermédiaires (Figure 1.1.4 – 7). En effet, la stratégie évolutionairement stable de production de bactériocine (y*) est égale à 0 pour des degrés de parenté r = 0 ou r = 1 et est maximale pour des valeurs de r intermédiaires. Quand la lignée focale clonale, productrice de bactériocine, est peu fréquente ($r \rightarrow 0$), l'impact de la bactériocine sur la lignée compétitrice sensible est minimal et ne dépasse pas le coût de sa production. Quand les producteurs sont fréquents ($r \rightarrow 1$), la densité de cellules sensibles à la bactériocine est trop faible et ne permet pas, non plus, d'en retirer un bénéfice suffisant.

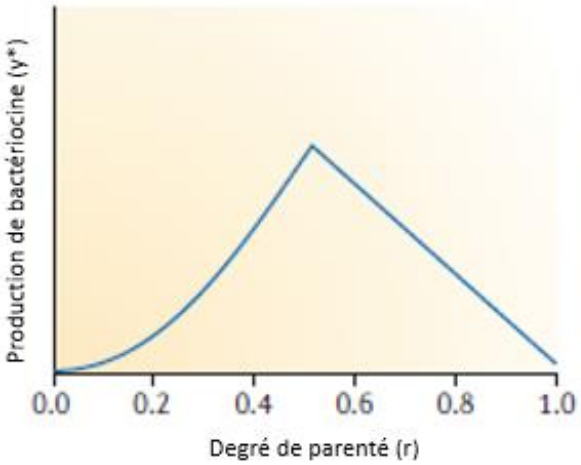


Figure 1.1.4 – 7

Modélisation des stratégies évolutionairement stables de production de bactériocine (y*) en fonction de degré de parenté (r) entre les bactéries (d'après Gardner et al. 2004).

Les modèles de jeu peuvent rapidement devenir plus complexes si on envisage l'introduction de nouvelles stratégies. Ceci implique rajout de lignes et de colonnes dans la matrice de «fitness». Par exemple, des mutants résistants à la bactériocine peuvent émerger dans la population. Leur «fitness» est intermédiaire entre les souches sensibles et les souches productrices. On aboutit à un modèle analogue au jeu de « Pierre-papier-ciseaux » avec une dynamique cyclique stable (Figure 1.1.4 – 8). La population sensible dépasse la population résistante, les souches résistantes dépassent les souches productrices et les souches productrices (quand elles sont suffisamment fréquentes), dépassent les souches sensibles (Bergstrom and Kerr, 2015; Conlin et al., 2014). Dans un autre modèle, où la

bactériocine diffuse facilement dans le milieu, la souche résistante est la plus favorisée et finit par envahir la population, ce qui donne une dynamique cyclique instable de la population (Figure 1.1.4 – 9a) (Kerr et al., 2002).

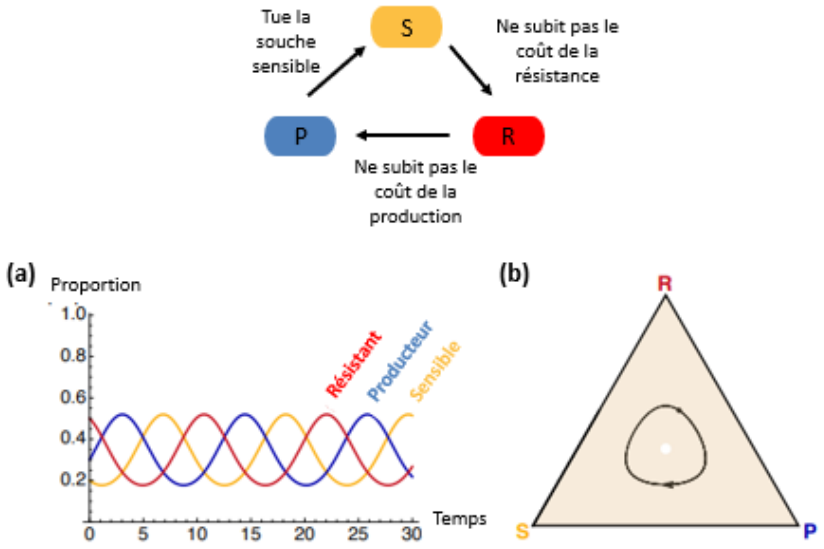


Figure 1.1.4 – 8

Exemple d'une dynamique neutre dans un jeu de type « Pierre-papier-ciseaux ». Trois stratégies sont possibles : P – producteur de la bactériocine, S – sensible à la bactériocine, R – résistant à la bactériocine. (a) Variation des proportions de différents génotypes au cours du temps dans les appariements deux à deux de manière aléatoire. (b) Représentation simplexe des proportions pour chacune des stratégies. Plus on se rapproche de chaque coin, plus le génotype donné est fréquent. Le point gris indique les conditions initiales du graphe (a). La dynamique est représentée par la trajectoire dont le sens est indiqué par la flèche (le « flux » dans le simplexe) (d'après Bergstrom and Kerr, 2015).

Les exemples présentés ci-dessus assument que les cellules se trouvent dans des conditions de mélange, dans lequel la molécule antimicrobienne est distribuée de manière uniforme dans l'ensemble de la population. Cependant, les microorganismes vivent souvent dans des biofilms qui limitent la diffusion de produits. Des interactions locales peuvent alors complètement modifier la dynamique de la population. Par exemple, Kerr et al., (2002) ont montré que la structure spatiale peut promouvoir le maintien de la diversité dans une communauté de type « Pierre-papier-ciseaux ». Dans une culture en agitation continue, on aboutissait à une dynamique cyclique instable (Figure 1.1.4 – 9a). Cependant, dans un habitat structuré (ex. surface d'une gélose), la diffusion locale du produit a donné lieu à des patchs de cellules d'un génotype donné. Ces patchs « se poursuivaient » mutuellement selon les règles du jeu « Pierre-papier-ciseaux » (Figure 1.2.4 – 9b et c).

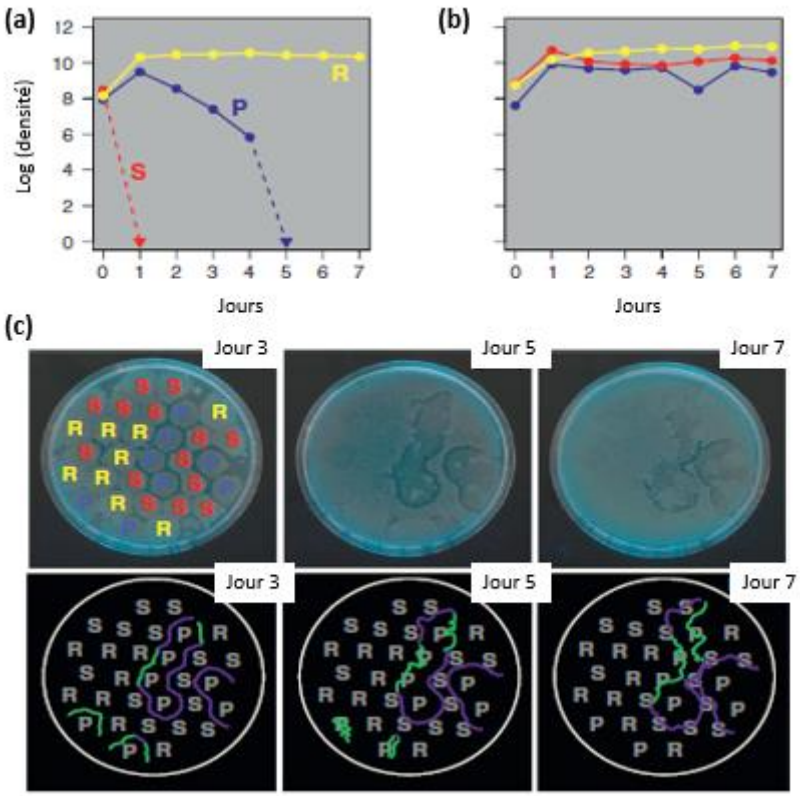


Figure 1.1.4 – 9

Expérience de Kerr et al. (2002). (a) Dans une culture liquide bien agitée, la souche sensible non productrice (S) est rapidement éliminée (car la bactériocine est omniprésente), puis le producteur (P) est distancé par la souche résistante (R) qui a un «fitness» supérieur, car elle ne subit pas le coût de la production de bactériocine. (b) Les trois génotypes sont maintenus à des fortes densités quand la communauté microbienne est propagée sur un milieu gélosé. (c) La gélose sur laquelle on a propagé un mélange de P, S et R a été photographiée à J3, J5 et J7 (rangée du haut). Le changement de la configuration spatiale des communautés est schématisé dans la rangée du bas. Les interfaces où P « poursuit » S sont indiquées en violet et les interfaces où R « poursuit » P sont indiquées en vert.

1.1.4.3 Quel habitat sélectionne les comportements antagonistes ?

1.1.4.3.1 Culture continue *versus* culture en batch : le modèle de prédation intraguilde

La majorité d'études sur le rôle écologique de molécules antagonistes s'appuyait sur le modèle de colicines. Leur rôle social a été décrit comme un exemple de « malveillance » (interaction sociale qui nuit aussi bien au receveur qu'à l'acteur) car le producteur de colicine meurt en libérant les molécules. Ce modèle mène à une relation de type « Pierre-papier-ciseaux ». Le coût sur le «fitness» dû à la production des colicines donne un avantage aux mutants résistants. Cependant la résistance

entraînant aussi un certain coût, les souches sensibles auront un taux de croissance supérieur aux individus résistants. Enfin les souches sensibles seront tuées par les colicines, ce qui referme le cercle de la relation « Pierre-papier-ciseaux » (cf. paragraphes 1.1.4.1 et 1.1.4.2). Ces relations donnent lieu à une « course aux armements » à l'origine d'une grande variété de colicines. Dans des habitats structurés, une biodiversité de trois types de cellules (producteurs, sensibles et résistants) sera maintenue, tandis que dans un environnement homogène, on observera une sélection dépendante de la fréquence initiale de chacun des génotypes (Leisner & Haaber 2012).

Ce modèle de sélection ne peut pas être généralisé aux autres producteurs de bactériocines, tels que les bactéries lactiques (LAB – *Lactic Acid Bacteria*). Les LAB sont des bactéries à Gram positif retrouvées dans l'environnement et utilisées dans la production d'aliments fermentés. Elles produisent de nombreuses bactériocines qui sont actives contre d'autres bactéries à Gram positif. Les propriétés des bactériocines de LAB diffèrent de ce qui est connu pour les colicines d'*E. coli.* Par exemple, les bactériocines de LAB ont des spectres d'activité relativement larges et leur libération ne nécessite pas de sacrifice de producteur.

Le modèle « Pierre-papier-ciseaux » des colicines s'applique aux habitats de type « culture continue », avec un accès aisé aux nutriments. C'est le cas pour le milieu intestinal dans lequel *E. coli* est retrouvé. Dans ce type d'environnement, le succès dépend surtout d'une prolifération rapide, alors que la production de bactériocines présente une importance bien moindre.

L'habitat de bactéries lactiques est, quant à lui, un exemple de « culture en batch ». Les LAB vivent principalement sur des matériaux biologiques en décomposition. Ce type d'habitats présente deux conditions très différentes. Dans un premier temps, on est dans une situation d'abondance de substrats, dans lesquelles les LAB et les autres microorganismes présentent une croissance exponentielle. Cette phase est suivie par des conditions de carence nutritionnelle, dans laquelle on est face à un « goulot d'étranglement » où les microorganismes se retrouvent en phase stationnaire de croissance puis meurent. Ces conditions sont en plus détériorées par l'accumulation de produits de métabolisme qui rendent le milieu encore moins favorable (ex. diminution de pH par de l'acide lactique). Dans les conditions naturelles, on passe habituellement par plusieurs phases de « goulot d'étranglement » entrecoupées par de brèves périodes de multiplication de souches le mieux adaptées. La pression de sélection dans ce type d'habitat va sélectionner des souches qui ont les meilleures capacités de survie (la mortalité la plus faible), contrairement aux conditions de « culture continue » qui sélectionnent les meilleurs reproducteurs (Leisner and Haaber, 2012).

Dans des conditions de carence nutritionnelle, les bactériocines de LAB peuvent améliorer la survie des producteurs en provoquant une lyse de souches sensibles, ce qui donne de nouveau l'accès

aux nutriments. Lors de la succession de « goulots d'étranglement », les producteurs peuvent rencontrer des lignées de cellules cibles très variables. C'est pourquoi, les bactériocines des LAB présentent en général des spectres d'activité relativement larges. Leisner et Haaber (2012) suggèrent que la production de bactériocines par les LAB est un exemple de modèle écologique de prédation intraguilde (IGP – *intraguild predation*). L'IGP est une combinaison de compétition et de prédation, dans laquelle le prédateur intraguilde tue et consomme sa proie, qui utilise souvent les mêmes ressources limitantes que son prédateur. Dans ce modèle, il est assumé que le coût de production de bactériocine est inférieur aux bénéfices qu'en tire le prédateur. Cela nécessite que la bactériocine soit produite dans la phase stationnaire de croissance, pour assurer que sa concentration soit suffisamment élevée, afin de toucher un maximum de souches sensibles. La production tardive est en effet décrite pour la majorité de bactériocines des LAB. Le modèle de prédation intraguilde ressemble aux phénomènes de cannibalisme décrit chez *B. subtilis* et de fratricide connus chez *S. pneumoniae* (cf. paragraphe 1.1.2.2). Ces deux phénomènes touchent cependant des individus de la même espèce, contrairement à la prédation intraguilde, qui présente un éventail de proies beaucoup plus large (Figure 1.1.4 - 10).

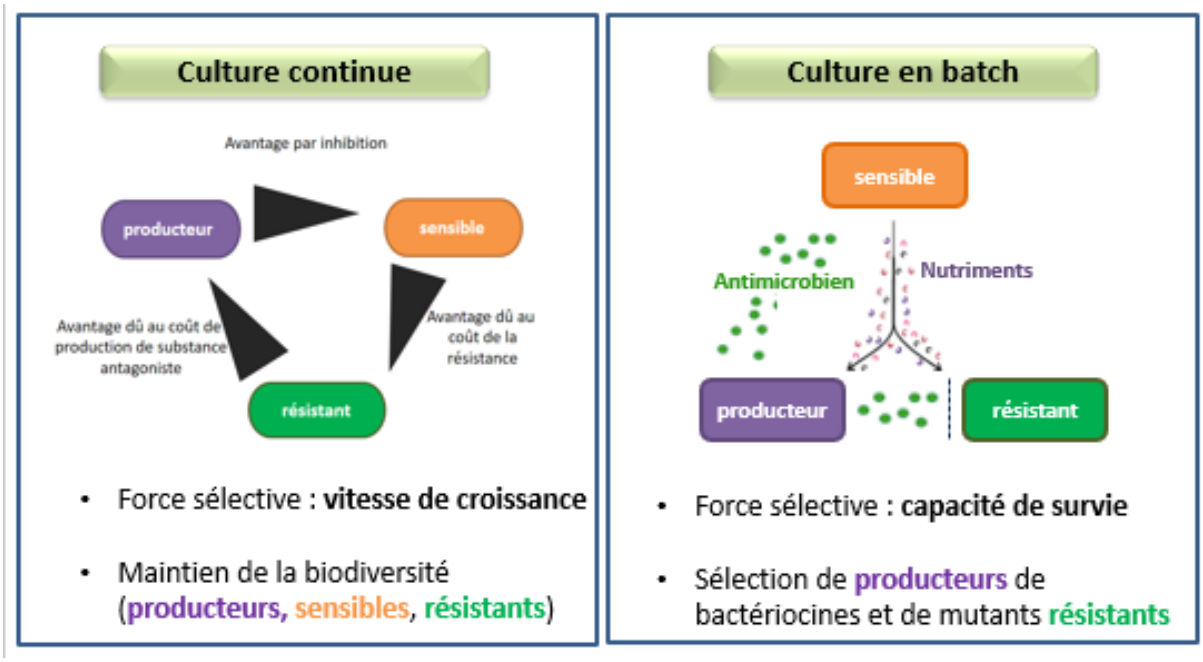


Figure 1.1.4 – 10

Comparaison de forces sélectives dans une culture continue et dans une culture en batch (d'après Leisner & Haaber, 2012; Leisner et al., 2016)

La prédation intraguilde est un modèle intéressant pour les écologistes, car elle combine tous les types de compétition décrits dans le chapitre 1.1.2, à savoir la compétition par exploitation, la compétition par interférence et la prédation. Dans le contexte d'interactions sociales, l'IGP peut être

considérée comme un exemple d'égoïsme du prédateur. Cependant, en présence de souches résistantes à la bactériocine, on aboutit plutôt à une relation d'altruisme (Leisner and Haaber, 2012). En effet, outre la sélection de producteurs de bactériocines, la prédation intraguilde peut aussi favoriser la survie des « tricheurs » résistants, qui profitent des nutriments libérés par les cellules lysées par les bactériocines sans subir le coût de la production. Ce modèle pourrait expliquer pourquoi la résistance aux antimicrobiens est un phénomène ancien, bien antérieur à l'utilisation anthropogène d'antibiotiques (Leisner et al., 2016).

1.1.4.3.2 Habitat sélectif versus habitat peu sélectif

Certains auteurs émettent l'hypothèse que les microorganismes sont capables d'adapter leur réponse au type de danger auquel ils sont confrontés. Ce phénomène est appelé « détection de la compétition » (*competition sensing*) (Cornforth and Foster, 2013). Il est défini comme une réponse physiologique qui détecte les dommages causés par d'autres cellules et qui a évolué, au moins partiellement, à cause de cet effet. Les individus vont contre-attaquer quand ils détectent une compétition écologique, mais non quand le stress est de nature abiotique (stress osmotique ou température). En effet, la production de bactériocines et d'antibiotiques est souvent induite par une limitation de ressources nutritionnelles (compétition par exploitation) ou par une agression directe sur la cellule (compétition par interférence). Les signaux de stress abiotiques, quant à eux, ne déclenchent pas ce type de réponses (Cornforth and Foster, 2013). On pourrait donc spéculer que les habitats très sélectifs, ayant un grand nombre de stress abiotiques, sélectionneraient des génotypes sur la base de leur capacité de survie à ces stress et non pas sur leur capacité compétitive.

La connaissance des mécanismes écologiques pouvant influencer la sélection de souches productrices de bactériocines permet de mieux appréhender la compétition par interférence dans le modèle de propionibactéries, que nous avons choisi pour ces travaux de thèse.

1.2 Bactéries propioniques comme source potentielle de molécules antagonistes

Les propionibactéries appartiennent à la classe des *Actinobacteria*, groupe des bactéries à Gram positif à fort pourcentage de bases G-C (Goodfellow et al., 2012). Les *Actinobacteria* regroupent des

espèces d'environnements très divers, dont de nombreuses souches issues du sol et connues pour la production d'un grand nombre de métabolites spécialisés, notamment d'antimicrobiens (ex. *Streptomyces* spp.).

Les propionibactéries se présentent sous forme de bacilles ou cocci à Gram positif, pléomorphes, immobiles et non sporulées. Les cellules peuvent se regrouper en paires ou courtes chaînes et adopter des configurations de type « lettres chinoises ». La majorité des espèces présente une croissance optimale dans des conditions anaérobies à 30 – 37 °C, mais les souches ont aussi une certaine aérotolérance. Le caractère distinctif de ce groupe bactérien est la production de grandes quantités d'acide propionique et d'acide acétique comme produits finaux du métabolisme (Goodfellow et al., 2012)

Une description détaillée de ce groupe bactérien et de son potentiel antagoniste fera l'objet des sous-chapitres suivants.

1.2.1 Taxonomie des « propionibactéries »

Le genre *Propionibacterium* a été décrit au début du XXème siècle par Orla-Jensen et Von Freudenreich et regroupe les espèces de bacilles à Gram positif issus de fromages de type Suisse, produisant de l'acide propionique comme produit final de fermentation (Goodfellow et al., 2012; Orla-Jensen, 1909).

Au sein du genre *Propionibacterium*, on distinguait traditionnellement deux groupes sur la base de leurs biotopes naturels : *Propionibacterium* sp. « classiques » ou laitiers et *Propionibacterium* sp. « cutanés » (Stackebrandt et al., 2002). Les propionibactéries laitières (*Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium acidipropionici*, *Propionibacterium jensenii* et *Propionibacterium thoenii*) étaient classiquement isolées du lait et des produits laitiers. Des nouvelles espèces, retrouvées dans d'autres habitats, ont aussi été incluses dans ce groupe : *Propionibacterium cyclohexanicum* isolé du jus d'orange fermenté (Kusano et al., 1997), *Propionibacterium microaerophilum* isolé d'effluents d'un pressoir à olives (Koussémon et al., 2001), *Propionibacterium australiense* isolé de lésions granulomateuses bovines (Bernard et al., 2002), *Propionibacterium acidifaciens* isolé de caries dentaires humaines (Downes and Wade, 2009), *Propionibacterium damnosum* et *Propionibacterium olivae* isolés d'olives avariées (Lucena-Padrós et al., 2014) et *Propionibacterium propionicum* (Charfreitag et al., 1988). Enfin, une nouvelle espèce, *Propionibacterium virtanenii*, isolée d'orge malté a récamment été décrite (Deptula et al., 2018). Les propionibactéries cutanées produisent également

de l'acide propionique mais colonisent la peau et les muqueuses des mammifères. On y inclut habituellement *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium avidum* et *Propionibacterium granulosum.* Deux nouvelles espèces « cutanées », nommées *Propionibacterium 'humerusii'* et *Propionibacterium 'namnetense'* ont été décrites récemment par Butler-Wu et al. (2011) et Aubin et al. (2016), mais leurs noms n'ont pas été validés taxonomiquement.

La taxonomie des propionibactéries a récemment été bouleversée par des analyses génomiques approfondies, comparant 162 génomes complets des différentes espèces de ce genre. La nouvelle classification respecte la division de ce groupe selon les habitats naturels, mais propose à présent trois genres bactériens au sein de « propionibactéries classiques » : *Propionibacterium* sp., *Acidipropionibacterium* sp. et *Pseudopropionibacterium* sp. Les espèces de « propionibactéries cutanées » font à présent partie d'un nouveau genre, *Cutibacterium* sp. (Tableau 1.2.1 – 1) (Scholz and Kilian, 2016).

Tableau 1.2.1 – 1

Classification des « propionibactéries »

	« Propionibactéries »			
	Laitières (classiques)			**Cutanées**
Habitats	• Produits laitiers • Ensilage • Tube digestif des ruminants, porcs, volailles			• Peau et muqueuses des mammifères
Genres	***Propionibacterium***	***Acidipropionibacterium***	***Pseudopropionibacterium***	***Cutibacterium***
Espèces	• *P. freudenreichii* • *P. cyclohexanicum* • *P. acidifaciens* • *P. australiense*	• *A. jensenii* • *A. thoenii* • *A. acidipropionici* • *A. microaerophilum* • *A. damnosum* • *A. olivae* • *A. virtanenii*	• *P. propionicum*	• *C. acnes* • *C. avidum* • *C. granulosum* • *'C. humerusii'* • *'C. namnetense'*

L'analyse de l'arbre phylogénétique des propionibactéries montre qu'il existe deux branches majeures au sein de ce groupe. Un clade regroupe les deux espèces du genre *Propionibacterium* (*Propionibacterium freudenreichii* et *Propionibacterium acidifaciens*). Le deuxième clade comprend deux sous-groupes monophylétiques, l'un contenant les espèces cutanées du genre *Cutibacterium*, l'autre composé d'espèces « classiques » du genre *Acidipropionibacterium*. Enfin, *Pseudopropionibacterium propionicum* est une espèce à part dans l'évolution des « propionibactéries » (Figure 1.2.1 -1) (Scholz and Kilian, 2016).

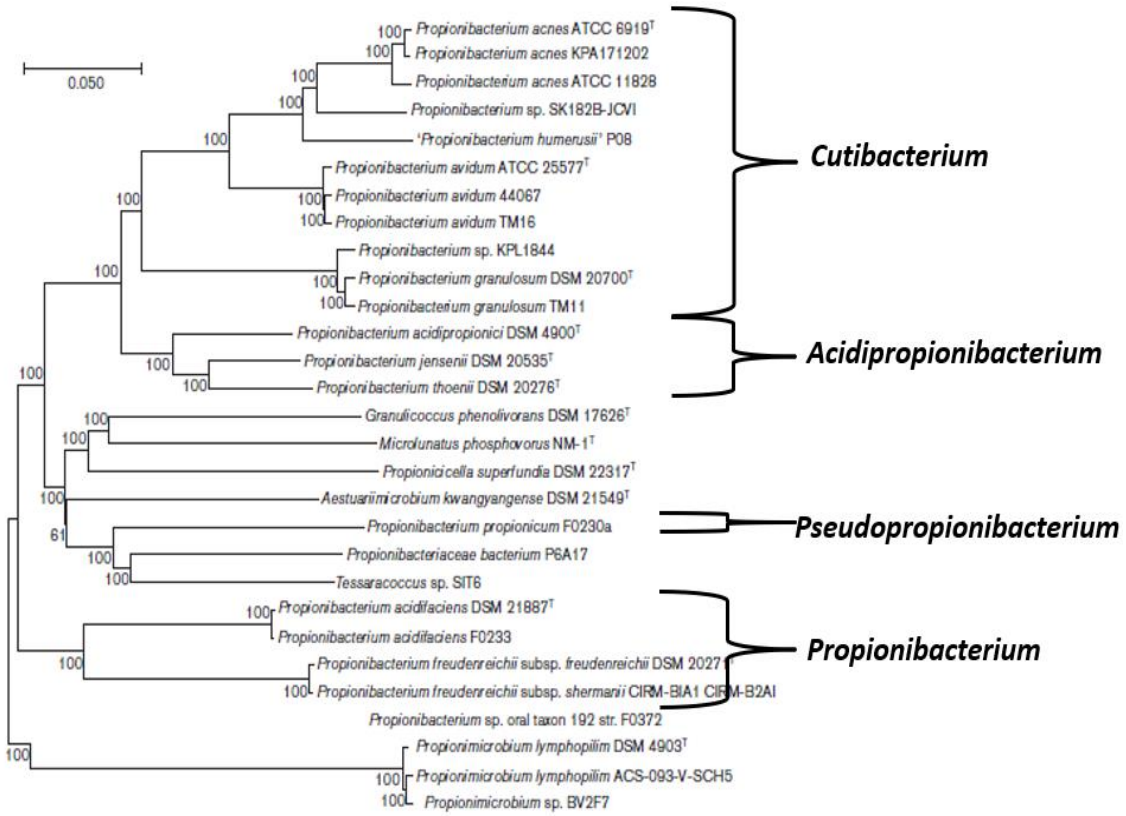


Figure 1.2.1 – 1

Arbre phylogénétique selon la méthode de parcimonie maximale basée sur l'analyse de 50 899 pb de séquences communes parmi 30 génomes de souches appartenant à la famille des *Propionibacteriaceae*. La longueur des lignes horizontales correspond au nombre de substitutions des bases par site (d'après Scholz & Kilian, 2016).

1.2.2 Propionibactéries « cutanées »

C. acnes, *C. avidum*, *C. granulosum*, '*C. humerusii'* et 'C. namnetense' appartiennent au groupe de « propionibactéries cutanées ». Parmi elles, *C. acnes* est l'espèce la plus abondante et la mieux décrite.

Initialement observé par Unna en 1896 à la suite d'une étude de coupes histologiques de comédons d'acné, *C. acnes* a tout d'abord été dénommé *Bacillus acnes* (Gilchrist, 1900) avant d'être classé en 1923 dans le genre *Corynebacterium* sur la base de critères purement morphologiques (Bergey, 1923). Il fut ensuite dénommé *Corynebacterium acnes* ou *Corynebacterium parvum* avant d'être classé en 1946 dans le genre *Propionibacterium* compte tenu de son métabolisme anaérobie conduisant à la fermentation du lactose en acide propionique (Douglas and Gunter, 1946). Il a alors été dénommé *P. acnes* jusqu'en 2016 où il fut renommé *C. acnes* par Scholz & Kilian (Scholz and Kilian, 2016).

C. acnes a été historiquement divisé en trois sous-groupes (type I, II et III) sur la base critères antigéniques (séroagglutination) et métaboliques (fermentation des sucres) (McDowell et al., 2005). A présent, des méthodes de génotypage font état de six groupes phylogénétiques, nommés IA1, IA2, IB, II et III, qui partagent 99,9 % d'identité au niveau de la séquence de l'ADNr 16S, mais peuvent être différenciés de par le polymorphisme de deux gènes, *rec*A et *tly* (codant une hémolysine/cytotoxine) (McDowell, 2017). Le typage a été affiné par d'autres méthodes génétiques : MLST (multi-locus sequence typing), ribotypage et HR-SLST (high resolution – single locus sequence typing). Ces méthodes permettent de mieux comprendre l'implication de différents phylogroupes dans l'équilibre du microbiote cutané et dans les pathologies impliquant *C. acnes* (McDowell, 2017). Il est à présent proposé de diviser le genre *Cutibacterium* en trois sous espèces : *C. acnes* subsp. *acnes* pour le type I, *C. acnes* subsp. *defendens* pour le type II et *C. acnes* subsp. *elongatum* pour le type III (Dekio et al., 2019).

1.2.2.1 Habitat

Les espèces du genre *Cutibacterium* font principalement partie de la flore commensale de la peau mais colonisent également les muqueuses de la cavité oro-pharyngée, de l'intestin et du tractus génito-urinaire.

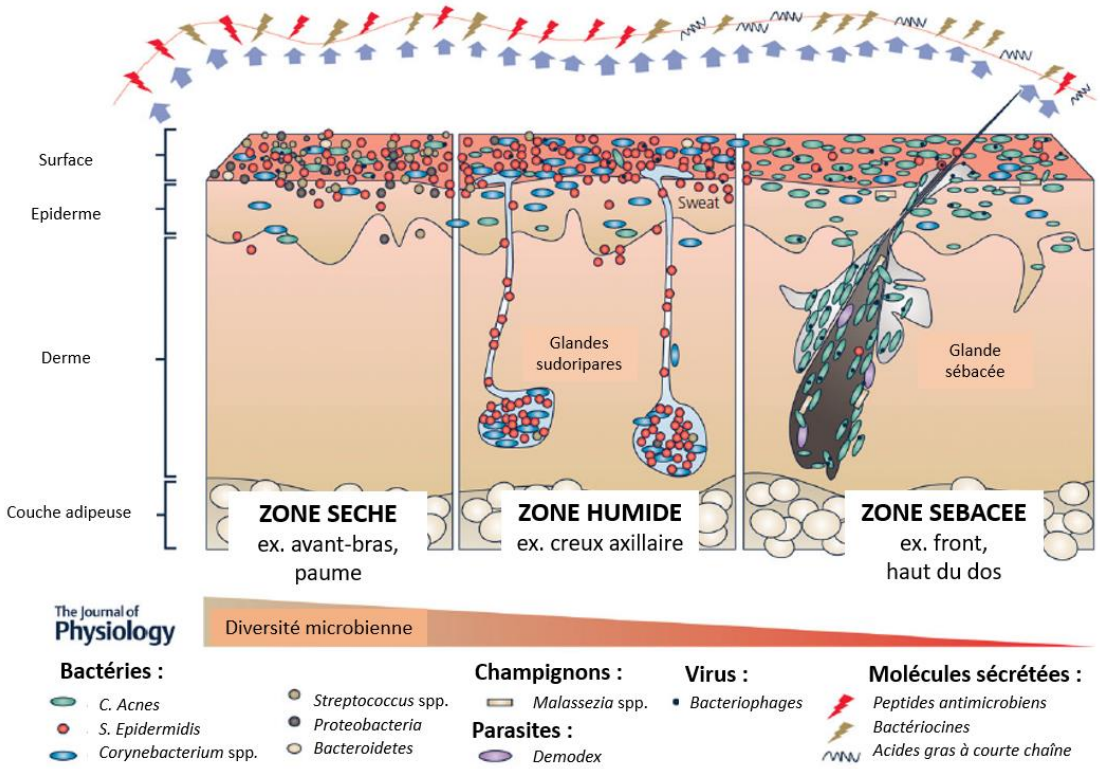


Figure 1.2.2 – 1

Composition du microbiote cutané. *C. acnes* (bacilles représentés en vert) est prédominant au niveau d'unités pilo-sébacées, mais est aussi présent en plus faibles quantités dans d'autres zones de la peau (d'après Barnard and Li, 2017).

Au niveau cutané les espèces du genre *Cutibacterium* sp. (particulièrement *C. acnes*) sont prédominantes dans les régions sébacées (front, partie supérieure du thorax), où elles peuvent atteindre des concentrations allant jusqu'à 10^6 UFC.cm^{-2}. La présence de *Cutibacterium* sp. a également été détectée, à des conconcentrations cependant plus faibles, dans d'autres régions cutanées humides ou sèches (Figure 1.2.2 – 1) (Barnard and Li, 2017; Patel et al., 2009).

Si l'on s'intéresse à l'évolution au sein du genre *Cutibacterium*, *C. granulosum* est l'espèce la plus ancestrale, suivie de *C. avidum*, puis de '*C. humerusii*', et finalement de *C. acnes*, dont le phylotype I est la lignée la plus récente. Scholz & Kilian (2016) envisagent un modèle évolutionnaire selon lequel la colonisation d'un nouvel habitat (peau des mammifères) par les espèces fondatrices a été suivie par une série de clones de mieux en mieux adaptés qui sont progressivement devenus les clones dominants. En effet, des analyses métagénomiques montrent que *C. acnes* constitue jusqu'à 91 % du microbiote de l'unité pilo-sébacée alors que les autres propionibactéries cutanées sont beaucoup moins abondantes : '*C. humerusii*' (2,7 %), *C. granulosum* (1,6 %) et *C. avidum* (0,4 %) (Barnard et al.,

2016). Il est à souligner que d'autres espèces bactériennes sont très minoritaires dans le follicule pileux : *Staphylococcus epidermidis* (0,9 %), *Staphylococcus capitis* (0,4 %), *E. coli* (0,7 %) et *Clostridium* sp. (0,5 %) (cf. chapitre 1.3) (Barnard et al., 2016).

1.2.2.2 Caractéristiques physiologiques

1.2.2.2.1 Caractéristiques générales

Les souches de *C. acnes* se présentent habituellement sous forme de bacilles irréguliers, corynéformes, mais les souches de phylogroupe II peuvent être coccoïdes, tandis que les souches de phylogroupe III peuvent former des longs filaments (Goodfellow et al., 2012).

C. acnes est considéré comme une espèce anaérobie, hébergeant des gènes de respiration anaérobie dont des gènes codant une nitrate réductase. Il peut toutefois tolérer l'oxygène, jusqu'à une saturation de 100 % pendant plusieurs heures, en raison d'une production d'une catalase, d'une superoxyde dismutase et de méthionine sulfoxide réductases (Brüggemann et al., 2004; Cove et al., 1983). La présence d'oxygène ralentit cependant sa croissance. *In vitro*, *C. acnes* peut survivre pendant 8 mois en anaérobiose sans subcultures, ce qui suggère qu'il est aussi capable de survivre pendant de longues périodes dans les tissus humains ayant un faible potentiel d'oxydation (Csukás et al., 2004). De plus, les données génomiques et transcriptomiques montrent que *C. acnes* peut aussi exploiter la voie de la phosphorylation oxydative pour produire de l'énergie. En effet, la présence et l'expression d'une chaîne oxydative avec deux endoxydases a été détectée par Brzuszkiewicz et al. (2011). On retrouve également des gènes codant des protéines impliquées dans les voies d'Embden-Meyerhof et des pentoses phosphates ainsi que dans le cycle des acides tricarboxyliques (Brüggemann, 2005). *C. acnes* serait donc capable de respiration oxydative, contrairement à *P. freudenreichii*, pour lequel aucun gène codant une oxydase ou une cytochrome c réductase n'a été mis en évidence (Christensen and Brüggemann, 2014; Thierry et al., 2011). Parmi les autres espèces de propionibactéries cutanées, *C. avidum* présente la plus grande aérotolérance, alors que *C. granulosum* est le moins tolérant à l'oxygène (Goodfellow et al., 2012).

C. acnes présente une vitesse de multiplication lente, ce qui oblige, en bactériologie clinique, à prolonger l'incubation des milieux de culture jusqu'à 10-14 jours. En subcultures, une croissance maximale est obtenue après 48 heures d'incubation (Achermann et al., 2014).

1.2.2.2.2 Adaptations à la colonisation de l'habitat cutané

1.2.2.2.2.1 Utilisation des ressources (compétition par exploitation)

Les espèces du genre *Cutibacterium,* particulièrement *C. acnes* colonisent de manière quasi exclusive les follicules pilo-sébacés grâce aux nombreuses adaptations physiologiques liées à l'occupation de cet habitat particulier.

Scholz et Kilian (2016) ont détecté 108 gènes, communs aux *Cutibacterium* sp. et absents chez les propionibactéries laitières. Il a été suggéré que ces gènes reflètent l'adaptation des espèces du genre *Cutibacterium* à l'habitat cutané. Les bactéries appartenant au genre *Cutibacterium* sont bien adaptées aux conditions d'anaérobiose relative de par leurs systèmes de respiration anaérobie et leur adaptabilité aux concentrations variables d'oxygène. Ces microorganismes sont également capables de métaboliser les lipides du sébum, composés principalement de triglycérides (~40 %), de par la sécrétion d'une triacylglycérol lipase et de lysophospholipases (Scholz and Kilian, 2016). Il est à souligner que, dans les échantillons de la peau du visage humain, l'abondance de *Cutibacterium* sp. est positivement corrélée avec la quantité de sébum (Mukherjee et al., 2016). Notons aussi que chez les mammifères tels que les souris, les rats et les chiens, qui produisent des faibles quantités de sébum, *C. acnes* est présent en quantités très réduites (Webster et al., 1981). Les *Cutibacterium* sp. exploitent également les protéines cutanées de par la sécrétion de protéases qui libèrent les acides aminés tels que l'arginine (Holland et al., 1979).

Ces bactéries possèdent aussi des gènes codant des sidérophores qui leur permettent d'acquérir du fer, qui est faiblement accessible dans les tissus humains, ce qui constitue un facteur de pathogénie (Brüggemann, 2005). Enfin, d'autres nutriments peuvent également être exploités grâce aux enzymes dégradant les molécules de l'hôte, telles que des endoglycocéramidases, qui peuvent hydrolyser les glycosphingolipides, la sialidase, qui dissocie les sialoglycoconjugats, et la hyaluronate lyase, qui hydrolyse les hyaluronates de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif (Brüggemann, 2005; Lomholt and Kilian, 2010).

.

1.2.2.2.2.2 Molécules antagonistes de *Cutibacterium* sp. (compétition par interférence)

De nombreuses molécules antimicrobiennes produites par les propionibactéries cutanées pourraient jouer un rôle vis-à-vis d'espèces microbiennes non-indigènes, ce qui permettrait de maintenir une stabilité de la flore cutanée résidente de la peau et d'exclure les pathogènes potentiels.

1.2.2.2.2.2.1 Métabolites primaires

Le métabolisme de *Cutibacterium* sp. entraîne l'accumulation d'acides organiques principalement d'acides propionique et acétique, mais aussi iso-valérique, formique, succinique et lactique. Ces produits diminuent le pH cutané, ce qui exerce un effet inhibiteur sur la croissance d'autres microorganismes, tels que *S. pyogenes* ou *S. aureus* (Gribbon et al., 1993). *C. acnes* se protège vis-à-vis de l'acidité en produisant une arginine déiminase. Ce système génère de l'ammoniaque ($NH_3.H_2O$) qui contre l'acidification due aux acides organiques (Christensen and Brüggemann, 2014).

1.2.2.2.2.2.2 Métabolites spécialisés

Quelques molécules ayant des propriétés similaires à des bactériocines ont été décrites chez C. acnes et C. avidum (Tableau 1.2.2 – 1). Fujimura et Nakamura (1978) ont détecté une molécule d'environ 60 kDa, composée de 5 sous-unités, non sécrétée mais obtenue après sonication d'un isolat de C. acnes issu de la plaque dentaire. La molécule, appelée acnécine, présentait une activité bactériostatique vis-à-vis de souches de C. acnes non productrices. Des souches de Streptococcus mutans, Streptococcus mitis, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguis, Actinomyces naeslundii, Actinomyces viscosus, Fusobacterium nucleatum et Staphylococcus aureus testées dans cette étude étaient toutes résistantes à cette molécule (Fujimura and Nakamura, 1978). Ko et al. (1978) ont décrit la sécrétion de substances antimicrobiennes par 8 souches de C. avidum. Ces molécules, non caractérisées du point de vue biochimique, ont été appelées par les auteurs « propionicines ». Elles ont été testées vis-à-vis de 100 souches de C. acnes, C. avidum et C. granulosum. Certaines d'entre elles étaient inhibitrices pour l'ensemble des souches cibles testées. Enfin, une substance bactériostatique de 78 kDa, active vis-à-vis d'anaérobies à Gram positif et à Gram négatif, a été décrite chez un isolat oral de C. acnes par Paul and Booth (1988).

Tableau 1.2.2 – 1

Molécules antibactériennes décrites chez *Cutibacterium* sp.

Molécule	Microorganisme	Taille (Da)	Activité inhibitrice	Référence
Acnecin	*C. acnes* (plaque dentaire)	60 000	Quelques souches de *C. acnes*	Fujimura&Nakamura 1978
Propionicins	*C. avidum* (8 souches)		Testée contre 100 souches de *C. acnes*, *C. granulosum*, *C. avidum*. Certaines propionicines actives contre toutes les cibles testées	Ko et al. 1978
	C. acnes (isolat oral)	78 000	Anaérobies à Gram positif et à Gram négatif	Paul & Booth 1988

L'analyse génomique fait état de plusieurs clusters de gènes de bactériocines au sein de *C. acnes*, localisés sur des îlots génomiques résultant d'une insertion et présents de manière variable dans les génomes des différents phylogroupes (Figure 1.2.2 – 2) (Scholz et al., 2016). L'îlot 26, présent dans les souches du clade IB, contient le cluster codant un thiopeptide similaire à la berninamycine A, synthétisée par *Streptomyces bernensis*. L'îlot 25, présent chez tous les phylogroupes sauf le clade III, code une bactériocine proche de la lactococcine-972 décrite chez *Lactococcus lactis*. L'îlot 07, commun aux souches de type C dans le typage par SLST, contient des gènes liés à la synthèse d'une protéine ressemblant à la streptolysine. L'îlot 60 contient des gènes d'une bactériocine de type thiazolylpeptide. Cet îlot est présent uniquement chez les souches du clade I. Enfin, l'îlot 62 commun aux souches du clade IC, SLST-E, SLST-F et SLST-A ainsi qu'aux souches de *C. avidum* contient des gènes codant un lantibiotique.

Figure 1.2.2 – 2

Arbre phylogénétique construit sur la base de 1.5 Mb de séquences communes de 90 génomes de *C. acnes*. La figure représente les liens entre les clades phylogénétiques majeurs au sein de l'espèce, les sous-types de *C. acnes* issus du schéma de SLST et les sous types obtenus selon le schéma de MLST9. Les colonnes à droite représentent la distribution des indels (îlots génomiques résultants des événements d'insertion/délétion) au sein de différents clades de *C. acnes*. Plusieurs de ces îlots hébergent des gènes de substances antimicrobiennes (cf. texte). Les souches non typées sont notées « NT » et les souches appartenant à des singletons sont notées « Stn » (Scholz et al. 2016).

Il est à noter que l'analyse des clusters de gènes codant des antimicrobiens de différents types (bactériocines et méga-enzymes) a été approfondie et élargie à d'autres espèces de propionibactéries lors de ces travaux de thèse.

1.2.2.2.2.3 Activité immunomodulatrice

C. acnes présente aussi des activités immunomodulatrices. Il est capable d'induire la production des cytokines pro-inflammatoires (interféron γ, IL-1α, IL-6 et tumor necrosis factor-α). Comme pour *S. epidermidis,* l'activation des cellules de défense de l'hôte est effectuée grâce aux récepteurs extracellulaires TLR2 (Jugeau et al., 2005). Il a aussi été montré que *C. acnes* pouvait activer les récepteurs intracellulaires TLR9. Cette activation intracellulaire pourrait être liée à la capacité de *C. acnes* à persister dans les cellules phagocytaires et à retarder sa dégradation dans les phagosomes (Mak et al., 2012; Shinohara et al., 2013).

1.2.2.2.3 Rôle pathogène de *Cutibacterium acnes*

Les bactéries appartenant au genre *Cutibacterium* participent au maintien de l'équilibre de la flore cutanée par des mécanismes de compétition mais présentent également un potentiel pathogène opportuniste. Pour ce qui concerne *C. acnes* il a été suggéré que ce pouvoir pathogène serait principalement liée à sa capacité à former des biofilms en regard des surfaces naturelles ou articifielles (prothèses, cathéters …) présentes chez l'hôte. Au sein du biofilm, les bactéries modifient leur métabolisme et sont notamment protégées de la phagocytose et de l'activité des substances antimicrobiennes. La formation du biofilm dans le follicule pilosébacé pourrait également agir comme une « colle » participant à la formation des comédons (Achermann et al., 2014).

Le génome de *C. acnes* héberge plusieurs clusters de gènes impliqués dans la synthèse de polysaccharides extracellulaires et de protéines d'adhésion (comme la protéine liant la fibronectine) impliqués dans la formation des biofilms (Yu JL et al., 1997). La présence de gènes codant des hémolysines et des cytotoxines [facteur Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP), hémolysine III] ainsi que celle de gènes codant diverses enzymes dégradant les tissus de l'hôte (GehA lipase, lysophospholipase, hyaluronate lyase, endoglycocéramidase, etc.) pourraient aussi contribuer à la virulence de *C. acnes* (Achermann et al., 2014; Aubin et al., 2014).

C. acnes a été associé de longue date à la physiopathologie de l'*acné vulgaris* qui touche jusqu'à 80 % de la population adolescente. Dans cette pathologie, la formation de comédons et

l'inflammation cutanée sont liées à un dysfonctionnement de l'unité pilosébacée provoquant une sécrétion accrue de sébum et une hyperprolifération de l'épiderme associé à une multiplication de *C. acnes.* L'analyse des génomes de *C. acnes* présents au niveau cutané révèle qu'il y a une grande diversité de phylogroupes au sein de cette espèce (Fitz-Gibbon et al., 2013; McDowell, 2017; Tomida et al., 2013) (Figure 1.2.2-2 et Figure 1.2.2 – 3).

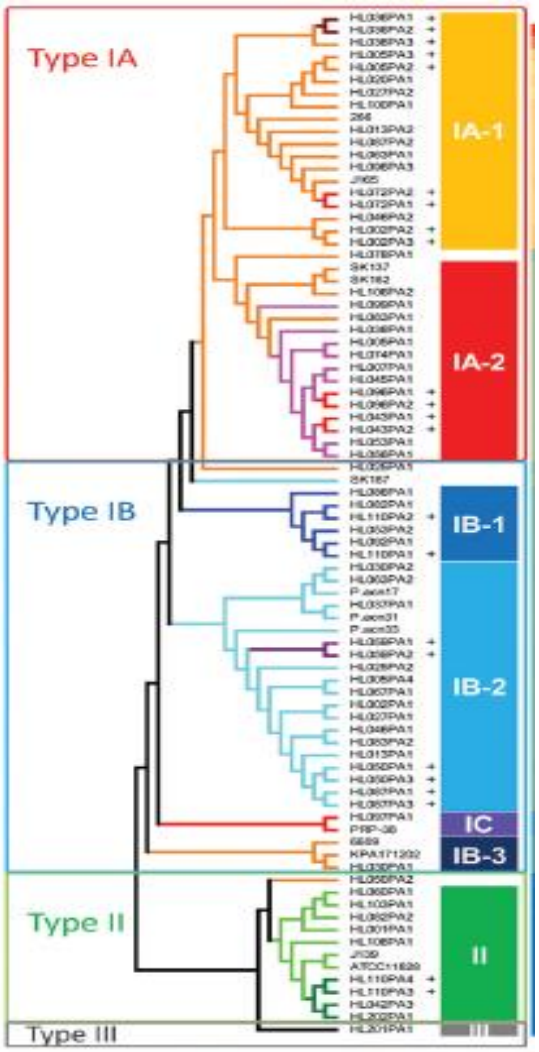


Figure 1.2.2 – 3

Arbre phylogénétique de 82 souches de *C. acnes* isolées de la peau de patients sains et acnéiques. L'arbre a été construit en se basant sur les SNP (single nucleotide polymoprhisms) des régions core du génome (Tomida et al., 2013).

Parmi ces phylogroupes, il a été montré dans plusieurs études que le phylogroupe IA1 était fortement associé avec l'acné, ce qui pourrait être expliqué par le fait que les souches appartenant à ce phylogroupe présentent un potentiel pro-inflammatoire accru lié à la production d'enzymes

dégradant les tissus de l'hôte et à leurs activités hémolytiques et cytotoxiques (McDowell, 2017; McDowell et al., 2013).

Hormis l'acné, *C. acnes* pourrait aussi être impliqué dans d'autres processus inflammatoires comme la sarcoïdose (Eishi, 2013), le syndrome SAPHO (*synovitis, acne, pustulosis, hyperostois, osteitis*) (Zimmermann and Curtis, 2019) et des lésions inflammatoires prostatiques pré-cancéreuses (Davidsson et al., 2016; Drott et al., 2010).

Chez l'Homme, *C. acnes* est également une cause d'infections plus souvent associées aux soins. Parmi ces infections, les infections postopératoires à *C. acnes* sont de plus en plus documentées, notamment après des interventions neurochirurgicales, ophtalmologiques et orthopédiques. *C. acnes* est fréquemment impliqué dans des infections liées à la présence de matériels étrangers, tels que les prothèses articulaires (notamment de l'épaule), les dérivations externes, les valves cardiaques prothétiques et les prothèses mammaires. Ainsi, *C. acnes* (principalement de phylogroupe IB) est identifié dans 10 % des infections de prothèses articulaires, mais cette proportion pourrait être sous-estimée. Dans les infections neuroméningées survenant chez des patients porteurs de dérivations ventriculaires externes, *C. acnes* est isolé dans 1,5 à 38 % des cas (Aubin et al., 2014). Les infections à *C. acnes* présentent en général une grande latence, compte tenu de la multiplication lente de ce microorganisme. Dans les infections sur prothèses, le délai d'apparition des signes cliniques est en général de 3 à 24 mois après l'implantation. Ces infections sont en général peu bruyantes, vu le faible inoculum bactérien et le potentiel de virulence réduit par rapport aux pathogènes classiques. C'est pourquoi, la distinction entre une contamination du prélèvement et une vraie infection à *C. acnes* reste souvent difficile (Aubin et al., 2014; Perry and Lambert, 2011). Les infections à *C. acnes* nécessitent souvent un traitement antibiotique prolongé. La capacité de ce microorganisme à produire un biofilm peut exiger d'utiliser des antibiotiques ayant une activité anti-biofilm comme la rifampicine. La clindamycine présente un intérêt dans les infections ostéo-articulaires, grâce à sa bonne pénétration osseuse. *C. acnes* est en général sensible à de nombreux antibiotiques (ß-lactamines, glycopeptides, daptomycine). Cependant, la proportion de *C. acnes* résistants à au moins un antibiotique a augmenté de 34,5 % en 1991 à 50,5 % en 1999 puis à 55,5 % en 2000 (Achermann et al., 2014; Aubin et al., 2014). La molécule la plus touchée est l'érythromycine, souvent associé à une résistance à la clindamycine. La résistance à la tétracycline est moins courante. De plus, des mutations dans le gène *rpo*B conférant la résistance à la rifampicine ont été récemment rapportées (Achermann et al., 2014; Aubin et al., 2014).

1.2.3 Propionibactéries « laitières »

Parmi les propionibactéries laitières, le mieux connue est *P. freudenreichi,* qui a été décrit il y a plus de 100 ans comme isolat d'un fromage de type Emmental par Orla-Jensen et von Freudenreich (Orla-Jensen, 1909 ; Goodfellow et al., 2012). Ce microorganisme est utilisé comme agent de maturation dans le processus de fabrication des fromages à pâte pressé cuite de type suisse ainsi que dans la production de la vitamine B12 et d'acide propionique. Il est également connu pour ses propriétés de biopréservation des aliments. Enfin, il est de plus en plus étudié dans le contexte de son utilisation en tant que probiotique (Cousin et al., 2011; Rabah et al., 2017).

Le génome de *P. freudenreichii* a une taille de 2,6 Mb et contient 67 % de bases G+C. Les données concernant la biodiversité des souches ont pu être collectées grâce à l'élaboration de typage par MLST de 7 gènes. Il fait état de 46 ST (*Sequence Type*) regroupant de 1 à 11 souches. Ce typage a montré que le « core » génome de *P. freudenreichii* était peu variable et évoluait principalement par des recombinaisons (Dalmasso et al., 2011).

P. freudenreichii a été historiquement divisé en deux sous espèces sur la base de deux caractères biochimiques : *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii,* qui réduit les nitrates et ne fermente pas le lactose et *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, qui a les propriétés opposées (Goodfellow et al., 2012). Cette division n'est pas valide selon les dernières analyses. En effet, la comparaison des génomes complets montre que les gènes responsables de la fermentation du lactose sont localisés sur un transposon et que le locus codant la nitrate réductase comporte des pseudo gènes (Loux et al., 2015). Ceci peut donner au final quatre phénotypes qui ne suivent pas l'histoire phylogénétique de l'espèce. Il a donc été confirmé que la division de *P. freudenreichii* en sous espèces n'était plus valide (Scholz and Kilian, 2016).

1.2.3.1 Habitat

Les propionibactéries laitières sont présentes dans le lait en faibles concentrations, de 10 à 10^4 UFC.mL^{-1}. Ces bactéries proviennent le plus probablement de la contamination environnementale, car les propionibactéries sont retrouvées dans la panse des vaches et dans leurs déjections, dans l'herbe, le sol, sur des machines de traite etc... Il faut noter que d'autres types d'environnements n'ont pas été étudiés quant à la présence de propionibactéries laitières (Thierry et al., 2011).

Les propionibactéries peuvent être retrouvées dans différentes variétés de fromages, sans y avoir été ajoutées délibérément, à des concentrations comprises entre 10^2 et 10^4 UFC.mL^{-1} (Thierry et al., 2011).

Le processus de fabrication des fromages de type suisse présente des conditions de croissance très sélectives pour les propionibactéries. Dans un premier temps, *Lactobacillus delbrueckii* et *Streptococcus thermophilus* (et éventuellement *Lactobacillus helveticus*) sont ajoutés comme ferments. Leur catabolisme homofermentaire transforme le lactose en acide lactique contribuant à la coagulation du lait. En même temps, *P. freudenreichii* est ajouté pour l'affinage ultérieur. La pâte est décaillée puis cuite à des températures hautes, voisines de 52 - 54 °C pendant des durées variables. L'égouttage est renforcé par le pressage. Pendant ces étapes, la température du fromage se maintient à 50 °C pendant plusieurs heures avant de descendre à 30 °C. Ces étapes éliminent le lactosérum et les microorganismes associés. Elles sont suivies de salage à température basse, voisine de 12 °C, puis par la maturation froide pendant des durées variables à des température voisines de 12 – 15 °C et enfin par la maturation chaude pendant au moins 30 jours en chambre chaude à environ 23 °C.

L'augmentation de la température est nécessaire pour initier la fermentation propionique de *P. freudenreichii*. Cette fermentation permet le développement du goût du fromage ainsi que l'apparition des trous (des yeux) due à la libération du CO_2. Quand le développement et la taille des trous est celle désirée, la température de stockage est baissée à 10 – 13 °C, ce qui ralentit la vitesse de fermentation propionique. *P. freudenreichii* est donc ajouté comme agent de maturation dans l'étape précédant la cuisson du fromage de type suisse. Cette bactérie se multiplie avec un temps de génération de 24 à 48 heures. Après 30 jours, sa population atteint 10^9 UFC.g^{-1} de fromage et se maintient à ce niveau durant toute la phase finale de maturation (Beuvier and Duboz, 2013).

Les conditions de fabrication de fromage de type suisse peuvent être assimilées à un habitat très sélectif. On a tout d'abord des conditions de culture en batch, avec une abondance des nutriments en début de fabrication suivie par un épuisement des ressources. Les facteurs abiotiques sont très stringents : faible pH, concentration relativement élevée en NaCl, température de plus de 50 °C pendant plusieurs heures et libération d'ions cuivre du chaudron servant à la cuisson de la pâte. Ceci aboutit à une faible diversité de la population bactérienne dans le produit fini, avec une prédominance des lactobacilles et propionibactéries et de très faibles quantités de streptocoques thermophiles et d'entérocoques (Figure 1.2.3 - 1) (Grappin et al., 1999).

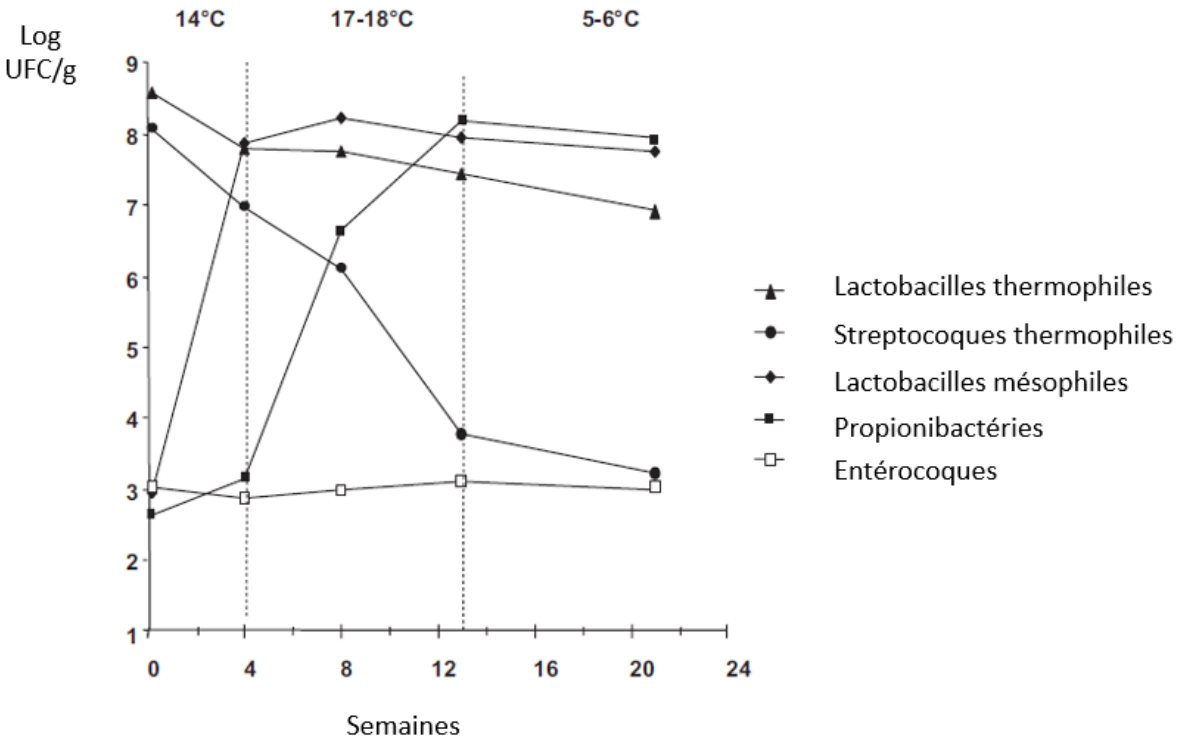


Figure 1.2.3 – 1

Evolution des populations microbiennes durant la maturation du fromage de type suisse (Comté). La concentration des lactobacilles thermophiles (triangles) diminue modérément au cours de la maturation (de 10^9 à 10^7 UFC.g^{-1} de fromage), tandis que celle des lactobacilles mésophiles (losanges) augmente de 10^3 à 10^8 UFC.g^{-1}). La concentration des propionibactéries progresse à partir de 4 semaines d'incubation de 10^3 à 10^8 UFC.g^{-1} (carrés noirs). La concentration des streptocoques thermophiles (ronds) baisse de 10^8 à 10^3 UFC.g^{-1} de fromage à la fin de maturation. On retrouve aussi une faible concentration des entérocoques (carrés blancs), environ 10^3 UFC.g^{-1} de fromage, tout au long de la maturation. Valeurs moyennes issues d'analyse de 20 fromages (Grappin et al., 1999).

1.2.3.2 Caractéristiques physiologiques

1.2.3.2.1 Caractéristiques générales

Les propionibactéries laitières se présentent sous forme de bacilles pléomorphes ou de cocci à Gram positif, en général plus courts et plus épais que les espèces cutanées. Ils peuvent se regrouper par deux ou en courtes chaînes ou amas. Leur morphologie varie avec les conditions et les phases de croissance, notamment durant la phase stationnaire où les cellules sont plus coccoïdes. Les cellules sont immobiles et ne sporulent pas. Certaines souches peuvent produire un matériel extracellulaire

composé de glucides, donnant un aspect de « slime » et non organisé en capsule (Goodfellow et al., 2012, Deutsch et al., 2010, 2012).

Les propionibactéries laitières ont peu de besoins concernant les sources d'azote et peuvent utiliser uniquement le sulfate d'ammonium. Cependant leur croissance est améliorée par une source d'azote organique, comme des peptones ou de l'extrait de levures. Les exigences en vitamines sont similaires à celles des propionibactéries cutanées, qui nécessitent la présence de pantothénate et de biotine. *A. microaerophilum* fait exception à ces exigences et est prototrophe pour les vitamines (Goodfellow et al., 2012).

Les souches laitières ont une respiration anaérobie mais présentent une certaine aérotolérance. Elles sont en général catalase positive. Leur température de croissance optimale est de 30 °C, sauf pour *P. cyclohexanicum* qui a un optimum de croissance à 35 °C. Le pH optimal est de 6 - 7, mais la croissance est possible, bien que ralentie, à des pH plus bas (< 5,5). Les propionibactéries laitières sont classiquement isolées et maintenues sur des milieux « YEL » (*yeast extract-peptone-lactate*). Dans des conditions optimales, leur temps de génération est de 5 à 6 heures. En anaérobiose stricte, elles forment des colonies lenticulaires de 1 à 4 mm en 5 à 6 jours. La couleur des colonies varie de blanc-crème à rouge-marron, selon l'espèce (Goodfellow et al., 2012; Thierry et al., 2011).

1.2.3.2.2 Adaptations à la colonisation des habitats naturels

1.2.3.2.2.1 Métabolisme des propionibactéries (exploitation des ressources)

Le métabolisme des propionibactéries comprend plusieurs voies interconnectées et réversibles (Figure 1.2.3 - 2), leur donnant une capacité à exploiter diverses ressources. Dans l'Emmental, *P. freudenreichii* utilise principalement le lactate (fourni par la fermentation lactique) comme source de carbone. Lactose et galactose peuvent aussi être utilisés par certaines souches s'ils sont présents. Dans l'environnement, beaucoup d'autres substrats peuvent être fermentés par les propionibactéries, comme divers glucides, des polyols (glycérol, érythritol) et certains acides (lactique, pyruvique, glucuronique). Comparé à *P. freudenreichii* et *P. cyclohexanicum,* les *Acidipropionibacterium* sp. (*A. acidipropionici* et *A. microaerophilum*) catabolisent une plus grande variété de substrats.

Les principaux produits finaux de la fermentation propionique sont l'acide propionique et l'acide acétique ainsi que le CO_2. Les proportions de propionate et d'acétate sont modulées pour maintenir une balance redox, en fonction du substrat initial qui est métabolisé. Aspartate et asparagine sont les acides aminés principaux utilisés par les propionibactéries. Leur métabolisme rejoint aussi le cycle de Wood-Werkman (Figure 1.2.3 - 2). Dans l'Emmental, les conditions de pH et de salinité influencent grandement la direction de voies métaboliques et produisent des proportions variables d'acétate/propionate. Ces proportions peuvent être influencées par le fromager pour obtenir des qualités organoleptiques particulières (Thierry et al., 2011).

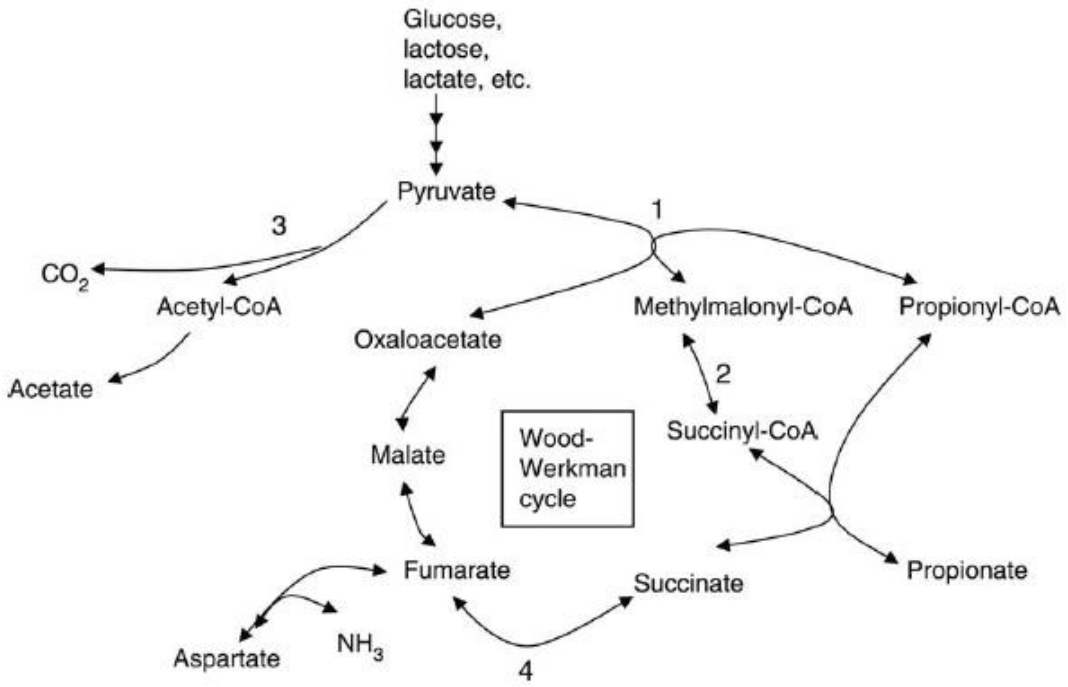


Figure 1.2.3 – 2

Métabolisme carboné central chez les propionibactéries. Divers substrats sont d'abord oxydés en pyruvate via la glycolyse ou via la voie des pentoses phosphates. Le pyruvate peut ensuite être catabolisé par deux voies principales, l'une produisant du propionate, l'autre de l'acétate. La voie du propionate est la plus caractéristique du métabolisme des propionibactéries. Elle comprend un cycle de réactions réversibles appelé le cycle de Wood-Werkman (ou cycle de transcarboxylase). Ce cycle régénère les coenzymes oxydés et génère de l'ATP (d'après Thierry et al., 2011).

Lors de l'étude de gènes acquis et perdus lors de l'adaptation des propionibactéries cutanées à leur nouvel habitat, Scholz et Kilian (2016) ont montré qu'il existe plusieurs gènes conservés uniquement chez les propionibactéries laitières. Ces gènes permettent notamment l'exploitation des ressources telles que les polysaccharides complexes des plantes (ex. gène de lévanase). Ce gène

pourrait donner des propriétés bénéfiques aux souches d'*A. acidipropionici* qui sont ajoutées dans le fourrage, en améliorant l'accessibilité de substrats issus des plantes pour les animaux d'élevage.

1.2.3.2.2.2 Adaptation aux stress et capacités de survie longue durée (compétition par exploitation)

Les propionibactéries laitières de par leur adaptabilité à des paramètres très variables sont capables de coloniser des environnements très divers (sol, panse, effluents). En tant qu'agents de maturation de fromages et probiotiques, ces bactéries sont également amenées à s'adapter à une exposition à des stress technologiques et digestifs.

Ainsi, une adaptation osmotique est nécessaire dans le processus de fabrication du fromage. En effet, les souches sont d'une part en présence de concentrations relativement élevées de NaCl, et, d'autre part, doivent résister à la déshydratation, puisque conservées sous forme de lyophilisats. Dans ces conditions, les propionibactéries accumulent de grandes quantités de tréhalose, un disaccharide composé de deux molécules de glucose, qui est connu pour ses propriétés osmoprotectrices. De plus, dans des milieux complexes, comme le « YEL », les bactéries peuvent utiliser les osmoprotecteurs exogènes, tels que la triméthylglycine, ce qui leur permet de se multiplier jusqu'à des concentrations de NaCl de 1 mole.L^{-1} (Boyaval et al., 1999; Cardoso, F. S. et al., 2007; Thierry et al., 2011).

L'adaptation au stress thermique permet à *P. freudenreichii* de survivre jusqu'à des températures de 55 °C après un léger prétraitement à 42 °C. Le préchauffage déclenche des réponses d'adaptation au stress thermique, qui comprennent une surexpression de protéines chaperonnes, de protéases ATP-dépendantes et de protéines de la réponse SOS (métabolisme de la paroi cellulaire, neutralisation d'effets des radicaux libres d'oxygène et phosphorylation des nucléotides) (Anastasiou et al., 2006; Leverrier et al., 2004). Les espèces *A. jensenii* et *A. thoenii* sont moins résistantes au stress thermique, ce qui peut expliquer leurs concentrations plus faibles dans l'Emmental. Par contre, dans la fabrication de fromages à pâte pressée de type Leerdaamer, les températures de cuisson étant moindres, *A. jensenii* peut se maintenir à des concentrations plus élevées (Aburjaile et al., 2016a; Thierry et al., 2011).

Le stress acide est rencontré durant la fermentation et pendant le transit dans le tube digestif. L'exposition initiale de *P. freudenreichii* à un pH de 4 à 5 induit une tolérance à des pH de 2. L'adaptation à l'acidité est liée à une surexpression d'enzymes de réparation de l'ADN, d'enzymes du métabolisme de sources carbonées (dont cycle de Wood-Werkman), de protéases et de protéines chaperonnes (Jan et al., 2001; Leverrier et al., 2004).

Lors de la fabrication du fromage, la pâte est traditionnellement cuite dans des chaudrons en cuivre. Les souches de *P. freudenreichii* montrent une certaine résistance aux ions cuivre libérés notamment suite à l'acidification du milieu par la fermentation lactique (Cousin et al., 2011; Thierry et al., 2011).

En tant que probiotiques, les propionibactéries laitières doivent aussi survivre aux effets toxiques des sels biliaires. Une exposition directe à des fortes concentrations de bile diminue drastiquement la viabilité des souches de *P. freudenreichii.* Cependant, après une préexposition à des faibles concentrations de sels biliaires, des voies adaptatives se mettent en place. Elles comprennent des protéines de réparation de dommages liés au stress oxydatif et des protéines de détoxification (Cousin et al., 2011; Leverrier et al., 2003, 2004; Rabah et al., 2017) .

La contamination de l'Emmental par des bactériophages des propionibactéries est fréquente. Cependant, les propionibactéries se multiplient le plus pendant la phase de maturation dans la cave chaude, pendant laquelle elles sont logées dans la matrice solide du fromage. Dans ces conditions, la propagation des phages est très limitée et n'influence pas la croissance des propionibactéries (Thierry et al., 2011).

La matrice solide du fromage procure aussi une atmosphère anaérobie pour laquelle les propionibactéries laitières sont parfaitement adaptées.

Outre leur résistance aux stress, les propionibactéries sont connues pour leur survie pendant des mois à température ambiante (Goodfellow et al., 2012). Pour ce qui concerne *P. freudenreichii,* cette longévité peut être expliquée par sa capacité à accumuler des molécules de stockage d'énergie, telles que les polyphosphates, le glycogène et le tréhalose (Aburjaile et al., 2016a, 2016b). Les polyphosphates sont des polymères linéaires composés de dizaines ou de centaines de résidus orthophoshates liés par des liaisons à haute-énergie. Ces molécules permettraient non seulement de stocker de l'énergie, mais serait également impliquées dans la signalisation de type *quorum sensing* et le développement de biofilm. L'accumulation des polyphosphates régule aussi l'activation de l'ARN polymérase. Le glycogène est un polymère de glucose présentant des liaisons α-1,4 et α-1,6 utilisés comme forme de stockage d'énergie chez les animaux, champignons et bactéries. L'ensemble des gènes du métabolisme du glycogène a été identifié dans les génomes de *P. freudenreichii* (Falentin et al., 2010). Le tréhalose permet non seulement de lutter contre le stress osmotique, mais peut être aussi utilisé comme une source de carbone et d'énergie. Le tréhalose est synthétisé par l'ensemble des espèces de propionibactéries laitières et est accumulé dans les conditions de stress. Les quantités de disaccharide synthétisées sont souche-dépendante (Aburjaile et al., 2016a).

La machinerie d'adaptation aux stress est codée dans le génome du *P. freudenreichii* par des gènes multi-copie redondants, ce qui explique l'adaptabilité aux stress et les capacités de survie de longue durée, qui sont cependant variables entre les espèces et les souches de propionibactéries laitières. Les microorganismes les plus adaptables présentent une surexpression constitutive des protéines de réponse aux stress (Aburjaile et al., 2016a).

1.2.3.2.2.3 Molécules antagonistes des propionibactéries laitières (compétition par interférence)

Les propionibactéries laitières, de par leur production de molécules antagonistes, sont utilisées dans la bio-préservation des aliments. Une préparation à base de lait écrémé fermenté par *P. freudenreichii*, appelée Microgard™, est commercialisée comme bio-préservateur actif contre les champignons et certaines bactéries à Gram négatif. Les propriétés probiotiques des propionibactéries pourraient aussi être dues, du moins partiellement, à la production de ces molécules (Cousin et al., 2011).

.

1.2.3.2.2.3.1 Métabolites primaires

Les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène produits par les propionibactéries laitières assurent une inhibition des microorganismes indésirables. L'acide propionique est notamment utilisé comme agent antifongique dans l'industrie. Sa production peut être assurée par les propionibactéries en remplacement de la synthèse chimique de ce composé. D'autres acides organiques, tels que les acides acétique, succinique et 3-phényllactique, peuvent avoir une action antimicrobienne synergique. Les cocultures de lactobacilles avec les propionibactéries dans l'industrie laitière sont en effet plus efficaces que les monocultures en termes d'action antagoniste vis-à-vis des microorganismes indésirables (Faye et al., 2011; Thierry et al., 2011).

1.2.3.2.2.3.2 Métabolites spécialisés

Une dizaine de bactériocines a été décrite chez les propionibactéries laitières, dont certaines présentent des caractéristiques très originales (Tableaux 1.2.3 – 1 et 1.2.3 - 2).

Tableau 1.2.3 – 1

Molécules antimicrobiennes isolées chez *Acidipropionibacterium* sp. (Barefoot and Ratnam, 1999; Ben-Shushan et al., 2003; Faye et al., 2000, 2002; Grinstead and Barefoot, 1992; Holo et al., 2002, 2002; Lyon and Glatz, 1991; Miescher et al., 2000; Ratnam et al., 1999, 1999; Van der Merwe et al., 2004)

Molécule	Microorganisme source	Taille (Da)	Activité inhibitrice	Référence
Propionicin SM1 et SM2	*A. jensenii* DF1	SM1 : 22300 SM2 : 13600	*Acidipropionibacterium* sp.	Miescher et al. 2000 Holo et al. 2002
Thoeniicin 447	*A. thoenii* 447	7130	*Lactobacillus delbrueckii, C. acnes*	van der Merve 2004
Propionicin PLG1 et GBZ1	*A. thoenii* P127	9328	*Lactobacillus* spp., propionibactéries, *Pediococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Campylobacter jejuni, E. coli, Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., champignons	Ben-Shushan 2003 Lyon&Glatz, 1991, 1993
Jenseniin P	*A. jensenii* B1264	6000-9000	Propionibactéries, *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp.	Ratnam et al. 1999, Barefoot& Ratnam 1999
PAMP	*A. jensenii* et *A. thoenii*	6383	Propionibactéries; *Lactobacillus* sp.	Faye 2002
Jenseniin G	*A. jensenii* P126	>12000	Propionibactéries; *Lactobacillus* sp., *L. lactis, S. thermophilus*	Ratnam et al. 1999
Propionicin T1	*A. thoenii*	7130	Propionibactéries; *Lactobacillus* sp.	Faye 2000

Tableau 1.2.3 – 2

Molécules antimicrobiennes décrites chez *Propionibacterium* sp. (Brede et al., 2004; Hajfarajollah et al., 2014)

Molécule	Microorganisme	Taille (Da)	Activité	Référence
Propionicin F	*P. freudenreichii*	4397	*P. freudenreichii*	Brede 2004
Lipopeptide (biosurfactant)	*P. freudenreichii*		*S. aureus, Bacillus* sp., *L. monocytogenes, Rhodococcus ertyhropolis, E. coli, K. pneumoniae, S. Typhimurium, P. aeruginosa, Alternaria* sp.	Hajfarajollah 2014

Les bactériocines SM1 et SM2 ont été isolées initialement à partir d'*A. jensenii* DF1 puis secondairement chez des souches de *P. freudenreichii* et d'*A. acidipropionici*. En effet, les gènes codant ces substances sont portés par des plasmides pouvant circuler entre les souches de propionibactéries. Les bactériocines SM1 et SM2 présentent un spectre d'activité étroit, limité à *A. jensenii* vis-à-vis duquel elles sont bactéricides (Faye et al., 2011; Holo et al., 2002).

La bactériocine PAMP (*protease-activated antimicrobial peptide*), isolée d'*A. jensenii* LMGT3032, est sécrétée sous forme de pro-PAMP, protéine de 198 acides aminés. Sa production a aussi été constatée chez d'autres souches d'*A. jensenii* et d'*A. thoenii* (Faye et al. 2004). L'activité

antimicrobienne est provoquée par une protéolyse libérant la protéine PAMP de 64 acides aminés. La molécule est activée par différentes protéases, telles que la protéinase K, la chymotrypsine, la trypsine, la pronase ou la subtilisine. PAMP exerce un effet bactéricide sur les lactobacilles et les propionibactéries laitières. La sensibilité des producteurs à la bactériocine est variable (Faye et al. 2002). Curieusement, la sécrétion de pro-PAMP par la souche productrice n'est pas accompagnée de la sécrétion d'une protéase. Plusieurs explications ont été proposées. Il est possible que la protéase soit sécrétée uniquement sous certaines conditions, ce qui permet d'activer pro-PAMP seulement en cas de besoin. Il est aussi envisageable que pro-PAMP utilise les protéases présentes dans son environnement pour son activation. Par exemple, dans le tube digestif, on retrouve la trypsine et, dans les fromages, les bactéries lactiques présentent une activité protéolytique pour obtenir des nutriments. Pro-PAMP pourrait donc être une molécule-piège, qui est activé « accidentellement » par les bactéries cibles.

Deux bactériocines, PLG-1 et GBZ-1, ont été purifiées du surnageant d'*A. thoenii* P-127. Selon les conditions de croissance, la souche peut exprimer l'une ou l'autre bactériocine. Les deux protéines sont exprimées simultanément durant la croissance dans les milieux semi-solides. La bactériocine GBZ-1 est homologue avec la bactériocine PAMP. Cependant, contrairement à cette dernière, elle ne nécessite pas d'activation par la protéolyse (Ben-Shushan et al., 2003; Faye et al., 2011).

La Propionicine F est une bactériocine décrite chez *P. freudenreichii* (Brede et al., 2004). Elle présente une activité bactéricide intra-espèce. Contrairement à de nombreuses bactériocines qui ont une nature cationique pour se lier à la surface bactérienne chargée négativement, la Propionicine F est anionique. Elle présente aussi une nature hydrophobe, qui pourrait faciliter la liaison aux cellules. Il est aussi possible que la molécule agisse sur les cibles *via* un récepteur cellulaire spécifique. La maturation de la propionicine F est originale, car elle concerne les extrémités N- et C-terminales (Figure 1.2.3 – 3). Le cluster de gènes de synthèse de la Propionicine F contient les gènes de S-adénosylméthionine transférase, qui est responsable de la formation de ponts thioéther ou d'autres ponts sulfures dans les bactériocines telles que la subtilosine A ou la thuricine CD. Le cluster de propionicine F contient aussi des gènes d'immunité (Brede et al., 2007).

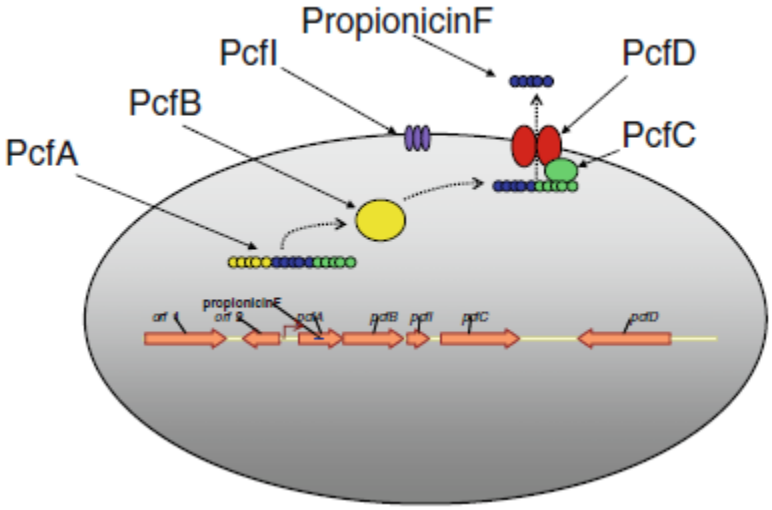


Figure 1.2.3 – 3

Organisation du cluster des gènes et modèle hypothétique de synthèse de la Propionicine F. Le gène *pcf*A code le peptide précurseur de la bactériocine (la région codante est symbolisée par un trait bleu). Le gène *pcf*B code une S-adénosylméthionine transférase impliquée dans la maturation de la bactériocine. La protéine membranaire PcfI rend la bactérie productrice résistante à sa propre bactériocine. La proline-peptidase PcfC et le transporteur de type ABC, PcfD, constituent un système de transport et de maturation de la Propionicine F (Faye et al., 2011).

La Propionicine T1 est une bactériocine de 7,1 kDa chargée positivement qui est active contre *A. acidipropionici*, *A. jensenii, A. thoenii* et certaines souches de lactobacilles. Elle est inactive contre les souches de *P. freudenreichii* (Faye et al., 2000) mais très active vis-à-vis de *C. acnes.* Cette bactériocine a été isolée de deux souches d'*A. thoenii*. Elle est produite sous forme d'un pré-peptide de 96 acides aminés, avec un peptide leader N-terminal de 31 résidus. La Propionicine T1 est bactéricide et présente des concentrations minimales inhibitrices nanomolaires. Les souches productrices peuvent être sensibles à leurs bactériocines sous certaines conditions de croissance, ce qui indique que le système d'immunité a une expression régulée. Le gène *pct*A codant la bactériocine est présent chez de nombreuses souches d'*A. jensenii* et *A. thoenii*, cependant il existe des mutations de ce gène qui aboutissent à la sécrétion d'une protéine avec des propriétés fortement modifiées, rendant la molécule inactive vis-à-vis des souches indicatrices (Brede et al. 2005). L'activité de la Propionicine T1 contre *C. acnes* a fait objet d'un brevet en tant que traitement possible de l'acné (US patent no. 2003/0096365A1). Une autre bactériocine, la Propionicine P, produite par *A. jensenii* et active contre *C. acnes* et *C. granulosum,* a aussi été brevetée pour la même application (US patent no. 2001/006221847B1) (Barefoot and Ratnam, 1999). En effet, ces molécules sont intéressantes, compte tenu de leur robustesse (résistance à des températures de 100 °C pendant 30 min, résistance au pH de

2 à 10, stabilité dans des solutions de NaCl, dans des alcools et dans l'urée) et de leur spectre d'activité étroit, permettant de conserver l'équilibre du microbiote cutané (Faye et al., 2011).

Plusieurs auteurs rapportent que des surnageants de cultures de différentes souches de *P. freudenreichii* montrent une activité antimicrobienne vis-à-vis de différentes espèces Gram positif et négatif et des champignons. Leur caractérisation partielle suggère une nature polypeptidique (Gwiazdowska and Trojanowska, 2006; Nair and Kollanoor, 2018; Ryzhkova et al., 2017). Ces nouvelles descriptions suggèrent un potential antagoniste des propionibactéries laitières encore mal exploré, ce qui fera objet de ceux travaux de thèse.

1.2.3.2.3 Activités immunomodulatrices et anti-cancéreuses

Des données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que *P. freudenreichii* est capable de moduler la réponse inflammatoire intestinale et qu'il pourrait ce de fait avoir un intérêt dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales. Certaines souches de *P. freudenreichii* peuvent induire la production de grandes quantités d'interleukine 10, connue pour ses activités régulatrices (Foligné et al., 2010). Cette propriété, qui est extrêmement souche-dépendante, est corrélée à un effet protecteur vis-à-vis d'une colite aiguë induite chez la souris par le TNBS (acide 2,4,6-trinitrobenzenosulfonique) (Foligné et al., 2010, 2013). Les souches sélectionnées peuvent aussi diminuer la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 8 et le TNF-α, au niveau des cellules épithéliales stressées par la présence du lipopolysaccharide (Rabah et al., 2017).

Les effets anti-inflammatoires sont dus à plusieurs composés issus des propionibactéries laitières. Les protéines de surface des propionibactéries, appelées *S-layer proteins*, pourraient interagir avec les cellules dendritiques via des récepteurs spécifiques et ainsi en induire une réponse de tolérance immunitaire et diminution de l'inflammation (Colliou et al., 2017; Le Maréchal et al., 2015). Par ailleurs, les acides gras à courte chaîne produits par les propionibactéries exercent un effet sur les récepteurs NOD-like et les récepteurs de cytokines induisant ainsi un fort effet immunomodulateur (Cousin et al., 2011).

Les métabolites des propionibactéries laitières exercent aussi un effet anti-cancéreux, principalement par l'induction de l'apoptose (Jan et al., 2002). Cet effet est obtenu par la production des acides propionique et acétique qui activent la voie intrinsèque de l'apoptose. Ces molécules agissent sur les cibles mitochondriales en causant une perméabilisation et une dépolarisation des membranes, une fuite du cytochrome C et une activation des caspases. Les acides gras à courte chaîne

tels que l'acide propionique peuvent aussi activer la voie extrinsèque de l'apoptose (Cousin et al., 2016). Les acides gras conjugués présentent quant à eux des activités anti-prolifératives par inhibition du cycle cellulaire, peroxydation des lipides et activation des voies d'apoptose. Il a aussi été montré que les propionibactéries laitières, comme d'autres bactéries probiotiques, pouvaient lier des métaux lourds et des toxines (ex. aflatoxine) qui ont un fort potentiel cancérigène (Cousin et al., 2011; Rabah et al., 2017).

1.2.3.2.4 Potentiel pathogène

P. freudenreichii a une longue histoire d'utilisation sécurisée en alimentation humaine et dans les additifs alimentaires pour les animaux. Le statut de « GRAS » (*generally recognized as safe*) lui a été attribué par l'administration nord-américaine en 2002 (Mogensen et al., 2002). *P. freudenreichii* et *A. acidipropionici* figurent aussi sur la liste d'agents avec le statut « QPS » (*qualified presumption of safety*) dans la législation européenne (EFSA, 2008).

Pour les espèces pouvant être introduites dans la chaîne alimentaire, un potentiel de transmission des gènes de résistance aux antibiotiques doit être étudié. Les propionibactéries laitières ont une résistance intrinsèque à plusieurs antibiotiques (sulfonamides, oxacilline, aminoglycosides, quinolones, colistine, métronidazole et fosfomycine). Cependant, des éléments mobiles codant l'antibiorésistance n'ont pas été détectés chez les souches laitières (Meile et al., 2008).

La ß-hémolyse a été décrite pour les souches de *A. jensenii*, *A. thoenii* et *A. acidipropionici*. L'hémolyse pourrait être liée à la production de pigment rouge-orangé, qui est très similaire au pigment hémolytique granadène (caroténoïde) décrit chez *Streptococcus agalactiae* (Rosa-Fraile et al., 2006; Vanberg et al., 2007). La ß-hémolyse peut constituer un facteur de virulence et pose question quant à l'utilisation sécurisée de ces souches en industrie alimentaire, mais les tests de sécurité sont plutôt rassurants (Meile et al., 2008).

1.3 Rôle des antagonismes bactériens dans l'équilibre du microbiote cutané

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les mécanismes de compétition bactérienne pouvaient réguler la composition des communautés microbiennes aboutissant à un certain équilibre. Comme modèle, nous nous sommes intéressés aux antagonismes des propionibactéries. Ce groupe est particulièrement intéressant puisqu'il rassemble des espèces proches phylogénétiquement mais adaptées à deux habitats très différents, l'environnement laitier et le revêtement cutané (Goodfellow et al., 2012). Le rôle de l'activité antagoniste des propionibactéries dans ces habitats est encore peu étudié alors que l'utilisation des propionibactéries en tant que probiotiques a déjà été envisagée pour le traitement des pathologies liées aux déséquilibres des flores naturelles, notamment de la flore cutanée (Faye et al., 2000). Les déséquilibres du microbiote cutané peuvent en effet conduire à des pathologies diverses, dont quelques-unes seront abordées dans les sous-chapitres suivants : acné, infections nosocomiales liées au matériel, plaies chroniques et infections à streptocoques (Chen and Tsao, 2013; Grice and Segre, 2011; Sanford and Gallo, 2013; Tomic-Canic et al., 2014).

1.3.1 La structure de l'épiderme façonne la flore cutanée

La peau constitue le plus grand organe du corps humain et est le premier rempart contre les agressions environnementales et l'invasion des pathogènes. La surface de la peau est formée par un réseau des cellules cornées dont l'imperméabilité est renforcée par des molécules lipidiques. Elle comporte aussi des invaginations, comprenant les glandes sudoripares, les follicules pileux et les glandes sébacées. Il existe deux types de glandes sudoripares, eccrines et apocrines. Les glandes eccrines sécrètent une sueur composée d'eau et d'électrolytes, qui acidifient la surface cutanée, et dont l'évaporation permet la thermorégulation. La barrière cutanée est ainsi rafraîchie, sèche et légèrement acide, ce qui donne un habitat exigeant, adapté seulement à certains types de microorganismes (Byrd et al., 2018; Sanford and Gallo, 2013). Les glandes eccrines sécrètent également des peptides antimicrobiens tels que la cathélicidine ou les ß-défensines. La densité des glandes eccrines impacte ainsi la colonisation microbienne de la peau. Les glandes apocrines existent dès la naissance, mais s'activent seulement à la puberté. Leur distribution est limitée à certaines régions de la peau, telles que le creux axillaire et les sphères génitale et anale. Le produit de ces glandes contient des lipides, des protéines et des hormones stéroïdiennes et est relargué dans les follicules pileux. La dégradation de ce type de sueur par des bactéries produit une odeur caractéristique. Enfin,

les glandes sébacées sont connectées au follicule pileux ce qui forme une unité pilosébacée. Ces glandes produisent une substance riche en lipides, appelée sébum, qui lubrifie les cheveux et la peau. Les unités pilosébacées constituent un environnement anoxique, riche en lipides, colonisé par un nombre très restreint d'espèces adaptées à ce type de conditions, telles que *C. acnes* (Sanford and Gallo, 2013). La décomposition du sébum par *C. acnes* génère des acides gras libres, qui participent au contrôle de la colonisation microbienne avec les cathélicidines, les ß-défensines et les histones antimicrobiennes libérées par les sébocytes (Chen et al., 2018). Les kératinocytes produisent, eux aussi, des protéines antimicrobiennes, des cytokines et des chémokines. Leur sécrétion peut être augmentée en réponse à l'activation des récepteurs de reconnaissance des motifs microbiens, ce qui résulte en une réponse antimicrobienne directe et un recrutement de cellules immunitaires localisées dans les structures de l'épiderme et sous sa surface (Chen et al., 2018; Sanford and Gallo, 2013).

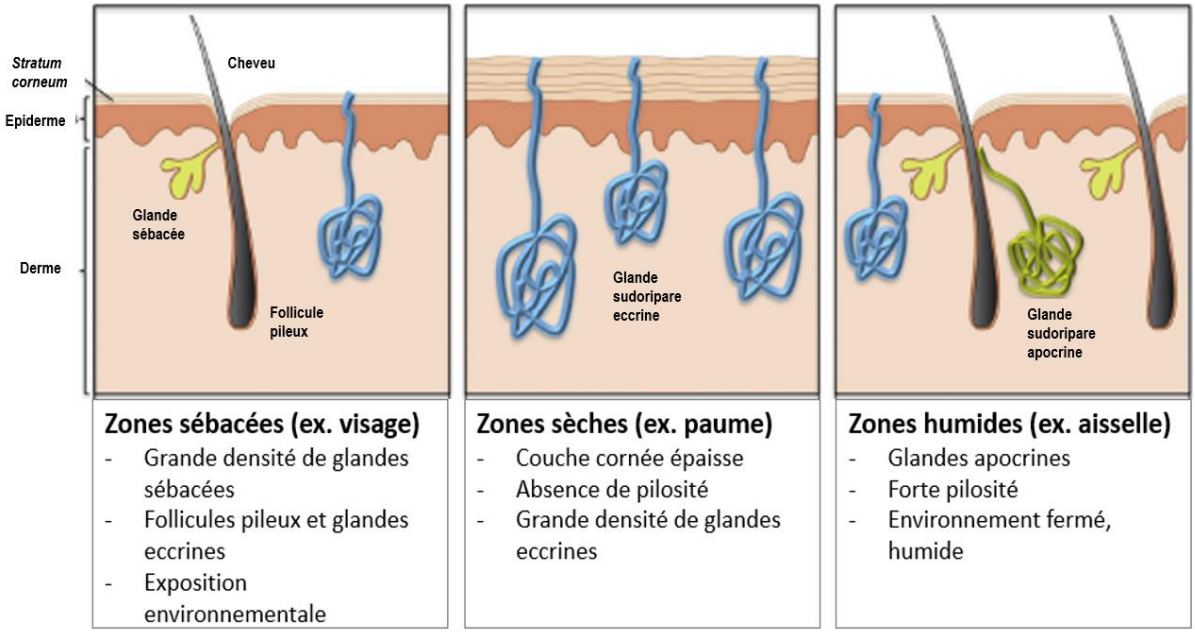


Figure 1.3.1 – 1

Diversité des zones cutanées. Les caractéristiques physico-chimiques de la peau varient en fonction de la distribution d'appendices et de structures glandulaires. La figure représente les trois catégories majeures de zones cutanées : sébacées, sèches et humides (d'après Sanford and Gallo, 2013).

La peau présente des caractéristiques physiques différentes selon les sites (Figure 1.3.1 – 1). Dans certaines localisations, telles que les paumes des mains et les plantes des pieds, elle est épaisse et dépourvue de follicules pileux. D'autres régions, telles que le scalp ou les aisselles sont densément poilues. Certaines régions sont riches en glandes sébacées (front, haut du torse). Ces différences anatomiques influencent fortement la composition des communautés microbiennes cutanées (Barnard and Li, 2017). Cependant, elles n'expliquent pas toute la diversité microbienne de la peau. Il faut aussi prendre en considération les facteurs environnementaux et comportementaux, tels que

l'exposition de la peau, l'utilisation des détergents et des cosmétiques (Byrd et al., 2018). C'est pourquoi, il est important de noter qu'une grande diversité de variables peuvant influencer la composition du microbiote cutané, contrairement aux microbiotes intestinaux ou oraux, pour lesquels les habitats sont beaucoup plus constants et plus favorables (Barnard and Li, 2017; Byrd et al., 2018; Chen and Tsao, 2013; Sanford and Gallo, 2013).

1.3.2 Définition et composition du microbiote cutané à l'état d'équilibre

Le microbiote cutané est une flore microbienne diversifiée colonisant la peau humaine et composée de millions de bactéries, champignons, virus et parasites. Le microbiome cutané correspond à l'ensemble de gènes microbiens qui composent cette communauté (Barnard and Li, 2017; Grice and Segre, 2011).

Les études de la composition du microbiote cutané par séquençage métagénomique montrent que les bactéries sont les microorganismes prédominants. Elles appartiennent à quatre principaux phyla : *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Bacteroidetes* (Grice and Segre, 2011). Ces quatre phyla sont aussi présents dans la cavité orale ou le tractus digestif, mais à des proportions très différentes. Sur la peau, *Actinobacteria* constituent le phylum le plus abondant dans de nombreux sites. Parmi les champignons, on retrouve principalement *Malassezia* sp.. La communauté virale est composée de virus à ADN (virus herpès, papillomavirus, adénovirus, etc.) (Foulongne et al., 2012; Ma et al., 2014; Wylie et al., 2014) et de virus de procaryotes, en particulier des phages de *Cutibacterium* sp. et de *Staphylococcus* sp. (Liu et al., 2015; Oh et al., 2014). L'analyse microscopique de la peau montre aussi la présence d'acariens d'espèce *Demodex folliculorum*, qui résident dans les follicules pileux (Kligman and Christensen, 2011).

Les microorganismes commensaux ont été classés en résidents et transitoires en fonction de leur capacité à survivre et proliférer sur la peau. Les résidents sont présents de manière prolongée, voire permanente, en maintenant leur viabilité et leur reproduction, alors que les organismes transitoires n'adhèrent pas aux structures de la peau et présentent une croissance et une reproduction faible ou nulle (Sanford and Gallo, 2013).

Comme nous l'avons mentionné, la composition de la flore est fortement influencée par la physiologie des différentes régions cutanées, regroupées en trois catégories : sèches, humides et sébacées. Les communautés les plus variées sont retrouvées dans des localisations sèches, telles que l'avant-bras, la paume de la main ou les fesses, avec des proportions très variables des quatre phyla bactériens (Figure 1.3.2 – 1). La distinction entre les microorganismes résidents et transitoires dans ces

régions est actuellement très incertaine (Costello et al., 2009; Gao et al., 2007; Grice et al., 2009). Le microbiote des sites humides (creux axillaire, creux poplité, creux inguinal) est dominé par des espèces aéro-anaérobies facultatives telles que *Corynebacterium* et *Staphylococcus,* appartenant aux phyla des *Actinobacteria* et des *Firmicutes*, respectivement. Enfin, les sites sébacés, riches en lipides (front, région rétroauriculaire, partie supérieure du thorax) présentent la moindre diversité microbienne et sont colonisés principalement par *Cutibacterium* sp., appartenant au phylum des *Actinobacteria*, et les champignons du genre *Malassezia* sp. (Figure 1.3.2 – 1) (Costello et al., 2009; Fitz-Gibbon et al., 2013; Grice et al., 2009; Kligman and Christensen, 2011).

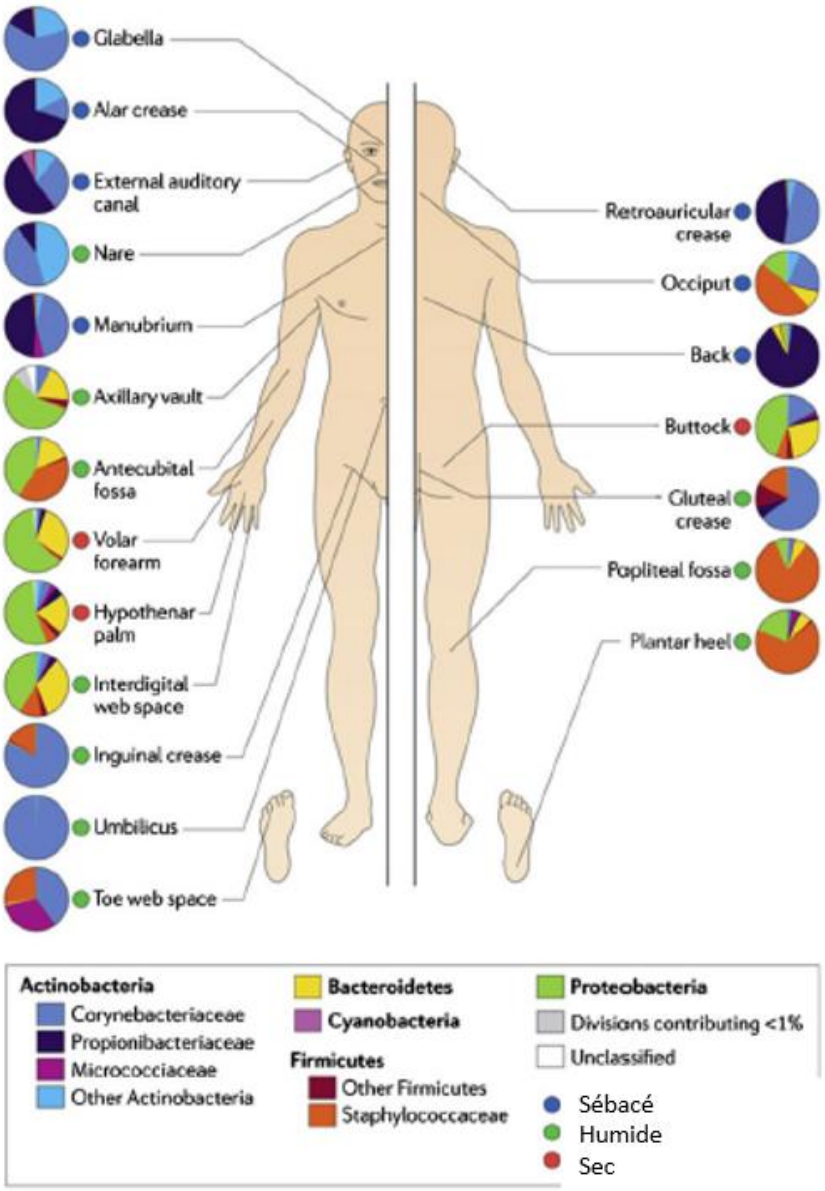


Figure 1.3.2 – 1

Distribution topographique du microbiote cutané au sein des microenvironnements (secs, humides et sébacés). Les diagrammes circulaires représentent l'abondance relative des différents taxons (Grice, 2014)

La composition du microbiote cutané varie au cours de la vie d'un individu.

Chez les nouveau-nés, la colonisation initiale dépend du mode d'accouchement. La flore cutanée du nouveau-né se compose de bactéries vaginales pour les naissances par voie basse. Pour les enfants nés par césarienne, les microorganismes sont issus de la flore cutanée de la mère. Les implications de ces différences sont mal connues. Les enfants prépubères présentent une forte densité de *Firmicutes* (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp.), de *Bacteroidetes* et de *Proteobacteria*. Durant la puberté, les hormones stimulent les sécrétions des glandes sébacées, ce qui favorise l'expansion des espèces lipophiles (*Cutibacterium* spp., *Corynebacterium* spp. et *Malassezia* spp.). Ces changements sont intéressants, car beaucoup de pathologies cutanées sont liées à l'âge. Ainsi, la dermatite atopique liée au staphylocoque est présente surtout chez les enfants prépubères alors que l'acné est une pathologie qui apparaît à l'adolescence (Byrd et al., 2018).

Il existe une grande variabilité spatiale et temporelle de la composition du microbiote cutané au niveau individuel et interindividuel. Ainsi, dans une étude réalisée chez six adultes sains, l'analyse des communautés microbiennes des avant-bras a montré que seulement 10 % des genres bactériens étaient présents dans l'ensemble des échantillons (Gao et al., 2007). Dans une autre étude, l'analyse des bactéries situées sur les paumes des mains de 51 individus a montré une diversité encore plus grande avec en moyenne 150 espèces par échantillon (Fierer et al., 2008). Dans cette étude, il n'y avait que 17 % de similarité de composition entre les deux paumes alors qu'entre deux individus la partie similaire était de 13 % (Fierer et al., 2008). Une autre étude a montré que les membres d'une famille résidant sous le même toit présentaient une beaucoup plus grande similarité de composition du microbiote cutané par rapport aux individus étrangers. Cette similarité était aussi partagée avec les animaux de compagnie présents dans la maison (Song et al., 2013).

La composition clonale du mirobiome cutané a été étudiée pour deux espèces, qui sont les plus abondantes, *Cutibacterium acnes* et *Staphylococcus epidermidis*. Il existe une diversité des souches en fonction des individus, de leur état cutané et du site prélevé. On constate globalement que le type et l'abondance de souches de *C. acnes* sont spécifiques de chaque individu, mais ne présentent pas de spécificité inter-sites (Oh et al., 2014). La situation est contraire chez *S. epidermidis,* dont les souches présentent moins de spécificité individuelle mais corrèlent avec les sites cutanés dont elles sont issues (Oh et al., 2014). Toutes ces observations remettent en question la notion du « biome » humain, qu'il faudrait peut-être reconsidérer en fonction des autres individus et de l'environnement.

1.3.3 Déséquilibre du microbiote cutané et pathologies

Il est de plus en plus évident que le microbiote participe de manière très importante au fonctionnement normal de la peau. Dans des états pathologiques, plusieurs études descriptives ont montré une composition perturbée du microbiote, appelé dysbiose (Figure 1.3.3 – 1). Il n'est pas clair, cependant, si la dysbiose est la cause ou l'effet des pathologies cutanées, telles que la dermatite atopique, le psoriasis, ou l'acné. De plus, dans certains contextes, la flore commensale, considérée habituellement comme inoffensive, peut exprimer un pouvoir pathogène opportuniste, en profitant de l'immunodépression de l'hôte. Ces situations sont notamment rencontrés dans les plaies chroniques du patient diabétique ou dans les infections nosocomiales liées aux cathéters (Barnard & Li, 2017; Chen & Tsao, 2013; Grice & Segre, 2011; Tomic-Canic et al., 2014).

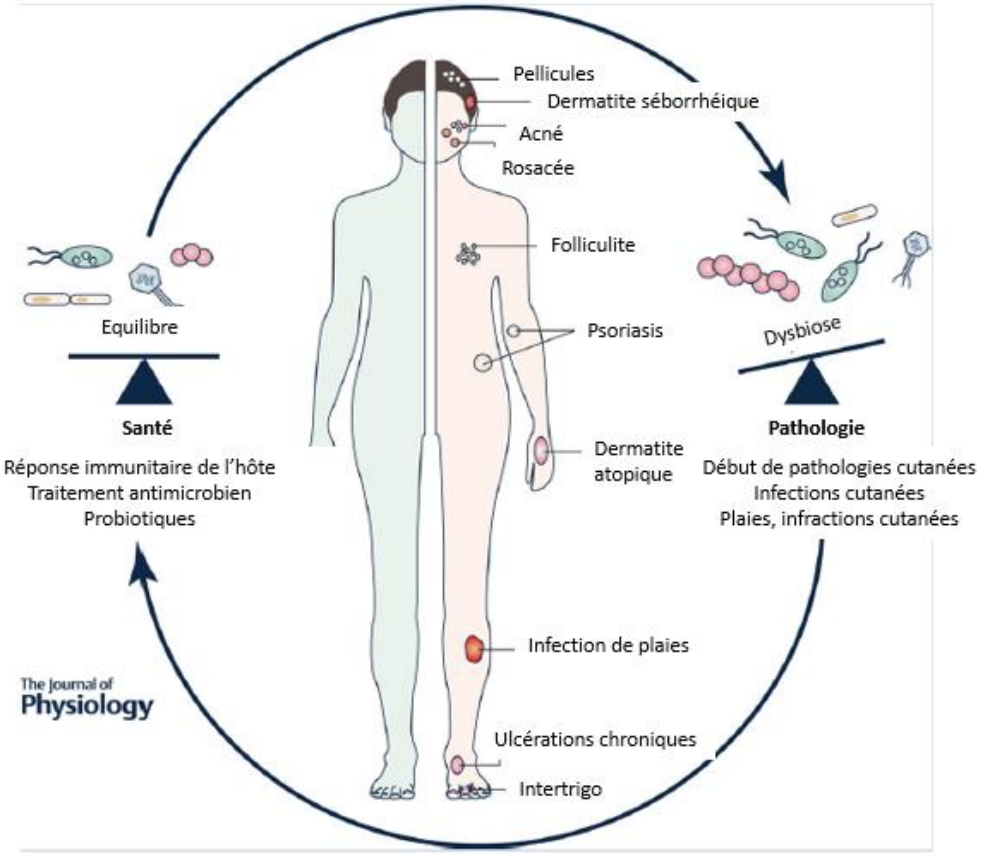


Figure 1.3.3 – 1

Le microbiote cutané participe aux défenses cutanées contre des microorganisms pathogènes et au maintien de la bonne santé cutanée. Le déséquilibre du microbiote (dysbiose) est impliqué dans des pathologies cutanées telles que la dermatite atopique, les infections des plaies, l'acné, la rosacée, les folliculites, le psoriasis etc…(d'après Barnard and Li, 2017)

Un bref aperçu de quelques pathologies dues au déséquilibre de la flore cutanée et pour lesquelles les propriétés antagonistes des propionibactéries pourraient avoir un intérêt thérapeutique, sera donné dans les sous-chapitres suivants.

1.3.3.1 *Acne vulgaris*

Acne vulgaris (appelée communément acné) est une pathologie cutanée très fréquente, touchant 80 – 85 % de la population, avec un pic de prévalence entre 15 et 17 ans. Les formes sévères dans cette tranche d'âge touchent 15 – 20 % d'individus. Même si l'acné est considérée comme une maladie de l'adolescence, elle peut persister à l'âge adulte. Des études montrent une prévalence de 64 % chez les personnes âgées de 20 – 29 ans et de 43 % entre 30 et 39 ans. Cette affection est rare au-delà de 40 ans, touchant 3 – 5 % des personnes de 40 – 49 ans. Elle est aussi rare chez les enfants prépubères (Williams et al., 2012).

Le tableau clinique de l'acné inclut la séborrhée (production d'une quantité excessive de sébum), les lésions non inflammatoires (les comédons ouverts et fermés) et les lésions inflammatoires (papules et pustules) menant à une cicatrisation (Figure 1.3.3 – 2).

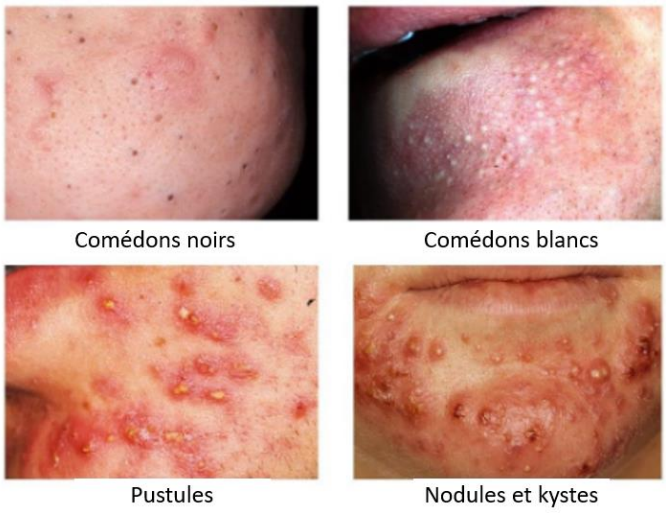


Figure 1.3.3 – 2

Différentes formes de lésions dans l'*acne vulgaris* (d'après http://sdsrejuvenate.co.uk/acne-treatments/)

Les nodules et les kystes sont présents dans les formes sévères de l'acné. La distribution des lésions correspond à la densité des unités pilosébacées et touche principalement la face, le cou et la partie supérieure du thorax. L'acné débute habituellement avec la puberté, quand la sécrétion d'androgènes stimule la production du sébum. Avant l'âge de 12 ans, les lésions sont majoritairement non-inflammatoires. Plus tard, chez de nombreux individus, on observe un mélange de comédons et de lésions inflammatoires. L'acné est une pathologie relativement anodine dans la plupart des cas, mais peut parfois être responsable de lésions douloureuses et de cicatrices qui ont un impact négatif

du point de vue psychosocial. En effet, l'acné affecte les parties du corps bien visibles et sa survenue à l'adolescence est aussi critique dans l'élaboration de la confiance en soi (Williams et al., 2012).

Parmi les facteurs qui peuvent favoriser l'acné, on énumère l'histoire familiale, la résistance à l'insuline, les stéroïdes anabolisants ou le tabagisme. Les exacerbations des symptômes peuvent aussi être liées au cycle menstruel et au stress émotionnel. Il a été suggéré que le régime alimentaire riche en glucides dans les populations occidentales pouvait conduire à l'hyperinsulinisme qui stimule la production d'androgènes et d'insulin-like growth factor-1, qui stimulent les glandes sébacées. Ceci pourrait expliquer l'absence d'acné dans les populations non-industrialisées et l'amélioration des symptômes avec un régime alimentaire à faible index glycémique, qui diminue la sécrétion de l'insuline (Williams et al., 2012).

L'acné est une maladie de l'unité pilosébacée. Son étiologie reste incertaine, avec la participation de plusieurs facteurs : les médiateurs de l'inflammation libérés dans la peau, l'altération du processus de kératinisation menant au développement des comédons, l'augmentation de la production du sébum sous contrôle d'hormones androgènes et la colonisation folliculaire par des bactéries (Figure 1.3.3 – 3). La séquence des évènements et leur causalité ne sont pas bien élucidées. Il a été suggéré que le processus inflammatoire est dû à l'activité des lymphocytes CD4+ et des macrophages. Ils stimulent la vascularisation de l'unité pilosébacée précédant l'hyper-kératinisation. L'hyper-kératinisation est provoquée par la perturbation de la différenciation terminale des kératinocytes. Elle obture les follicules pileux et mène à la formation des comédons. De plus, sous l'influence des hormones et de l'insulin-like growth factor-1, les glandes sébacées fabriquent une quantité trop importante de sébum. Les follicules pilosébacés sont ainsi obturés par l'hyper-kératinisation et remplis de sébum. Ceci procure un environnement anoxique, riche en lipides, ce qui constitue des conditions très favorables à la prolifération de *C. acnes.* C'est pourquoi, pendant longtemps, on lui attribuait un rôle pathogène dans l'acné, en pensant qu'il pouvait stimuler l'inflammation et la progression des lésions (Degitz et al., 2007). Cependant, les études récentes montrent, de manière surprenante, que dans les follicules pileux chez les personnes acnéiques, on observe une diminution de la proportion de *C. acnes* et de *C. granulosum* au profit des espèces à Gram négatif et des entérocoques (Barnard et al., 2016). Ceci suggère que le microbiote folliculaire sain nécessite une dominance des propionibactéries, ce qui remet en question leur rôle pathogène dans l'acné. Cet effet bénéfique des propionibactéries a aussi été observé dans d'autres pathologies cutanées, telles que la dermatite atopique ou le psoriasis. Le rôle protecteur de *Cutibacterium* sp. pourrait être attribué aux mécanismes de compétition bactérienne (par exploitation des ressources ou par interférence) discutés dans le chapitre 1.2.2.2 (Barnard and Li, 2017).

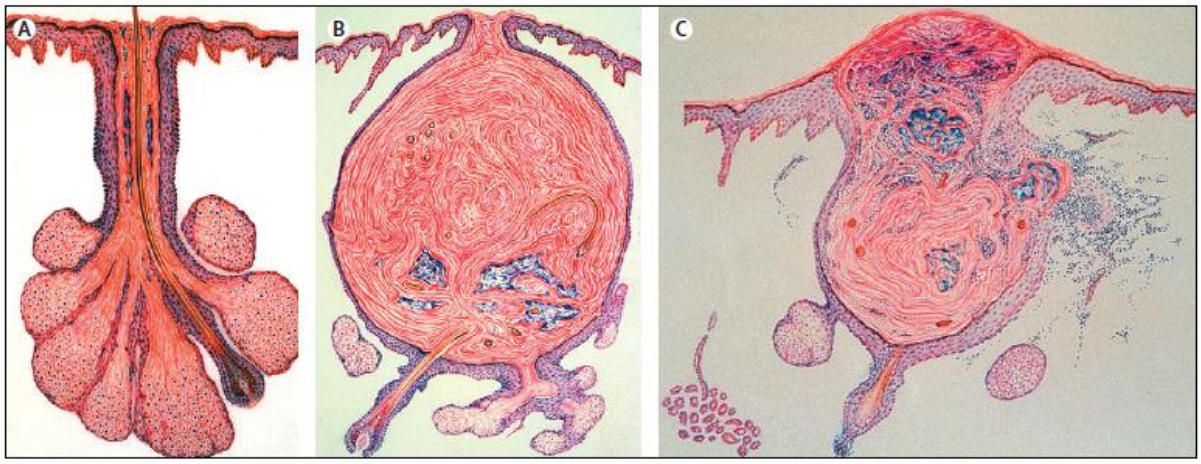


Figure 1.3.3 – 3

Physiopathologie de l'acné. (A) Unité pilosébacée normale. (B) Comédon obturé par des squames hyper kératinisées. (C) Rupture du comédon entraînant une inflammation (d'après Degitz et al., 2007)

Pour le traitement de l'acné légère à modérée, il existe des préparations antibactériennes (gels lavants, lotions), de préférence avec un pH acide, qui ont un effet sur la séborrhée et la prolifération microbienne. Cependant, leur utilisation excessive dessèche la peau, en stimulant une production accrue de sébum et menant à un « cercle vicieux ».

Il existe aussi plusieurs agents topiques, qui peuvent être utilisés seuls ou en combinaison dans les formes peu sévères de l'acné. (i) Le peroxyde de benzoyle est un agent qui a plusieurs mécanismes d'action et agit principalement sur la prolifération bactérienne. Il peut entraîner une irritation de la peau, qui peut être minimisée par l'utilisation de faibles concentrations. (ii) Les rétinoïdes topiques diminuent la kératinisation anormale et ont une action anti-inflammatoire. Cependant, ils présentent un effet tératogène qui nécessite une contraception efficace chez les utilisatrices en âge de procréer. Leur application provoque aussi une irritation locale et entraîne une hypersensibilité aux rayons UV. (iii) L'utilisation des antibiotiques locaux semble avoir un effet antimicrobien et anti-inflammatoire (Williams et al., 2012). Les antibiotiques tels que l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec le peroxyde de benzoyle ou l'acétate de zinc. Leur efficacité diminue cependant suite à l'émergence de l'antibiorésistance.

Les traitements oraux sont en général réservés aux formes plus sévères de l'acné, ne répondant pas aux traitements locaux. (i) Les antibiotiques oraux diminuent l'inflammation sans pourtant éliminer les lésions complètement. Il n'y a pas d'arguments forts pour une supériorité d'une molécule antibiotique sur une autre. Il n'a pas été prouvé, non plus, que les antibiotiques oraux étaient supérieurs aux traitements locaux. Le choix de l'antibiotique est basé sur leur coût et la présence d'effets secondaires. En effet, la minocycline, les sulfamides, les quinolones et la clindamycine ont

plusieurs contre-indications et des risques d'effets secondaires graves (syndrome d'hypersensibilité, risque de tendinopathie, colite pseudomembraneuse etc.). Il existe aussi un fort pourcentage de souches résistantes à l'érythromycine et à la tétracycline. De plus, comme les antibiotiques dans l'acné sont utilisés à faibles doses et pendant des périodes prolongées, la pression de sélection de souches résistantes est particulièrement forte (Williams et al., 2012). (ii) Les contraceptifs oraux combinant les œstrogènes et la progestagène peuvent améliorer les symptômes de l'acné par l'action anti-androgène des œstrogènes qui diminue la sécrétion sébacée. (iii) Enfin l'isotrétinoin (acide 13-cis rétinoïque) orale est réservée aux formes sévères, nodulo-kysitques, ou l'acné résistante aux autres traitements. Elle présente une grande efficacité, avec une guérison dans 85 % des cas. Il existe cependant environ 21 % de récurrences. Le traitement par les rétinoïdes peut aussi entraîner beaucoup d'effet indésirables, tels que le dessèchement cutané, la chéilite, le saignement des muqueuses, les infections secondaires, l'aggravation temporaire des lésions d'acné, la photosensibilisation et l'hyperlipidémie. Compte tenu de la tératogénicité du produit, comme pour les produits topiques, il est nécessaire d'assurer une contraception efficace (Williams et al., 2012).

Compte tenu de l'efficacité limitée des traitements actuels et de leurs nombreux effets secondaires, les solutions alternatives pour le traitement de l'acné sont toujours recherchées. Une meilleure connaissance du microbiote folliculaire montre que les propionibactéries y jouent un rôle protecteur. Un traitement efficace ne doit donc pas tuer les *Cutibacterium*, mais cibler les autres souches pathogènes ou stimuler la prolifération des souches bénéfiques pour maintenir l'équilibre du microbiote et rompre le cercle vicieux de la formation des comédons. Les propionibactéries cutanées et laitières, adaptées aux conditions difficiles de l'habitat cutané, pourraient avoir une application en tant que probiotiques. Cette application a déjà été envisagée dans le passé, lors de l'identification des premières molécules antagonistes chez les propionibactéries laitières, telles que la Propionicine T1 (US patent no. 2003/0096365A1, Faye et al., 2000) (cf. chapitre 1.2.3.2).

1.3.3.2 Infections liées à la rupture de la barrière cutanée

Les microorganismes commensaux ont des nombreux rôles bénéfiques et sont en général inoffensifs pour l'hôte. Cependant, dans des conditions favorables, ils peuvent exprimer un potentiel pathogène opportuniste. Ces conditions peuvent être rencontrées quand la barrière cutanée est

rompue, lors de la pose des cathéters vasculaires ou lors d'interventions chirurgicales. L'état d'immunodépression peut aussi favoriser la survenue d'infections opportunistes, comme dans les cas d'infections des plaies chroniques du patient diabétique.

1.3.3.2.1 Infections nosocomiales liées aux dispositifs médicaux

Staphylococcus epidermidis est une des espèces dominantes de la flore cutanée commensale. Cependant, il peut profiter d'une rupture de la continuité cutanée par des dispositifs médicaux (ex. cathéters ou des implants) pour entrainer des infections. C'est pourquoi, il est l'une des causes principales des infections nosocomiales liées au matériel étranger, notamment chez des patients immunodéprimés.

L'analyse du génome de *S. epidermidis* montre qu'il héberge moins de facteurs de virulence (toxines, enzymes de dégradation) que *Staphylococcus aureus,* qui est un pathogène reconnu. Le potentiel pathogène opportuniste de *S. epidermidis* est principalement dû à la capacité d'adhérer aux surfaces des cathéters pendant leur insertion et à son aptitude à former des biofilms. Les biofilms sont constitués des communautés microbiennes enchâssées dans une matrice extracellulaire polymérique, qui facilite la coopération inter-microbienne et augmente leur virulence. La matrice protège aussi les microbes des agents toxiques, notamment des antibiotiques. Le détachement des cellules bactériennes du biofilm peut conduire à une bactériémie (Otto, 2009, 2013). Il est estimé que *S. epidermidis* est responsable en moyenne de 6,8 bactériémies pour 1000 insertions de cathéters centraux et que ces infections prolongent l'hospitalisation de 2,41 jours à 7,54 jours et entrainent une mortalité de 1,8 %. Le surcoût estimé dans les institutions aux Etats-Unis est de 12000 à 56000 $ (Becker et al., 2014; Rello et al., 2000; Warren et al., 2006). Dans les infections nosocomiales neurochirurgicales, liées aux dérivations externes, *S. epidermidis* est responsable de 73 % d'infections documentées, avec 2/3 des isolats méticillino-résistants (cf. plus loin) (Scheithauer et al., 2009). Les infections sur prothèses ostéoarticulaires sont relativement peu fréquentes (1 à 3 % d'implantations de prothèses), mais constituent une complication sérieuse, à l'origine d'une forte morbidité. Les staphylocoques à coagulase négative, et principalement *S. epidermidis,* sont isolés dans 30 à 50 % des cas d'infections sur prothèse, suivis de *S. aureus*, isolé dans 10 à 45 % des cas (Becker et al., 2014; Peel et al., 2012).

La résistance à la méticilline des staphylocoques est un défi de santé publique. Les gènes *mec* responsables de méticillino-résistance confèrent aux souches une résistance à l'ensemble des ß-lactamines. La plupart de ces staphylocoques sont également résistants aux autres classes

d'antibiotiques (quinolones, macrolides et aminosides). La multi-résistance peut ainsi entraîner des échecs thérapeutiques (CMIT, 2018).

Nous avons vu dans le chapitre 1.2.2.2.3 que *C. acnes* était aussi fréquemment impliqué dans des infections nosocomiales liées au matériel (Aubin et al., 2014). Ici aussi, l'un des facteurs favorisants ce type d'infection était la capacité de certains phylogroupes de *C. acnes* à former des biofilms. Dans ce contexte, des stratégies ciblées, limitant la formation des biofilms par *S. epidermidis* et *C. acnes* sont recherchées afin de limiter la fréquence et la gravité des infections nosocomiales.

1.3.3.2.2 Infections des plaies chroniques du patient diabétique

Le diabète affecte actuellement 422 millions de personnes dans le Monde. Sa prévalence a doublé depuis 1980, passant de 4,7 % à 8,5 %. On estime qu'en 2040, 1 adulte sur 10 sera diabétique. Les traitements pour cette pathologie entraînent des nombreux coûts, estimés dans le monde à plus de 590 milliards d'euros, soit entre 5 et 20 % des dépenses de santé des pays. Une des complications du diabète qui génère le plus des dépenses est la survenue des plaies des membres inférieurs, qui évoluent de manière chronique et qui affectent jusqu'à 15 % des patients diabétiques.

Les plaies diabétiques n'évoluent pas de manière classique, avec les phases de coagulation, d'inflammation, de prolifération et de remodelage de l'épiderme menant à la cicatrisation (Singer and Clark, 1999). Chez les patients diabétiques, suite aux problèmes d'innervation et de vascularisation des tissus, la barrière cutanée est rompue de manière prolongée et la plaie est progressivement colonisée par la flore cutanée. Dans ces conditions, les microorganismes commensaux peuvent se comporter comme des pathogènes opportunistes. Ils stimulent une réaction inflammatoire qui limite la cicatrisation et crée un cercle vicieux empêchant la fermeture de la lésion. Il a été montré que *C. acnes* et *S. epidermidis* peuvent adhérer à la plaie grâce à la formation des biofilms, ce qui compliquait la guérison de la plaie (Barnard and Li, 2017). L'observation des communautés microbiennes formant des biofilms suggère que, bien que chacune des espèces est inoffensive de manière individuelle, il existe des associations d'espèces, appelées « pathogroupes » qui présentent un potentiel de virulence important (Dowd et al., 2008). Les microorganismes colonisant les plaies chroniques sécrètent des facteurs qui stimulent l'inflammation, ce qui retarde la cicatrisation et induit un cercle vicieux. Le rôle néfaste des bactéries a été montré grâce à l'étude de la cicatrisation des plaies chez des souris axéniques (dépourvues de flore microbienne). En l'absence de microbiote cutané, les plaies guérissaient plus vite et ne laissaient pas de cicatrices, suite à une diminution de la réaction inflammatoire (Canesso et al., 2014). Des travaux plus récents confirment que les infections des plaies

sont dues à un déséquilibre des microorganismes colonisant la plaie, avec une prédominance des staphylocoques dans les plaies chroniques (Grice et al., 2010).

Les propriétés antimicrobiennes des microorganismes commensaux pourraient être intéressantes pour rétablir un équilibre microbien favorable à la cicatrisation. Elles pourraient aussi être utilisées dans la prévention des infections des plaies par des bactéries pathogènes.

1.3.3.3 Infections liées à *Streptoccoccus* sp.

Le genre *Streptococcus* comprend plus de 100 espèces bactériennes colonisant la peau et les muqueuses de l'Homme et des animaux. Ces bactéries font partie des flores commensales de la cavité orale, de l'intestin, de la peau et des voies aériennes supérieures. Cependant, de nombreuses espèces de streptocoques peuvent être impliquées dans des infections opportunistes. Les microorganismes le plus communément impliqués dans des infections liées au portage cutané sont *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus agalactiae* (Krzyściak et al., 2013).

1.3.3.3.1 Streptococcus pyogenes

Streptococcus pyogenes (streptocoque du groupe A, SGA) est principalement retrouvé au niveau pharyngé et cutané. Même s'il peut être présent dans la flore de manière asymptomatique, c'est une bactérie qui comporte des nombreux facteurs de virulence, tels que les enzymes lysant les tissus de l'hôte et les toxines pouvant entraîner des syndromes de choc. Au début du XXème siècle, cette bactérie était prénommée « mangeuse de chair » car elle provoquait des infections des plaies de guerre gravissimes, menant souvent à l'amputation. Elle était aussi responsable d'une forte mortalité des femmes dans les suites de l'accouchement, par infection utérines, appelées « fièvre puerpérale ». A présent, SGA est toujours responsable d'environ 700 millions d'infections par an dans le Monde, avec une mortalité atteignant 500 000 personnes. En Europe, l'incidence des infections pour 100 000 personnes est variable : 3,12 en Grande Bretagne, 3,1 en France et 3,9 en Finlande. La mortalité de ces infections dans ces pays est forte et atteint 19, 14 et 9 %, respectivement (Krzyściak et al., 2013).

Streptococcus pyogenes peut être responsable d'infections invasives de la peau : érysipèle, dermo-hypodermite nécrosante (Figure 1.3.3 – 4). La dermo-hypodermite peut rapidement évoluer vers une nécrose étendue des tissus nécessitant des excisions des muscles, voire l'amputation. Les D'autres formes d'infections invasives incluent les bactériémies, méningites, pleuropneumonies, arthrites, ostéomyélites, fièvres puerpérales… Les infections invasives représentent environ 20 % des

cas des infections à SGA. Les autres infections correspondant aux infections non invasives, telles que l'impétigo, l'angine ou l'otite. Certaines souches de SGA sécrètent des toxines qui sont à l'origine des manifestations toxiniques, telles que la scarlatine, le syndrome de choc toxique streptococcique et de toxi-infections alimentaires. Finalement, après une angine à SGA ont peut observer des syndromes post streptococciques, tels que rhumatisme articulaire aigu et glomérulonéphrite aiguë post streptococcique. Ces syndromes, sont probablement dus à une réponse immunologique vis-à-vis du SGA qui entraîne en même temps des réactions croisées contre les tissus humains (notamment tissu cardiaque, cérébral ou articulaire) (CMIT, 2018, Krzyściak et al., 2013).

Figure 1.3.3 – 4

Infections cutanées dues à *S. pyogenes*. Infection superficielle – impétigo ; infections invasives – érysipèle et dermo-hypodermite nécrosante (healthh.com, http://etudiants.larevuedupraticien.fr, www.healthline.com)

Parmi les différentes classes d'antibiotiques, les ß-lactamines constituent le traitement de référence des infections à SGA. La résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines, molécules très prescrites en pédiatrie est d'environ 5 % (Rapport du CNR Streptocoques 2016). Bien qu'efficaces sur les infections aiguës, les antibiotiques sont parfois incapables d'éradiquer complétement la présence de SGA même après un traitement bien conduit. Le portage prolongé de SGA est souvent à l'origine des récurrences des infections, notamment de pharyngites et d'érysipèles. Le portage pharyngé est estimé chez les enfants à 5 – 25 % (DeMuri and Wald, 2014). Dans une étude des années 1970, 20 % de 132 patients (adultes et enfants) présentaient des cultures de prélèvements pharyngés positives à SGA après une première cure de pénicilline, 50 % après la deuxième cure et 42 % après la troisième cure (Gastanaduy et al., 1980). Ce portage peut être dû à l'internalisation des souches de SGA dans des cellules épithéliales ou à la production de biofilm par la bactérie. Il a aussi été proposé

que l'échec de traitement par la pénicilline peut être dû à la production des pénicillinases (enzymes détruisant les pénicillines) par les souches de la flore commensale au niveau du pharynx (*Bacteroides, Moraxella, Haemophilus*) (DeMuri and Wald, 2014). Des stratégies alternatives à l'antibiothérapie sont donc nécessaires pour éradiquer le portage prolongé de SGA et limiter la prévalence des infections récurrentes. Malgré des nombreuses études, il n'existe pas à ce jour de vaccin contre SGA. Un vaccin dirigé contre des épitopes de la protéine M est en cours d'élaboration et semble prometteur (Krzyściak et al., 2013). Une autre stratégie pourrait employer des microorganismes probiotiques pour équilibrer le microbiote favorable et éradiquer le portage de *S. pyogenes*.

1.3.3.3.2 Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae ou streptocoque du groupe B (SGB) est une bactérie commensale des voies digestives. Il est aussi retrouvé dans la région périnéale et dans le tractus génito-urinaire. Il est reconnu comme le principal agent étiologique des infections néonatales précoces et tardives sous forme de bactériémie, pneumonie (80 % de cas) ou, plus rarement, méningite (10 % de cas) ou ostéomyélite. La mortalité de ces infections néonatales atteint 4 %. *S. agalactiae* est également impliqué dans un grand nombre d'infections graves chez la femme enceinte ou en post-partum et d'infections invasives chez l'adulte en dehors de la grossesse, en particulier chez les sujets de plus de 65 ans. Les infections du sujet âgé atteignent 7,3 cas annuels pour 100 000 individus aux Etats-Unis. Elles sont associées à un fort taux de mortalité, qui avoisine 20 % (Krzyściak et al., 2013).

Les β-lactamines constituent les antibiotiques de choix dans les infections à SGB. La résistance aux macrolides et lincosamides, utilisés en cas d'allergie aux β-lactamines et dans les infections ostéo-articulaires, concerne environ 20 % des isolats en France, ce qui est source d'inquiétude pour la prise en charge de ces infections (CMIT 2018, Rapport du CNR des Streptocoques 2016).

On estime à 10-30 % la fréquence de portage de SGB au niveau vaginal chez les femmes enceintes. Une introduction de dépistage à grande échelle de portage de SGB avant l'accouchement a permis de diminuer l'incidence d'infections néonatales à 3-4 cas par 10 000 naissances vivantes en 2010 aux Etats-Unis. En cas de dépistage positif, une antibioprophylaxie *per-partum* par amoxicilline est utilisée. Cette prophylaxie prévient le risque infectieux précoce mais n'élimine pas les infections néonatales tardives (Krzyściak et al., 2013; Vornhagen et al., 2017). D'autres stratégies pour limiter le portage de SGB sont donc recherchées. Il n'existe pas actuellement de vaccin contre SGB. Son développement suscite un vif intérêt compte tenu de l'incidence croissante des infections à SGB chez l'adulte et de l'incapacité à prévenir l'infection néonatale tardive par l'antibioprophylaxie *per-partum*

(CMIT 2018, Rapport du CNR des Streptocoques 2016). D'autres stratégies d'éradication du portage de SGB, par exemple par la modulation du microbiote vaginal par des probiotiques, pourraient être envisagées.

1.3.4 Rôle des microorganismes commensaux dans le maintien de l'équilibre du microbiote cutané

1.3.4.1 Le rôle barrière des microorganismes commensaux : une « compétition saine » avec les microorganismes pathogènes

La flore cutanée joue de nombreux rôles bénéfiques pour l'hôte. D'une part, elle « entraîne » le système immunitaire pour le rendre plus efficace face aux pathogènes. D'autre part, grâce à « l'effet barrière », le microbiote cutané assure la protection contre l'implantation d'espèces pathogènes (Buffie and Pamer, 2013). La résistance à la colonisation peut être due à l'occupation de l'espace (exclusion spatiale) et l'inhibition de l'adhésion des pathogènes par la compétition pour les récepteurs ou par la synthèse de mucines (Oelschlaeger, 2010). Les microorganismes peuvent également mettre en place des mécanismes de compétition pour des ressources (compétition par exploitation), qui prive les colonisateurs potentiels des substrats nutritionnels et empêche leur implantation. Les bactéries peuvent également directement inhiber la croissance d'autres microorganismes par une inhibition de contact ou par le biais des substances diffusibles, telles que les bactériocines (compétition par interférence) (pour une description détaillée, cf. paragraphe 1.1).

Différentes espèces de staphylocoques à coagulase négative produisent des substances peptidiques inhibitrices vis-à-vis des pathogènes cutanés tels que *S. aureus* et streptocoques impliqués dans la mastite bovine (O'Sullivan et al., 2019). *S. epidermidis,* un des microorganismes les plus abondants de la flore cutanée produit plusieurs bactériocines de la classe des lantibiotiques (cf. paragraphe 1.1.3). Les lantibiotiques, tels qu'épidermine, Pep5, épilancine K7 et épicidine 280 ont la capacité d'inhiber la croissance des *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) et de staphylocoques à coagulase négative impliqués dans des infections humaines. De plus, certaines bactériocines (ex. Pep5) inhibent l'adhésion de *S. aureus* et *S. epidermidis* aux cathéters (Christensen and Brüggemann, 2014; Fontana et al., 2006). Cette inhibition peut être observée même après une colonisation initiale du cathéter, ce qui permettrait d'utiliser ces molécules au moment de la mise en place du dispositif, diminuant ainsi le risque des bactériémies nosocomiales liées au cathéter. Une autre bactériocine,

l'épidermicine NI01, présente une activité contre plusieurs pathogènes à Gram positif, dont SARM et *S. epidermidis* formant les biofilms (Christensen and Brüggemann, 2014). La production des bactériocines par *S. epidermidis* est régulée par le système de quorum-sensing *agr (accessory gene regulator).* La mise en route de ce système est en général associée avec le passage à la phase stationnaire de croissance. Le système *agr* est activé par des phéromones peptidiques extracellulaires de *S. epidermidis*. Ces phéromones sont capables en parallèle d'inhiber le système *agr* de *S. aureus,* et ainsi freiner son potentiel de virulence. Ceci procure un avantage sélectif à *S. epidermidis*, ce qui pourrait partiellement expliquer sa prédominance dans la flore cutanée et dans les infections liées aux dispositifs intravasculaires. L'inhibition croisée du système *agr* de *S. aureus* par les phéromones de *S. epidermidis* a été utilisée avec succès dans un modèle d'infection chez la souris (Otto et al., 1999, 2001).

Le potentiel antimicrobien de *Cutibacterium* sp. a été décrit dans le chapitre 1.2.2 et son étude sera approfondie dans ces travaux de thèse. Il est intéressant dans ce contexte de mentionner une étude récente, dans laquelle Christensen et al. (2016) ont testé des antagonismes croisés entre *C. acnes* et *S. epidermidis. C. acnes* du phylogroupe I-2 inhibait significativement plus de souches de *S. epidermidis* que les autres phylogroupes de cette espèce. Ceci est probablement lié à la production d'une bactériocine de la classe de thiopeptides, conservée au sein du groupe I-2 de *C. acnes*. Inversement, la majorité de souches de *S. epidermidis* était capable d'inhiber *C. acnes*. Ceci indique que les antagonismes antibactériens entre ces deux microorganismes, les plus abondants de la flore cutanée, permettent de réguler finement l'équilibre du microbiote cutané.

1.3.4.2 Pistes thérapeutiques alternatives à l'antibiothérapie : probiotiques, bactériocines…

L'émergence de l'antibiorésistance nécessite une recherche urgente de thérapeutiques alternatives. Parmi elles, on peut envisager les vaccins, les substances immunomodulatrices, mais surtout des stratégies employant le potentiel antagoniste des bactéries permettant de rééquilibrer les microbiotes naturels. Ces dernières pourraient permettre de lutter contre les infections impliquant les microorganismes résistants aux antibiotiques classiques. Elles pourraient aussi limiter la pression de sélection des nouvelles résistances aux antibiotiques.

Nous avons vu que les propionibactéries cutanées et laitières présentaient des nombreuses activités protectrices, permettant de rétablir l'équilibre du microbiote cutané et de lutter contre l'implantation des pathogènes. Elles ont notamment une capacité à fabriquer des bactériocines,

peptides à activité antibactérienne, qui sont des facteurs importants dans les interactions bactériennes. En effet, ces molécules peuvent moduler la composition du microbiote soit directement par leur activité antibactérienne (*killing peptide*), soit par des mécanismes de communication inter-bactérienne de type quorum sensing (*signalling peptide*) (Cotter et al., 2013). De plus, des travaux récents ont mis en évidence l'impact des bactériocines sur la modulation de système immunitaire de l'hôte (Meijerink et al., 2010).

L'utilisation des bactériocines pourrait être particulièrement intéressante comme alternative à l'antibiothérapie pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les bactériocines ont souvent une activité spécifique de haut niveau contre les pathogènes (incluant les souches résistantes aux antibiotiques). Elles agissent également à des concentrations nanomolaires, bien inférieures aux concentrations nécessaires à l'activité des antibiotiques. Elles ont des mécanismes d'action qui diffèrent de ceux connus pour les antibiotiques et présentent habituellement une faible toxicité. Elles ont en général un spectre d'activité étroit, qui permet une action ciblée sur l'espèce pathogène et de ce fait de conserver l'équilibre du microbiote commensal tout en limitant la sélection de souches résistantes. Enfin, compte tenu de leur nature peptidique, les bactériocines peuvent être assez facilement modifiées par la bio-ingénierie afin d'améliorer leur propriétés (Cotter et al., 2013).

Plusieurs bactériocines de la classe de lantibiotiques et de thiopeptides ont été testées sous forme purifiée *in vivo* et ont montré leur capacité à inhiber la croissance de staphylocoques et d'entérocoques sur des cathéters vasculaires (Fontana et al., 2006). Le lantibiotique nisine, qui est la première bactériocine commercialisée et utilisée dans la préservation des aliments, a aussi montré son efficacité contre des souches cliniques de streptocoques. Il a été montré que son activité était 8 à 16 fois plus importante que celle de la vancomycine (Goldstein et al., 1998). Le variant F de la nisine s'est avéré efficace pour traiter des infections à *S. aureus* et ce, dans différents sites corporels (Cotter et al., 2013). Des variants semi-synthétiques de thiopeptides, qui ont une meilleure solubilité que les molécules natives, ont aussi montré des performances supérieures à certains antibiotiques, linézolide et vancomycine, dans un modèle d'infection systémique à *S. aureus* (Xu et al., 2009). Plus récamment, Cebrián et al., (2018) ont décrit un peptide circulaire tête-queue AS-48, produit par des souches d'entérocoques, présentant une activité anti-*Cutibacterium acnes.* Compte tenu de son innocuité vis-à-vis des cellules de l'épiderme, son utilisation dans le conrôle de l'acné pourrait être envisagée.

L'utilisation des bactériocines purifiées sous forme topique (crèmes, pansements) a prouvé son efficacité dans des modèles murins de plaies infectées par *S .aureus* (Baquerizo, Nole et al., 2014; Heunis et al., 2013). Dans l'étude de Heunis et al. (2013), un pansement en nanofibre a été recouvert

de nisine (Nivaline). Il s'est montré efficace dans le traitement de plaies infectées par SARM, en réduisant considérablement l'inoculum bactérien et en accélérant la cicatrisation.

Il existe aussi des bactériocines à large spectre, ce qui peut être intéressant dans des thérapies probabilistes, i.e. avant l'identification de l'agent étiologique. Cependant, le large spectre d'action induit des effets collatéraux sur le microbiote commensal, en induisant une dysbiose et en sélectionnant des souches résistantes. C'est pourquoi, l'utilisation très ciblée des bactériocines à spectre étroit suscite plus d'intérêt. Des résultats intéressants ont ainsi été obtenus dans le traitement ciblé des infections à *Clostridium difficile* et des vaginoses bactériennes à *Gardnerella vaginalis* (Cotter et al., 2013). L'utilisation de bactériocines pour l'éradication ciblée des portages cutanés et muqueux des streptocoques pourrait également représenter une alternative thérapeutique destinée à limiter les infections liées à ces espèces.

Outre l'utilisation sous forme purifiée, les bactériocines peuvent être fabriquées dans le site de l'infection par des souches productrices, utilisées comme probiotiques. Le terme probiotique signifie « pour la vie » et définit les microorganismes vivants, qui procurent des bénéfices pour la santé de l'hôte s'ils sont administrés en quantités adéquates (Holzapfel et al., 1998). L'utilisation des probiotiques concerne traditionnellement leur ingestion, donnant des bénéfices au niveau intestinal. Les bactéries lactiques et les propionibactéries laitières, présentes dans les aliments fermentés, ont depuis longtemps été utilisés comme probiotiques dans le tube digestif en raison de leur résistance aux enzymes intestinales et leur capacité d'adhésion aux entérocytes (cellules de l'intestin). Ces bactéries sont inoffensives pour l'hôte et ne portent pas de gènes de résistance aux antibiotiques (Cousin et al., 2011; Reid, 2016). Les propionibactéries laitières sont connues pour leur capacité à modifier le microbiote intestinal. Ainsi, l'utilisation d'*A. acidipropionici* limite la croissance de *Bacteroides* sp. chez les poussins en phase précoce d'élevage. Plusieurs souches de propionibactéries laitières ont aussi été capables d'inhiber la croissance de *Streptococcus bovis* dans le contexte d'acidose ruminale chez les bovins.

Les prébiotiques sont des substrats qui facilitent la croissance des bactéries bénéfiques. Le terme prébiotique a été développé initialement pour les substances ingérées qui stimulaient la croissance des microorganismes probiotiques au niveau intestinal. Comme exemples, on peut citer les fructo-oligosaccharides, le glucomannane, l'inuline, le lactulose, le sorbitol ou le xylitol. Pour la peau, dans les formules cosmétiques, le terme prébiotique concerne les hydrates de carbone qui stimulent la croissance de la flore cutanée équilibrée, bénéfique. Parmi eux, on peut citer les fructo-oligosaccharides ou le glucomannane de Konjac (Krutmann, 2009). Il a été montré que les prébiotiques étaient capables de réduire la croissance des bactéries pathogènes, telles que *S. aureus* (Akiyama et

al., 2002). D'autres autres auteurs ont observé que les hydrolysts du glucomannane ont permis de réduire les symptômes de l'acné, probablement par une actionsur la physiologie des glandes sébacées et par la désobstruction des pores cutanés (Al-Ghazzewi and Tester, 2010).

L'action des probiotiques et des prébiotiques est complémentaire et la combinaison des deux est appelée symbiotique. Ce type de préparations augmente la survie de la souche probiotique, ce qui facilite son implantation *in vivo,* même dans des habitats peu favorables, tels que la peau (Al-Ghazzewi and Tester, 2014; Krutmann, 2009). Dans ce contexte, l'utilisation des souches adaptées à l'habitat cutané, comme les propionibactéries, pourrait permettre d'éviter le problème de la non-colonisation du site par la souche probiotique.

Au niveau cutané, l'effet bénéfique des probiotiques peut être obtenu par ingestion des microorganismes probiotiques ou par leur application topique (Al-Ghazzewi and Tester, 2014; Mottin and Suyenaga, 2018).

L'ingestion des souches probiotiques de *Lactobacillus* sp. a permis une diminution des symptômes d'acné en inhibant, le plus probablement, la production des cytokines pro-inflammatoires (Paszti-Gere et al., 2012). L'ingestion des probiotiques a aussi montré des effets bénéfiques sur la sévérité de la dermatite atopique (Baquerizo Nole et al., 2014). Dans un essai randomisé en double aveugle, l'utilisation d'une souche probiotique de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 a permis de moduler la réponse immunitaire de la peau, en contribuant à sa préservation face aux agressions environnementales (Peguet-Navarro et al., 2008). L'administration des souches probiotiques peut aussi stimuler la croissance de certains microorganismes bénéfiques pour l'hôte, ce qui est assimilé à un effet prébiotique. Ceci est le cas de *P. freudenreichii* ET-3 dont la consommation favorise la prolifération de bifidobactéries, qui ont des nombreux rôles bénéfiques pour l'organisme, dépassant leur utilité locale au niveau intestinal (Hojo et al., 2002) .

Les applications topiques des probiotiques présentent un effet bénéfique dans les sites d'application, en stimulant les systèmes de défense naturelle de la flore cutanée. Ainsi, il a été montré que l'application d'une souche *Vitreoscilla filiformis* (Gram négatif non-pathogène) sur des lésions de dermatite séborrhéique ou d'eczéma, a contribué à la diminution des symptômes. Cet effet était attribué notamment à l'inhibition de croissance de *S. aureus* (Gueniche et al., 2008). Dans une autre étude, Guéniche et al. (2010) ont montré que l'application d'une crème contenant le lysat d'une souche de *Bifidobacterium longum* a augmenté la résistance cutanée aux agressions physiques et chimiques. Comme dans le cas du microbiote naturel, les souches probiotiques appliquées localement, peuvent exercer leurs effets grâce aux mécanismes de compétition avec les bactéries pathogènes, notamment en produisant des bactériocines. Cet effet a été montré pour une souche de *Streptococcus*

salivarius productrice de bactériocine qui permettait de contrôler la croissance de bactéries responsables de l'halitose (mauvaise haleine) (Burton et al., 2006). La production de bactériocine par une autre souche de *S. salivarius* semble aussi prometteuse dans la prévention de l'angine à *S. pyogenes* (Tagg, 2004) . On a également montré la capacité de certains probiotiques à inhiber la formation de biofilm, ce qui réduit la capacité de certains pathogènes à coloniser les muqueuses (Bavington and Page, 2005) et pourrait être intéressant pour limiter la colonisation des plaies chroniques par les pathogènes opportunistes.

Les bactéries appartenant au genre *Cutibacterium* sont proches phylogénétiquement des propionibactéries laitières et pourraient être considérés comme des microorganismes « chimères ». En effet, ces bactéries présentent un certain potentiel pathogène mais également de multiples vertus protectrices, assurant l'équilibre du microbiote cutané. L'utilisation de propionibactéries laitières et cutanées comme probiotiques ou comme source de bactériocines purifiées pourrait donc être envisagée dans différentes applications cliniques, telles que le traitement des plaies chroniques, de l'acné ou des infections liées aux cathéters. Pour cela, on doit d'abord mieux évaluer le potentiel compétitif des propionibactéries. De plus, une meilleure compréhension du rôle de la compétition bactérienne des propionibactéries dans leurs habitats naturels est nécessaire.

Objectifs et aspects méthodologiques des travaux de thèse

Différents types d'habitats exposent les souches bactériennes à des stress de nature diverse qui pourraient favoriser, selon l'habitat, plusieurs types de stratégies de survie et de domination, parmi lesquelles la compétition par interférence.

Les souches de propionibactéries laitières (*Propionibacterium* spp., *Acidipropionibacterium* spp.) et cutanées (*Cutibacterium* spp.) sont proches phylogénétiquement mais sont issues de deux environnements différents, produits laitiers et peau de l'homme. La question de l'influence de l'habitat sur la sélection des comportements de type compétitif est posée. Par ailleurs existe-t-il une « spécificité » des spectres d'action de ces propionibactéries en fonction de leur habitat ? Une souche d'origine alimentaire va-t-elle inhiber uniquement des souches cibles d'origine alimentaire, des souches cibles d'origine clinique, les deux, et inversement ? Par ailleurs, le fait de tester l'activité inhibitrice de souches « productrices » vis-à-vis de souches cibles d'habitat différent est peu fréquent et devrait permettre de mettre en évidence de nouvelles souches inhibitrices à spectre d'activité spécifique. En effet, l'émergence de l'antibiorésistance nécessite une recherche urgente de thérapeutiques alternatives. Parmi celles-ci, des stratégies employant le potentiel antagoniste des bactéries peuvent être envisagées.

L'objectif de ce travail de thèse était, dans un premier temps, d'analyser l'influence de l'habitat naturel sur la sélection et la spécificité de comportement de type compétitif, notamment *via* la compétition par interférence liée à la production de substances antagonistes et dans un second temps de rechercher des souches de propionibactéries présentant des activités inhibitrices vis-à-vis de souches d'intérêt cliniques (Figure 1.3.5 - 1).

Dans la première partie de ce travail, la proportion, l'intensité et la spécificité des comportements de type compétitif au sein des propionibactéries laitières et cutanées a été analysée par deux approches complémentaires, phénotypique et génomique : (i) l'activité inhibitrice d'une collection de souches de propionibactéries alimentaires et cliniques a été analysée vis-à-vis d'espèces présentes dans les deux types d'habitats ; (ii) les types de métabolites potentiellement produits par ces deux groupes de propionibactéries ont été recensés et comparés par une étude de clusters de gènes de métabolites spécialisés présents dans les génomes des propionibactéries disponibles dans la base de données NCBI.

Dans la deuxième partie de ce travail, une activité inhibitrice intéressante d'un point de vue clinique a été caractérisée. Lors du criblage phénotypique, une activité particulièrement marquée d'une des souches de propionibactéries laitières vis-à-vis de *Streptococcus pyogenes* a été notée. Ce pathogène majeur est une des principales causes d'infections de la peau, pour lesquelles des solutions alternatives aux traitements par les antibiotiques sont actuellement recherchées.

L'objectif de cette deuxième partie d'étude a donc été de caractériser la nature des substances antagonistes à activité anti-*S. pyogenes* produites par la souche d'*Acidipropionibacterium jensenii* CIRM-BIA 1785. L'étude s'est focalisée sur la caractérisation des métabolites spécialisés impliqués dans la compétition par interférence. Deux approches complémentaires, phénotypique et génomique, ont été utilisées : (i) l'activité biologique et les propriétés physico-chimiques du composé anti-streptococcique produit dans le surnageant de culture ont été caractérisées et des essais de purifications du composé actif ont été réalisés ; (ii) les clusters de gènes de métabolites spécialisés présents dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, qui pourraient potentiellement être responsables de l'activité antibactérienne de cette souche, ont été analysés.

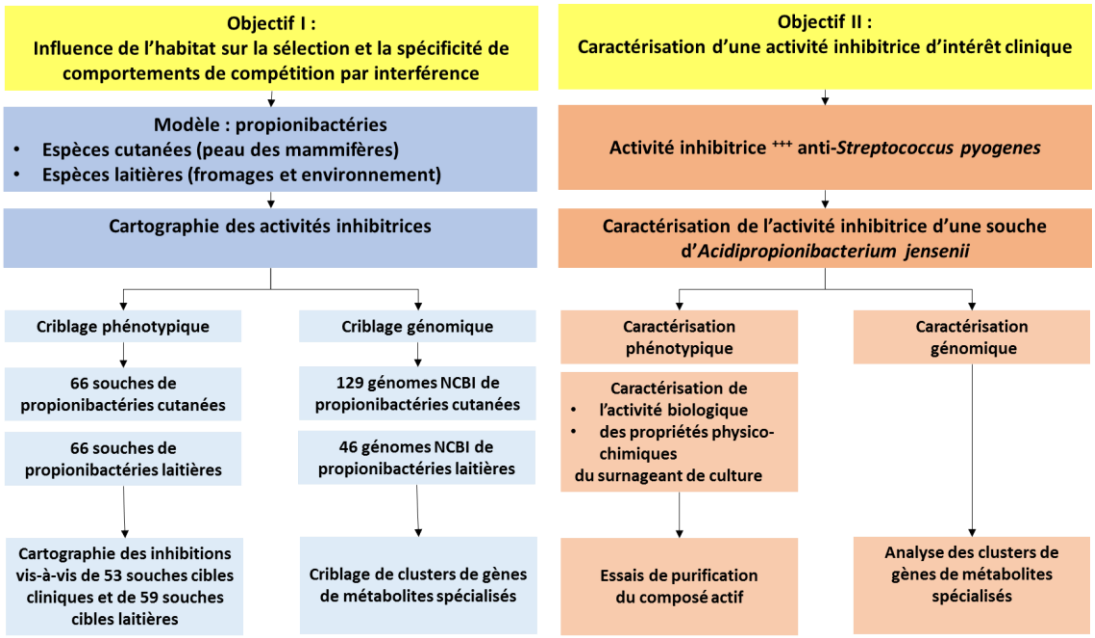


Figure 1.3.5 – 1

Représentation schématique des objectifs des travaux de thèse et de la méthodologie suivie.

2 Résultats et discussion

2.1 Activité antagoniste des propionibactéries et rôle écologique

2.1.1 Contexte

L'habitat est l'environnement naturel d'une espèce donnée et comporte des caractéristiques physiques et biologiques nécessaires pour la survie et la reproduction de cette dernière. En même temps, au sein d'un habitat, l'espèce est exposée aux différents types de stress abiotiques (température, pression osmotique, etc.) et à la compétition. La compétition est un processus par lequel un individu limite la survie et la reproduction d'autres individus. Deux types de compétition sont traditionnellement distingués : compétition par exploitation et compétition par interférence. La compétition par exploitation est indirecte et survient quand un organisme consomme les ressources d'un autre organisme. La compétition par interférence est directe et survient quand un organisme attaque un autre individu. Dans le monde bactérien, cette attaque est le plus souvent effectuée en utilisant des « armes chimiques », telles que les antibiotiques ou les bactériocines. Les expérimentations de co-culture montrent que les différentes stratégies de compétition peuvent déterminer quels génotypes prédominent dans des cultures mixtes.

Il peut être spéculé que les microorganismes partageant un même habitat peuvent avoir des histoires évolutives différentes pour coloniser et prédominer dans cet habitat donné, selon le type de stress, abiotique ou compétitif, qu'il procure.

De plus, selon Leisner & Haaber (2012), différentes proportions d'espèces productrices de bactériocines, de souches sensibles et de souches résistantes vont perdurer dans un habitat selon sa richesse en ressources nutritionnelles. Ainsi, dans des habitats riches en nutriments où la croissance du microorganisme est similaire à celle observée dans une culture continue, tels que l'intestin ou la peau, le succès évolutif dépend principalement de la prolifération rapide d'une espèce donnée. Dans un tel système, la production d'une bactériocine et la résistance à cette dernière entraînent des coûts sur le «fitness» des individus, qui ont de ce fait une prolifération ralentie. La population bactérienne sensible aux bactériocines ne subit aucun coût lié à la production ni à la résistance et présente donc une prolifération plus rapide. Elle est cependant inhibée par les bactériocines. Finalement, il se produit un équilibre entre les trois génotypes (producteur, sensible et résistant), comme dans le modèle de jeu « pierre-papier-ciseaux ».

A l'inverse, dans des habitats où la croissance s'apparente à de la « culture en batch », tels que le fromage en cours de maturation, on passe d'une abondance nutritionnelle à une situation de carence. La pression de sélection dans ce type d'habitat sélectionnerait des souches qui ont les meilleures capacités de survie (la mortalité la plus faible). Ici, le coût de production de bactériocine est diminué par le bénéfice lié aux nutriments libérés par les cellules sensibles, lysées. Dans ces conditions, selon Leisner & Haaber (2012), les génotypes privilégiés seraient les producteurs et les individus résistants aux bactériocines. Il existe cependant peu d'études expérimentales explorant la proportion des génotypes sélectionnés au sein de différents types d'habitats.

Dans ce contexte, les propionibactéries constituent un modèle intéressant pour étudier l'influence du type d'habitat sur la sélection des comportements de type compétitif, notamment la compétition par interférence.

Plusieurs molécules antimicrobiennes ont été identifiées chez les représentants des deux groupes de propionibactéries.

Les propionibactéries produisent des métabolites primaires, tels que le peroxyde d'hydrogène et des acides organiques qui présentent une activité inhibitrice. De plus, une dizaine de bactériocines ont été décrites chez les propionibactéries laitières du genre *Acidipropionibacterium* : propionicine PLG-1 (Lyon and Glatz, 1991); jenseniine G (Grinstead and Barefoot, 1992), jenseniine P (Ratnam et al., 1999); propionicines SM1 et SM2 (Miescher et al., 2000; Susanne Miescher, 1999); propionicine T1 (Faye et al., 2000); thoeniicine 447 (Van der Merwe et al., 2004); propionicine GBZ-1 (Ben-Shushan et al., 2003); et protease-activated antimicrobial peptide (PAMP) (Faye et al., 2002). Chez *P. freudenreichii*, la propionicine F (Brede et al., 2004) et un lipopeptide antimicrobien (Hajfarajollah et al., 2014) ont été identifiés.

Chez les propionibactéries cutanées, *C. acnes* et *C. avidum*, plusieurs molécules antibactériennes (acnécines et propionicines) ont également été signalées (Fujimura and Nakamura, 1978; Ko et al., 1978; Paul and Booth, 1988).

Cependant la prévalence de souches productrices et le rôle de l'activité antimicrobienne dans les habitats des propionibactéries sont encore peu étudiés. Par ailleurs, ce groupe bactérien rassemble des espèces proches phylogénétiquement mais adaptées à deux habitats très différents. Les propionibactéries « laitières » (*Acidipropionibacterium* sp. et *Propionibacterium* sp.) sont issues d'habitats sélectifs, caractérisés par un grand nombre de stress abiotiques lors du processus de fabrication des fromages à pâte pressée cuite. Cet habitat s'apparente à un modèle de « culture en batch », dans lequel les propionibactéries sont exposées à une compétition pour des ressources limitantes. D'autre part, les propionibactéries « cutanées » (*Cutibacterium* sp.) colonisent la peau des

mammifères qui constitue un habitat plus favorable, de type « culture continue », avec un accès facilité aux nutriments. De plus, au sein de leurs habitats, les propionibactéries cutanées peuvent être confrontées à une grande diversité de microorganismes concurrents adaptés à l'habitat cutané, contrairement aux propionibactéries laitières, qui rencontrent un plus faible nombre d'espèces capables de survivre au processus de fabrication des fromages à pâte pressée cuite. Il pourrait donc exister une spécificité d'inhibitions inter-espèces en fonction de l'habitat des souches cibles (laitières ou cutanées).

2.1.2 Objectifs

L'objectif de cette étude était d'étudier l'influence de l'habitat naturel sur la sélection et la spécificité des comportements de type compétitif, notamment la compétition par interférence, liés à la production de substances antagonistes. La proportion, l'intensité et la spécificité des antagonismes a été comparée entre les différents groupes de propionibactéries, cutanées et laitières, par deux approches complémentaires, phénotypiques et génomiques : (i) L'activité inhibitrice d'une collection de propionibactéries alimentaires et cliniques a été analysée vis-à-vis d'espèces présentes dans les deux types d'habitats ; (ii) le type de métabolites potentiellement produits par ces deux groupes de propionibactéries a été recensé et comparé par une étude des clusters de gènes de métabolites antagonistes présents dans les génomes des propionibactéries disponibles dans la base de données NCBI.

2.1.3 Méthodes

2.1.3.1 Souches bactériennes

Les propionibactéries cutanées et les souches cibles cliniques sont issues de la collection du Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy (collection LBN - Laboratoire de Bactériologie de Nancy). Les propionibactéries laitières sont issues de la collection CIRM-BIA (Centre International de Ressources Microbiennes – Bactéries d'Intérêt Alimentaire). Les souches cibles laitières sont issues de la collection CIRM-BIA et de la collection du LIBio (ENSAIA, Nancy).

Une collection de 66 souches de propionibactéries cutanées (espèce *Cutibacterium acnes*) et de 66 souches de propionibactéries laitières (2 espèces de *Propionibacterium* sp. et 4 espèces d' *Acidipropionibacterium* sp.) a été sélectionnée afin d'analyser leur potentialité de production de substances antagonistes (souches expéditrices) (Tableau 2.1.3 - 1 et Annexes 1.1 - 1 et 1.1 - 2). Les abréviations cPAB (pour *cutaneous propionibacteria*) et dPAB (pour *dairy propionibacteria*) ont été utilisées pour coder les souches expéditrices cutanées et laitières, respectivement.

Tableau 2.1.3 – 1

Composition de la collection de souches expéditrices de propionibactéries

Microorganismes			Nombre de souches	Conditions de croissance (milieu/température/atmosphère)
Groupes	Genres	Espèces		
"laitiers"	*Propionibacterium*	*freudenreichii*	25	YEL/30 °C/anaérobiose
		cyclohexanicum	1	YEL/37 °C/anaérobiose
	Acidipropionibacterium	*acidipropionici*	13	YEL/30 °C/anaérobiose
		jensenii	13	
		thoenii	13	
		microaerophilum	1	
	Pseudopropionibacterium	*propionicum*	1	
"cutanés"	*Cutibacterium*	*acnes*	66	YEL/37 °C/anaérobiose

La collection des souches cibles cliniques est constituée de 45 espèces bactériennes de la flore commensale cutanée et d'espèces cliniques pathogènes, à Gram positif et à Gram négatif, et de 8 souches appartenant à 2 espèces de *Cutibacterium* sp. Les souches « cutanées » sont issues de différents prélèvements cliniques (hémocultures, prélèvements neuro-méningés et ostéo-articulaires, pus)

La collection des souches cibles alimentaires comprend 51 souches appartenant à 21 espèces bactériennes isolées d'aliments et de 8 souches de propionibactéries d'origine laitière appartenant à 6 espèces différentes.

Les souches cibles ont été choisies selon deux critères, soit leur potentiel pathogène, soit la probabilité de partager leur habitat avec les propionibactéries laitières (Tableaux 2.1.3 – 2 et Annexes 1.1 – 3 et 1.1 - 4).

Tableau 2.1.3-2 Ensemble des souches cibles d'origine clinique (c) ou alimentaires (a) et conditions de culture

Groupes	Familles	Microorganismes	origine	Nombre de souches testées	Oorigine	Conditions de croissance (milieu/température /atmosphère)
Bacteroidetes	*Bacteroidaceae*	*Bacteroides fragilis*	drain pleural	1	*c*	TSYE/37°C/anaérobiose
		Bacteroides vulgatus	os 4ème orteil pied G	1	*c*	
		Bacteroides caccae	plaie jambe	1	*c*	
		Bacteroides ovatus	abcès abdominal	1	*c*	
		Bacteroides thetaiotamicron		1	*c*	
	Prevotellaceae	*Prevotella intermedia*	os hanche	1	*c*	
		Prevotella denticola	abcès cervical	1	*c*	
	Fusobacteriaceae	*Fusobacterium nucleatum*	vésicule biliaire	1	*c*	
Proteobacteria	*Morganellaceae*	*Proteus mirabilis*		1	*c*	TSYE/37°C/aérobiose
	Enterobacteriaceae	*Escherichia coli*	selles q	1	*c*	
		Klebsiella pneumoniae	selles q	1	*c*	
	Moraxellaceae	*Acinetobacter baumanii*	pulpe 2ème orteil pied D	1	*c*	
	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas aeruginosa*	crachat	1	*c*	
Actinobacteria	*Actinomycetales*	*Micrococcus flavus*		1	*a*	TSYE/37°C/aérobiose
	Dermabacteraceae	*Dermatobacter hominis*	os	1	*c*	TSYE/37°C/aérobiose
	Corynebacteriaceae	*Corynebacterium amylocatum*	os pied	1	*c*	TSYE/37°C/aérobiose
		Coryebacterium tuberculostearicum	KT ECMO	1	*c*	TSYE/37°C/aérobiose
	Propionibacteriaceae	*Acidipropionibacterium acidipropionici dPAB A1*	NR	1	*a*	YEL/30°C/anaérobiose
		Propionibacterium cyclohexanicum dPAB B2	Jus d'orange altéré	1	*a*	
		Propionibacterium freudenreichii dPAB B3	Fromage Suisse	1	*a*	
		Propionibacterium freudenreichii dPAB C5	Gruyère	1	*a*	
		Acidipropionicum jensenii dPAB D5	NR	1	*a*	
		Acidiropionibacterium microaerophilum dPAB F5	Eau station lagunage Anjou	1	*a*	
		Acidipropionibacterium thoenii dPAB E9	Gruyère	1	*a*	
		Acidiropionibacterium thoenii dPAB F1	Eau station lagunage Anjou	1	*a*	
		Cutibacterium acnes cPAB A2	Liquide péricardique	1	*c*	
		Cutibacterium acnes cPAB C3		1	c	
		Cutibacterium acnes c PAB F1	Cellules Souches	1	c	
		Cutibacterium acnes cPAB G1	Prélèvement peau, tissus, muscles	1	c	
		Cutibacterium acnes cPAB B11	Prélèvement ostéo-articulaire	1	c	
		Cutibacterium acnes cPAB D7	Liquide pleural	1	c	
		Cutibacterium avidum cPAB D8	Empyème	1	c	
		Cutibacterium granulosum cPAB F1	Cellules Souches	1	c	
	Mycobacteriaceae	*Mycobacterium chelonae*	souche type	1	*c*	TSYE/37°C/aérobiose
		Mycobacterium abscessus		1	*c*	
		Mycobacterium fortuitum		1	*c*	
Firmicutes	*Veillonellales*	*Veillonella parvula*	abcès fosse iliaque	1	*c*	TSYE/37°C/anaérobiose
	Clostridiaceae	*Clostridium perfringens*	fausse membrane	1	*c*	
		Clostridium ramosum	abcès abdominal	1	*c*	
	NA	*Parvimonas micra*	abcès	1	*c*	TSYE/37°C/anaérobiose
		Finegoldia magna	os escarre	1	*c*	
		Peptoniphilus asaccharolyticus	os halux	1	*c*	
	Listeriaceae	*Listeria ivanovii*		1	*a*	TSYE/37°C/aérobiose
		Listeria mocnocytogenes		1	*a*	
		Listeria innocua		1	*a*	
	Staphylococcaceae	*Staphylococcus aureus*	liquide articulaire	1	*c*	TSYE/37°C/aérobiose
		Staphylococcus auricularis	hémoculture	1	*c*	
		Staphylococcus caprae	os (phalange) MS	1	*c*	
		Staphylococcus capitis	hémoculture endocardite MS	1	*c*	
		Staphylococcus cohnii	hémoculture	1	*c*	
		Staphylococcus epidermis	abcès de cornée	1	*c*	
		Staphylococcus equourum	KT ECMO	1	*c*	
		Staphylococcus haemolyticus	escarre	1	*c*	
		Staphylococcus hominis	hémoculture endocardite MR	1	*c*	
		Staphylococcus lugdunensis	os pied	1	*c*	
		Staphylococcus pasteuri	hémoculture périphérique MS	1	*c*	
		Staphylococcus pseudintermedius	KT artériel MS	1	*c*	
		Staphylococcus saprophyticus	arthrite	1	*c*	
		Staphylococcus schleiferi	plaie sternum	1	*c*	
		Staphylococcus warneri	os fémur	2	*a, c*	
	Bacillaceae	*Bacillus cereus*		1	*c*	TSYE/37°C/aérobiose
	Lactobacillaceae	*Lactobacillus acidophilus*		1	a	MRS/37°C/anaérobiose
		Lactobacillus casei subsp. casei		1	a	
		Lactobacillus curvatus		1	a	
		Lactobacillus delbrueckii		1	a	
		Lactobacillus fermentum		2	a	
		Lactobacillus helveticus		6	a	
		Lactobacillus plantarum		8	a	
		Lactobacillus rhamnosus		1	a	
		Lactobacillus sakei subsp. sakei		1	a	
	Enterococcaceae	*Enterococcus durans*		1	*c*	TSYE/37°C/aérobiose
		Enterococcus faecium	abcès pelvien	2	*a, c*	
		Enterococcus faecalis	cholecystite	2	*a, c*	
	Streptococcaceae	*Lactococcus lactis*		14	*a*	M17/30°C/aérobiose
		Streptococcus agalactiae	hémoculture	1	*c*	M17/37°C/aérobiose
		Streptococcus pyogenes		1	a	
		Streptococcus thermophilus		6	*a*	
	Leuconostocaceae	*Leuconostoc mesenteroides*		1	a	M17/30°C/aérobiose

2.1.3.2 Milieux et conditions de culture

Les souches de propionibactéries laitières ont été cultivées dans le bouillon YEL (*Yeast Extract Lactate*) composé de 1 % de tryptone (Biokar, Pantin, France), 1 % d'extrait de levure (Biokar), de 2,1 % de sirop de lactate de sodium (60 %, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), de 0,3 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4 et de 0,06 $g.L^{-1}$ de $MnSO_4$ (Hettinga et al., 1968). Les propionibactéries laitières ont été incubées en anaérobiose à 30 °C en jarres, en utilisant les sachets AnaeroGen (Oxoid), sauf *P. cyclohexanicum* qui est incubé à 37 °C. Les propionibactéries cutanées ont été cultivées en YEL et incubées en anaérobiose à 37 °C. Les autres souches ont été cultivées sur les différents milieux appropriés à la croissance des bactéries considérées, selon les conditions décrites dans le tableau 2.1.3 - 2. Les souches cibles ont été cultivées 24 h en bouillon avant la réalisation des tests. La préparation des milieux a été réalisée selon les recommandations des fabricants. Les milieux gélosés ont été obtenus après l'ajout de 1,2 % d'agar (ou 0,8 % d'agar pour l'obtention des géloses molles). Toutes les souches ont été stockées à -80 °C dans un milieu approprié avec 20 % de glycérol jusqu'à l'utilisation.

2.1.3.3 Tests d'inhibitions par la méthode de contact (double couche d'agar)

Les souches des propionibactéries ont été inoculées en spot sur la surface de milieux gélosés YEL à 1,2 % d'agar en utilisant le robot Freedom EVO® (Tecan). Les géloses ont été incubées en conditions appropriées pendant 5 jours pour les dPAB et pendant 7 jours pour les cPAB. Les milieux gélosés ont ensuite été recouverts de 10 mL de milieu gélosé à faible teneur en agar (gélose molle à 0,8 % d'agar) contenant un volume approprié de suspension de souche cible, qui a été cultivée auparavant pendant 24h dans des conditions adaptées. Le volume ajouté a été calculé de façon à ce que la densité optique finale de la suspension, mesurée à 600 nm, soit de 0,01. Le milieu utilisé pour la fabrication de la gélose molle et les conditions d'incubation de la double couche d'agar été adaptés à la souche cible. Après incubation en conditions appropriées, les diamètres des zones d'inhibition de croissance de la souche cible autour des colonies des propionibactéries ont été mesurées en millimètres. Les diamètres inférieurs à 2 mm ont été considérés comme nuls. Les tests ont été réalisés en triplicat et les valeurs rapportées représentent la moyenne des trois mesures.

2.1.3.4 Analyse statistique des résultats des criblages d'antagonismes

Les souches expéditrices ont été divisées en deux classes : souches laitières et souches cutanées. Une deuxième analyse a été effectuée en divisant les souches expéditrices en trois classes : *Cutibacterium* sp., *Propionibacterium* sp., et *Acidipropionibacterium* sp. Toutes les combinaisons

souches expéditrices / souches cibles ont ensuite été analysées en prenant en compte les diamètres d'inhibition. Des tests statistiques ont été réalisés afin d'évaluer s'il existait une différence significative de diamètres d'inhibitions entre les différentes classes étudiées (test d'Anova) et afin d'évaluer si le pourcentage d'inhibition est différent entre les différentes classes étudiées (test du Khi-2 ou test exact de Fisher). Lorsqu'une comparaison globale était significative, des tests 2 à 2 ont été réalisés afin de déterminer où se situait la différence. Un ajustement de Bonferroni a été réalisé, compte tenu de la multiplicité des tests. Par conséquent, dans les tests 2 à 2, le seuil de significativité est abaissé à 0,05 divisé par le nombre de croisements effectués. Les analyses ont été réalisées par Mme Amandine Luc, biostatisticienne de la Plateforme d'Aide à la Recherche clinique du CHRU de Nancy.

2.1.3.5 Détection bio-informatique des gènes candidats codant des antimicrobiens putatifs dans les génomes de propionibactéries

Les génomes complets et bruts (contigs et scaffolds) de 129 souches de propionibactéries cutanées (115 *Cutibacterium* sp. et 14 non classifiées) et de 46 souches de propionibactéries laitières (36 *Propionibacterium* sp., 8 *Acidipropionibacterium* sp., 2 *Pseudopropionibacterium* sp.) ont été collectés de la base publique des génomes NCBI (jusqu'en décembre 2017) et enregistrées sous format FASTA. Les génomes ont été intégrés dans la plateforme d'analyses génomiques MicroScope (Vallenet et al., 2017) pour effectuer une annotation automatique et experte de gènes. L'annotation a de plus été affinée par une analyse avec BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) et par la recherche de domaines conservés (*Conserved Domain search tool*) du NCBI.

Le logiciel antiSMASH (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*) avec les paramétrages par défaut (Weber et al., 2015) a été utilisé afin d'identifier les clusters de gènes de métabolites spécialisés. Les précurseurs de RiPPs ont été identifiés en combinant les analyses avec antiSMASH et BAGEL3 (van Heel et al., 2013). Les limites des clusters ont été réajustées manuellement en analysant la synthénie des séquences protéiques dans les clusters de gènes prédits automatiquement par antiSMASH.

2.1.4 Résultats

2.1.4.1 Cartographie des antagonismes des propionibactéries vis-à-vis des souches cibles

Le pouvoir antagoniste de 66 souches expéditrices de cPAB (*C. acnes*) et de 66 souches de dPAB (26 *Propionibacterium* sp. et 40 *Acidipropionibacterium* sp.) a été évalué vis-à-vis de 53 souches cibles

cliniques et de 59 souches cibles alimentaires. 14 784 interactions ont ainsi été cartographiées et analysées (Tableau 2.1.4 – 1).

2.1.4.1.1 Proportion d'interactions inhibitrices dans les différents groupes de propionibactéries cliniques ou alimentaires

Au total, pour les 132 souches expéditrices et 112 souches cibles, 305 (2,06 %) inhibitions ont été observées parmi les 14 784 combinaisons testées. Parmi les 7 392 interactions testées pour les propionibactéries cutanées, 208 (2,8 %) correspondaient à des inhibitions. Ce nombre était significativement plus élevé pour les propionibactéries alimentaires, qui présentaient 97 (1,3 %) inhibitions pour 7 392 tests réalisés (p<0,0001).

Des différences significatives d'interactions de compétition ont été observées (p<0,0001) (Tableau 2.1.4 - 2) selon la nature de la souche expéditrice et de la souche cible.

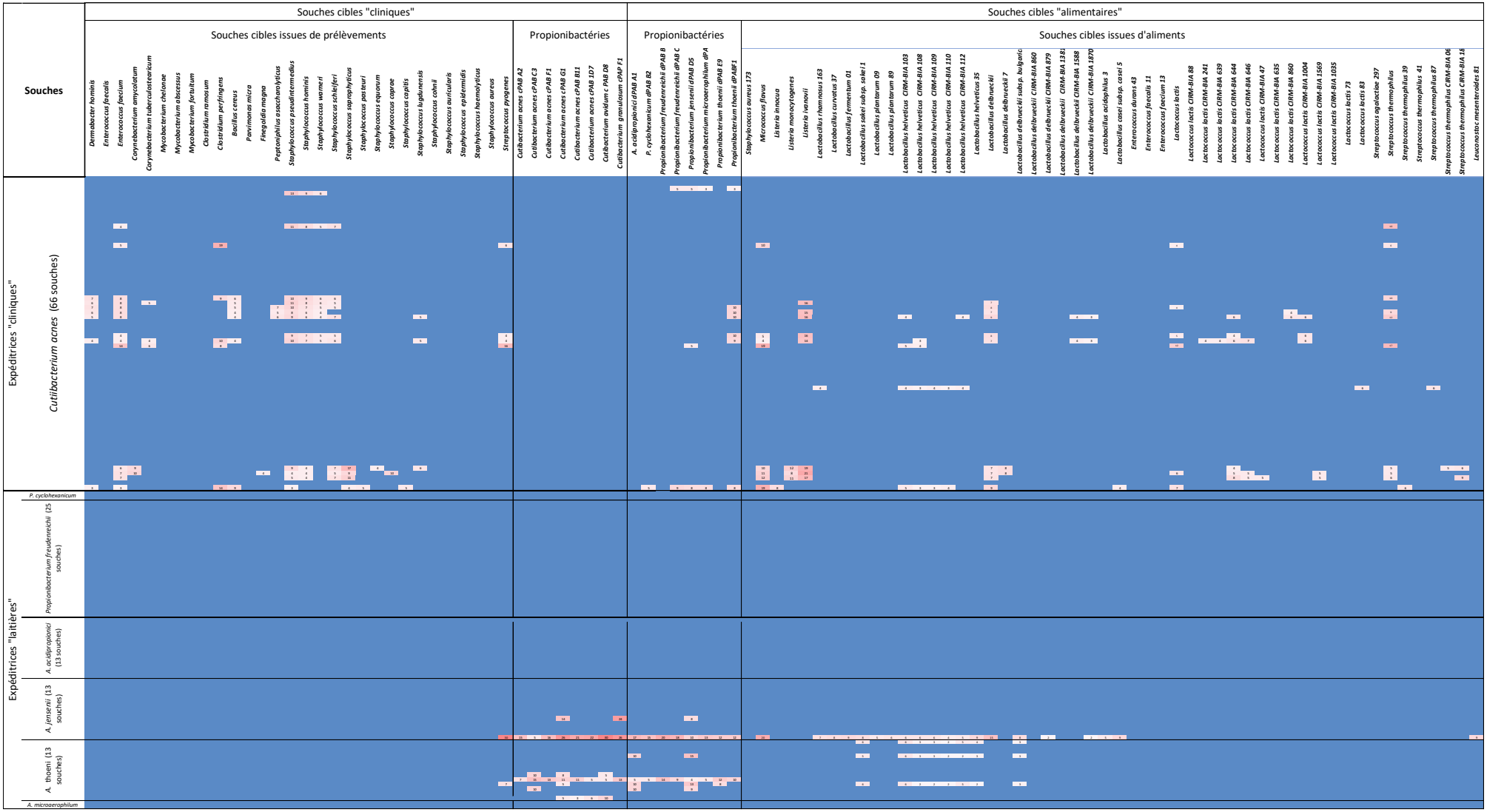
Tableau 2.1.4 – 2

Nombre d'inhibitions selon les combinaisons souches expéditrices/souches cibles d'origine clinique et alimentaire. Les différences significatives existent dans les tests 2 à 2 pour les combinaisons : a versus c; a versus d; b versus c ; b versus d et c versus d.

Nature des combinaisons entre souches	Combinaisons souches expéditrices / souches cibles		
	Nombre de combinaisons testés	Nombre (%) d'inhibitions	P
Expéditrices cliniques – cibles cliniques (a)	3498	101 (2,9)	<0,0001
Expéditrices cliniques – cibles alimentaires (b)	3894	107(2,7)	
Expéditrices alimentaires – cibles cliniques (c)	3498	68 (1,9)	
Expéditrices alimentaires – cibles alimentaires (d)	3894	29 (0,7)	

En effet, la fréquence d'inhibition entre les souches cliniques (expéditrice clinique contre cible clinique, 2,9 % d'inhibitions) était plus élevée qu'entre les souches alimentaires (expéditrice alimentaire contre cible alimentaire, 0,7 % d'inhibitions). Les souches expéditrices cliniques inhibaient en proportion égale les souches cliniques ou alimentaires (2,9 % et 2,7 %, respectivement). Les souches expéditrices cliniques présentaient également plus d'inhibitions vis-à-vis de souches cibles alimentaires que les souches expéditrices alimentaires (2,7 % versus 0,7 %, respectivement). Les souches expéditrices alimentaires inhibaient moins fréquemment les souches cibles cliniques (1,9 % d'inhibitions) par rapport aux souches expéditrices cliniques (2,9 % d'inhibitions).

Tableau 2.1.4 – 1 Cartographie des activités inhibitrices des 66 souches de propionibactéries cliniques (*Cutibacterium acnes*) et des 66 souches de propionibactéries alimentaires (*Acidipropionibacterium* sp. et *Propionibacterium* sp.) vis-à-vis de souches cibles d'origine clinique (53) et alimentaire (59). Les souches expéditrices sont représentées en lignes, les souches cibles en colonnes. L'absence d'interaction est symbolisée par la couleur bleue. Les inhibitions sont représentées par les différentes intensités de couleur rosée/rouge, du plus faible au plus grand diamètre de zone d'inhibition (moyenne de trois mesures en mm).



2.1.4.1.1.1 Proportion de souches expéditrices à activité antagoniste dans les différents groupes de propionibactéries cliniques ou alimentaires

Parmi les 66 souches de cPAB, 17 (25,8 %) inhibaient au moins une souche cible. Au sein des 66 souches de dPAB, 9 (13,6 %) inhibaient au moins une cible (Tableau 2.1.4 – 3). La différence entre les proportions de souches inhibant au moins une souche cible selon leur origine clinique ou alimentaire était proche de la significativité statistique (p=0,0800).

Tableau 2.1.4 – 3

Proportions de souches inhibitrices parmi les propionibactéries d'origine clinique et alimentaire.

	Propionibactéries – 2 classes	
Au moins une souche cible inhibée	**Cliniques (n=66)**	**Alimentaires (n=66)**
Oui n(%)	17 (25,8)	9 (13,6)
Non n(%)	49 (74,2)	57 (86,4)

En analysant les proportions des propionibactéries divisées en trois classes, selon le genre bactérien, il y a une différence significative (p=0,0173) dans les proportions des souches inhibitrices. En effet, aucune des 26 souches de *Propionibacterium* sp., dont 25 souches de *P. freudenreichii*, ne présentait d'activité antagoniste. Au sein des *Acidipropionibacterium,* 9 des 40 souches (22,5 % présentaient une activité inhibitrice. Dix-sept des 66 souches de *C. acnes* (25,8 %) ont inhibé au moins une souche cible (Tableau 2.1.4 – 4).

Aucune souche d'*A. acidipropionici* présentait d'activité inhibitrice. Les *Acidipropionibacterium* sp. ayant une activité inhibitrice correspondaient à 2 souches d'*A. jensenii*, soit 15,5 % des souches testées, et 7 souches d'*A. thoenii*, soit 53,8 % des souches testées. Cette dernière espèce renferme 78 % (7 souches sur les 9) des souches de propionibactéries laitières ayant une activité inhibitrice. Ces résultats suggèrent qu'il existe une forte diversité de proportion de souches inhibitrices au sein des espèces d'*Acidipropionibacterium*.

Tableau 2.1.4 – 4

Proportions de souches inhibitrices parmi les différentes espèces de propionibactéries.

Espèces (nombre de souches)	*Cutibacterium acnes* (66)	*Acidipropionibacterium* (40)			*Propionibacterium freundenreichii* (25)
		A. acidipropionici (13)	*A. jensenii* (13)	*A. thoeni* (13)	
Nombre de souches expéditrices productrices (%)	17 (25,8)	9 (22,5)			0 (0)
		0 (0)	2 (15,4)	7 (53,8)	

2.1.4.1.2 Spectre d'activité des propionibactéries

2.1.4.1.2.1 Largeur des spectres d'activité inhibitrice dans les différents groupes de propionibactéries cliniques ou alimentaires

Soixante-quinze souches, sur les 112 testées, ont été inhibées par au moins 1 souche expéditrice. Aucune bactérie à Gram négatif n'a été inhibée par au moins une souche expéditrice. Aucune inhibition n'a été observée vis-à-vis des bactéries testées appartenant aux groupes *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* et à la famille des *Mycobacteriaceae* (Tableau 2.1.4 – 5).

La comparaison des espèces cibles inhibées par *Cutibacterium acnes* et les *Acidipropionibacterium - A. jensenii et A. thoenii* - indique que le spectre d'espèces inhibées est généralement plus large pour les souches expéditrices de *C. acnes* (Figure 2.1 - 1). Les souches de *C. acnes* inhibaient 3 à 21 cibles alors que la majorité des souches (35 %) inhibait entre 6 et 10 souches cibles. Les souches d'*Acidipropionibacterium* inhibaient 3 à 16 cibles alors que la majorité des souches (44 %) inhibait 1 à 5 souches cibles.

Tableau 2.1.4 – 5

Activité inhibitrice de 17 souches de propionibactéries cliniques (*Cutibacterium acnes*) et de 9 souches de propionibactéries alimentaires (*Acidipropionibacterium* sp.), classées selon leur origine, vis-à-vis des souches cibles d'origine clinique et alimentaire sensibles à au moins une souche expéditrice. Les souches expéditrices sont représentées en lignes, les souches cibles en colonnes. L'absence d'interaction est symbolisée par la couleur bleue. Les inhibitions sont représentées par les différentes intensités de couleur rosée/rouge, du plus faible au plus grand diamètre de zone d'inhibition, indiquée par la valeur du diamètre d'inhibition (moyenne de trois mesures en mm).

	Souches			Souches cibles "cliniques"																		
				Souches issues de prélèvements																		
				Dermabacter hominis	*Enterococcus faecium*	*Corynebacterium amycolatum*	*Corynebacterium tuberculostearicum*	*Clostridium perfringens*	*Bacillus cereus*	*Finegoldia magna*	*Peptoniphilus asaccharolyticus*	*Staphylococcus pseudintermedius*	*Staphylococcus hominis*	*Staphylococcus warneri*	*Staphylococcus schleiferi*	*Staphylococcus saprophyticus*	*Staphylococcus pasteuri*	*Staphylococcus equorum*	*Staphylococcus caprae*	*Staphylococcus capitis*	*Staphylococcus lugdunensis*	*Streptococcus pyogenes*
Expéditrices "cliniques"	*C. acnes* cPAB A9	Contaminants	Hémoculture																			
	C. acnes cPAB B10				4							11	8	5	7							
	C. acnes cPAB E12			5	8				4		6	9	6	4	7						5	
	C. acnes cPAB H8																					
	C. acnes cPAB 1D6			3	3			14	9			3				4	5			5		
	C. acnes cPAB E10		Prélèvement ostéo-articulaire	7	8				5		7	10	7	5	5							
	C. acnes cPAB F10				4							9	7	5	5							4
	C. acnes cPAB A10		Système nerveux central									13	9	6								
	C. acnes cPAB C12				7							5	4		7	11						
	C. acnes cPAB E11			6	8				4		5	8	6	4								
	C. acnes cPAB C11		Pus		7	10				4		4	4		5	9			10			
	C. acnes cPAB C10	Pathologies	Prélèvement ostéo-articulaire		6	9						9	4		7	17		4			6	
	C. acnes cPAB F12			4	4		4	10	4			10	7	5	6						5	4
	C. acnes cPAB E9			6	8		5		5			11	8	6	5							
	C. acnes cPAB G2				14		6	8														16
	C. acnes cPAB C8		Système nerveux central		5			19														6
	C. acnes cPAB E8		Pus	7	8			9	6			10	9	6	6							
Expéditrices "laitières"	*A. jensenii* dPAB E4	Lait cru	France 1994																			30
	A. jensenii dPAB D12	Frromages	Raclette lait cru																			
	A. thoenii dPAB E6		Emmental																			
	A. thoenii dPABF2		Appenzell																			
	A. thoenii dPAB E9		Gruyère																			
	A. thoenii dPABF3		Gruyére																			7
	A. thoenii dPABF4		Crème de Gruyére																			
	A. thoenii dPABF1	Environnement	Eau station lagunage Anjou																			
	A. thoenii dPABF6		Eau station lagunage Anjou																			

Souches	Souches cibles "cliniques"								Souches cibles "alimentaires"							
	Propionibactéries								Propionibactéries							
	Cutibacterium acnes cPAB A2	*Cutibacterium acnes cPAB C3*	*Cutibacterium acnes cPAB F1*	*Cutibacterium acnes cPAB G1*	*Cutibacterium acnes cPAB B11*	*Cutibacterium acnes cPAB 1D7*	*Cutibacterium avidum c PAB D8*	*Cutibacterium granulosum cPAP F1*	*Acidipropionibacterium acidipropionici dPAB A1*	*Propionibacterium cyclohexanicum dPAB B2*	*Propionibacterium freudenreichii dPAB B3*	*Propionibacterium freudenreichii dPAB C5*	*Acidipropionibacteriumjensenii dPAB D5*	*Acidipropionibacteriummicroaerophilum dPAB F5*	*Acidipropionibacterium thoenii dPAB E9*	*Acidipropionibacterium thoenii dPABF1*
C. acnes cPAB A9												5	5	3		3
C. acnes cPAB B10																
C. acnes cPAB E12																10
C. acnes cPAB H8																
C. acnes cPAB 1D6										5		9	8	8		8
C. acnes cPAB E10																10
C. acnes cPAB F10																10
C. acnes cPAB A10																
C. acnes cPAB C12																
C. acnes cPAB E11																10
C. acnes cPAB C11																
C. acnes cPAB C10																
C. acnes cPAB F12																9
C. acnes cPAB E9																
C. acnes cPAB G2													5			
C. acnes cPAB C8																
C. acnes cPAB E8																
A. jensenii dPAB E4	15	5	16	26	21	22	30	26	17	15	20	18	10	13	12	12
A. jensenii dPAB D12				14				24					8			
A. thoenii dPAB E6																
A. thoenii dPABF2	7	15	13	11	11	5	5	13	5	5	14	9	4	5	12	10
A. thoenii dPAB E9									10				15			
A. thoenii dPABF3				5					10				13		8	
A. thoenii dPABF4		10							10				9			
A. thoenii dPABF1		10		8			5									
A. thoenii dPABF6				5	3	6	10									

Souches	Souches cibles "alimentaires"																			
	Souches issues d'aliments																			
	Micrococcus flavus	*Listeria innocua*	*Listeria monocytogenes*	*Listeria ivanovii*	*Lactobacillus rhamnosus 163*	*Lactobacillus curvatus 37*	*Lactobacillus fermentum 01*	*Lactobacillus sakei subsp. sakei 1*	*Lactobacillus plantarum 09*	*Lactobacillus plantarum 89*	*Lactobacillus helveticus CIRM-BIA 103*	*Lactobacillus helveticus CIRM-BIA 108*	*Lactobacillus helveticus CIRM-BIA 109*	*Lactobacillus helveticus CIRM-BIA 110*	*Lactobacillus helveticus CIRM-BIA 112*	*Lactobacillus helveticus 35*	*Lactobacillus delbrueckii*	*Lactobacillus delbrueckii 7*	*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus 85*	*Lactobacillus delbrueckii CIRM-BIA 879*
C. acnes cPAB A9																				
C. acnes cPAB B10																				
C. acnes cPAB E12				16							4				4		9			
C. acnes cPAB H8					4						4	3	4	3	4					
C. acnes cPAB 1D6	19	8									5	3	3	4			9			
C. acnes cPAB E10																	8			
C. acnes cPAB F10	5			16													8			
C. acnes cPAB A10																				
C. acnes cPAB C12	12		11	17													7			
C. acnes cPAB E11				15													7			
C. acnes cPAB C11	11		8	21													7	8		
C. acnes cPAB C10	10		12	19													7	8		
C. acnes cPAB F12	4			14								3					7			
C. acnes cPAB E9				16													7			
C. acnes cPAB G2	19										5	4								
C. acnes cPAB C8	10																			
C. acnes cPAB E8																				
A. jensenii dPAB E4	20				7	8	9	8	5	6	6	6	6	4	5	9	15		8	2
A. jensenii dPAB D12																				
A. thoenii dPAB E6								6			6	3	3	2	5	4			3	
A. thoenii dPABF2																				
A. thoenii dPAB E9								5			6	3	3	2	2	3			3	
A. thoenii dPABF3								6			6	2	2	2	5	2			3	
A. thoenii dPABF4																				
A. thoenii dPABF1																				
A. thoenii dPABF6																				

Souches	*Lactobacillus delbrueckii CIRM-BIA 1588*	*Lactobacillus delbrueckii CIRM-BIA 1870*	*Lactobacillus acidophilus 3*	*Lactobacillus casei subsp. casei 5*	*Lactococcus lactis*	*Lactococcus lactis CIRM-BIA 241*	*Lactococcus lactis CIRM-BIA 639*	*Lactococcus lactis CIRM-BIA 644*	*Lactococcus lactis CIRM-BIA 646*	*Lactococcus lactis CIRM-BIA 47*	*Lactococcus lactis CIRM-BIA 860*	*Lactococcus lactis CIRM-BIA 1004*	*Lactococcus lactis CIRM-BIA 1569*	*Lactococcus lactis 83*	*Streptococcus thermophilus*	*Streptococcus thermophilus 39*	*Streptococcus thermophilus 87*	*Streptococcus thermophilus CIRM-BIA 06*	*Streptococcus thermophilus CIRM-BIA 1860*	*Leuconostoc mesenteroides 81*
C. acnes cPAB A9																				
C. acnes cPAB B10															16					
C. acnes cPAB E12	4	3						6			6	6			12					
C. acnes cPAB H8														6			6			
C. acnes cPAB 1D6				4	7											6				
C. acnes cPAB E10					4															
C. acnes cPAB F10					5			4				6								
C. acnes cPAB A10																				
C. acnes cPAB C12								8	5	5			5		6				9	
C. acnes cPAB E11											4				9					
C. acnes cPAB C11					6			5	5				5		5					
C. acnes cPAB C10								4							5			5	6	
C. acnes cPAB F12	4	3				4	4	6	7			6								
C. acnes cPAB E9																				
C. acnes cPAB G2					12										17					
C. acnes cPAB C8					4										6					
C. acnes cPAB E8															10					
A. jensenii dPAB E4		2	5	9																9
A. jensenii dPAB D12																				
A. thoenii dPAB E6																				
A. thoenii dPABF2																				
A. thoenii dPAB E9																				
A. thoenii dPABF3																				
A. thoenii dPABF4																				
A. thoenii dPABF1																				
A. thoenii dPABF6																				

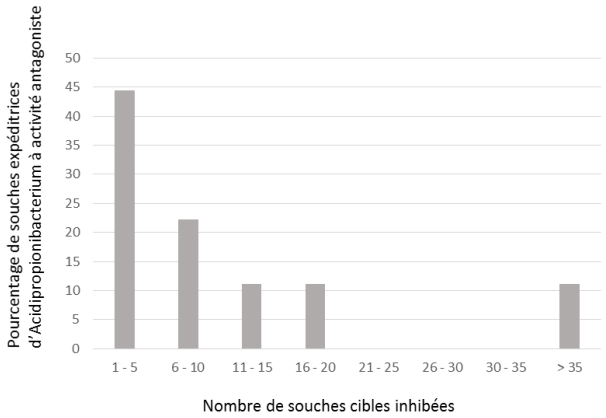


Figure 2.1.4 - 1

Etendue du spectre d'inhibition des souches expéditrices de *Cutibacterium* et d'*Acidipropionibacterium* présentant une activité inhibitrice

2.1.4.1.2.2 Spécificité des interactions de compétition dans les différents groupes de propionibactéries cliniques ou alimentaires

Au total, pour les 26 souches expéditrices à activité inhibitrice et les 75 souches cibles sensibles à au moins 1 souche expéditrice, 1 950 interactions ont été testées. 305 (15.6 %) interactions de compétition entre souches expéditrices productrices et souches sensibles ont été mises en évidence.

Les pourcentages d'interactions de compétition ont été différents selon la nature de la souche expéditrice et la nature de la souche cible. Ces interactions ont été plus importantes entre souches expéditrices cliniques / souches cibles issues de prélèvements cliniques, avec 31,3 % d'interactions. Elles ont aussi été plus fréquentes entre souches expéditrices laitières / propionibactéries, quelles soient d'origine clinique ou laitière, avec des pourcentages d'interactions inhibitrices de 37,5 et 33,3 %, respectivement (Tableau 2.1.4 - 6).

Tableau 2.1.4 – 6

Pourcentage d'interactions de compétition selon la nature de la souche expéditrice et de la souche cible

	Interactions de compétition : Nombre d'inhibitions /nombre de combinaisons testées (pourcentage)			
	Souches cibles « cliniques » sensibles		Souches cibles « alimentaires » sensibles	
Souches	Souches issues de prélèvements (n = 19)	Propionibactéries cutanées (n = 8)	Propionibactéries laitières (n= 8)	Souches issues de l'aliment (n= 40)
Expéditrices « cliniques » productrices (n = 17)	101/323 (**31,3**)	0/136 (**0**)	15/136 (**11,0**)	91/680 (**13,4**)
Expéditrices « laitières » productrices (n=9)	2/171 (**1,2**)	27/ 72 (**37,5**)	24/72 (**33,3**)	44/360 (**12,2**)

2.1.4.1.2.3 Spécificité des spectres d'activité inhibitrices dans les différents groupes de propionibactéries cliniques ou alimentaires

Les 17 souches de *C. acnes* n'ont pas eu d'effet sur *Cutibacterium* sp. mais ont eu un effet inhibiteur vis-à-vis des espèces laitières d'*Acidipropionibacterium* sp. et de *Propionibacterium* sp. Les 9 souches d'*Acidipropionibacterium* sp. ont eu une activité inhibitrice vis-à-vis des différentes souches de propionibactéries, quelle que soit leur origine, alimentaire ou clinique Tableaux 2.1.4 – 5 et 2.1.4 - 7).

Les propionibactéries cliniques inhibaient la croissance de plusieurs espèces cibles, quelle que soit leur origine, clinique ou alimentaire, des genres *Corynebacterium, Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* et *Listeria*, et du groupe des cocci Gram+ anaérobies (Tableaux 2.1.4 – 5 et 2.1.4 - 7). Plus de la moitié des souches de *C. acnes* ont eu un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques des espèces *Lactococcus lactis*, *S. thermophillus*, et sur les lactobacilles appartenant aux espèces *L. helveticus* et *L. delbrueckii.*

Les propionibactéries laitières n'ont quasiment pas eu d'interactions de compétition avec les souches cibles issues de prélèvements cliniques, hormis les deux interactions avec *S. pyogenes*. Les proponibactéries laitières exercaient un effet inhibiteur uniquement vis-à-vis de l'ensemble des espèces de *Lactobacillus* testées.

Il est à noter qu'une souche d'*A. jensenii,* dPAB E4, a inhibé 37 souches cibles.

Des similitudes de spectre d'activité ont été observées entre les souches *A. thoeni* dPAB F1 et dPAB F6, qui sont issues du même environnement (eau de station de lagunage d'Anjou). Cette observation a pu également être faite pour les deux souches isolées de gruyère, *A. thoeni* dPAB F2 et dPABF3.

Tableau 2.1.4 – 7

Nombre de souches cibles inhibées par au moins une souche de *Cutibacterium* sp. ou d'*Acidipropionibacterium* sp. et nombre de souches expéditrices à activités inhibitrices vis-à-vis d'au moins une souche cible

Souches cibles testées (nombre)	**Nombre de souches cibles inhibées par**		**Nombre de souches à activité inhibitrice de**	
	***Cutibacterium* (n=17)**	***Acidipropioni-bacterium* (n=9)**	***Cutibacterium* (n= 17)**	***Acidipropioni-bacterium* (n= 9)**
Propionibactérie				
Cutibacterium sp. (8)	0	**8**	0	**7**
Acidipopionibacterium sp. (5)	**3**	**5**	**8**	**6**
Propionibacterium sp. (3)	**2**	**3**	**2**	**2**
Cibles cliniques				
Corynébactéries (2)	**2**	0	**5**	0
Streptococcus sp. (2)	**1**	**1**	**4**	**2**
Enterococcus sp. (3)	**1**	0	**14**	0
Staphylococcus sp. (15)	**10**	0	**13**	0
Cocci Gram + anaérobies (3)	**3**	0	**11**	0
Clostridium sp. (2)	**1**	0	**5**	0
Cibles alimentaires				
Lactobacillus sp. (21)	**10**	**18**	**12**	**4**
S. thermophilus (7)	**5**	0	**11**	0
Lactococcus sp. (14)	**10**	0	**12**	0
Listeria sp. (3)	**3**	0	**9**	0

2.1.4.1.3 Relation entre statut-nature des souches et activité inhibitrice

Nous avons vu dans le chapitre 1.2.2 que certaines souches de *C. acnes* présentaient plus de caractères de virulence et pouvaient être responsable d'infections. Des critères bactériologiques existent pour juger si les souches de *C. acnes* isolées dans les prélèvements cliniques doivent être considérées comme de vrais pathogènes, ou si elles sont de simples contaminants retrouvés dans les prélèvements de manière fortuite. Ces critères comprennent le nombre de prélèvements positifs par rapport à l'ensemble des prélèvements effectués, le délai de positivité des cultures et le contexte clinique du patient. Sur la base de ces critères, les souches de *C. acnes* se répartissent de la façon suivante : 23 souches pathogènes et 43 souches contaminantes.

Nous avons voulu évaluer s'il existait une différence significative entre le nombre de souches de *C. acnes* inhibitrices selon leur statut de vrai pathogène ou de contaminant. Pour 23 souches testées considérées comme pathogènes, 6 (26,1 %) présentaient des activités inhibitrices. Parmi les 43 souches considérées comme contaminants, 11 (25,6 %) étaient antagonistes. Il n'y avait donc pas de différence significative entre ces deux groupes (p=0,9643).

Il existe plusieurs phylogroupes de *C. acnes* (cf. chapitre 1.2.2) qui sont préférentiellement isolées dans certains prélèvements cliniques (liquide cérébro-spinal, prélèvements ostéo-articulaires etc.) et qui, de ce fait, pourraient présenter un potentiel pathogène différent. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative (p=0,7082) entre les proportions de souches inhibitrices parmi les souches de C. *acnes* isolées d'hémocultures, de prélèvements ostéo-articulaires, de pus ou du système nerveux central (Tableau 2.1.4 – 8).

Tableau 2.1.4 – 8

Nombre de souches de *C. acnes* inhibant au moins une cible selon l'origine clinique de l'expéditrice (*C. acnes* isolé d'hémocultures – HEMO, de prélèvements ostéo-articulaires – OA, de pus – PUS et du système nerveux central – SNC).

	Total N= 66			HEMO N=18 (27,3%)			OA N=22 (33,3%)			PUS N=14 (21,2%)			SNC N=12 (18,2%)			
	N	%/moy	ET*	N	%/moy	ET*	N	%/moy	ET*	N	%/moy	ET*	N	%/moy	ET*	p**
Nb de souches cibles inhibées																0,9468
0	49	74,2		13	72,2		16	72,7		12	85,7		8	66,7		
[1-5]	2	3,0		1	5,6		0	0,0		0	0,0		1	8,3		
[6-10]	6	9,1		2	11,1		2	9,1		1	7,1		1	8,3		
>10	9	13,6		2	11,1		4	18,2		1	7,1		2	16,7		
Au moins une souche cible inhibée																0,7082
Non	49	74,2		13	72,2		16	72,7		12	85,7		8	66,7		
Oui	17	25,8		5	27,8		6	27,3		2	14,3		4	33,3		

Relation entre nature des souches de propionibactéries laitières et activité antagoniste

Les propionibactéries laitières analysées sont issues de fromage (40 %), de lait cru (13 %) ou de l'environnement (22 %). Les souches possédant une activité inhibitrice appartiennent exclusivement au genre *Acidipropionibacterium* et aux deux espèces A. *jensenii* et A. *thoenii*, et sont issues de fromage (6/8, soit 75 % de souches testées).

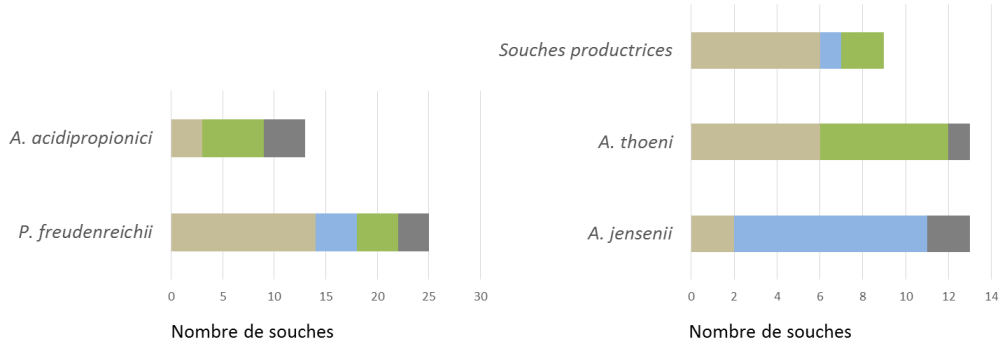


Figure 2.1.4 - 2

Habitats des différentes souches de propionibactéries « laitières » et des 9 souches productrices d'activité inhibitrices (Beige, fromage ; bleu : lait cru ; vert, environnement ; gris, non déterminé ou autres origines).

2.1.4.2 Analyse des clusters de gènes des métabolites spécialisés dans les génomes des propionibactéries

Au total, 129 génomes de propionibactéries cutanées et 46 génomes de propionibactéries laitières ont été analysés en utilisant les logiciels antiSMASH et BAGEL.

Parmi les génomes des propionibactéries cutanées, 21 sont des génomes complets, 31 sous la forme de contigs et 77 sous la forme de scaffolds. Trois génomes ont une séquence supplémentaire,

correspondant le plus vraisemblablement à un plasmide. Ils ont une taille moyenne de 2,5 Mb, avec environ 60 % de bases GC. Vingt et un génomes de propionibactéries laitières sont des génomes complets, 24 sous la forme de scaffolds et 1 sous la forme de contigs. La taille moyenne des génomes est de 3,5 Mb pour *Acidipropionibacterium* sp. et de 2,5 Mb pour *Propionibacterium* sp. avec un pourcentage de GC d'environ 67 %. Un génome d'*A. acidipropionici* et un génome de *P. freudenreichii* ont une séquence supplémentaire vraisemblablement plasmidique (Annexe 1.2 – 1 à 1.2 – 6).

L'analyse a permis d'identifier 248 clusters de gènes codant potentiellement pour des métabolites spécialisés au sein des génomes de 120 souches de propionibactéries cutanées et 28 clusters dans les génomes de 11 souches de propionibactéries laitières.

Distribution des clusters de gènes entre propionibactéries cutanées et laitières

Le nombre de clusters identifiés au sein des propionibactéries cutanées varie d'un à six par génome, avec 86 (71,7 %) souches contenant deux clusters et 21 (17,5 %) contenant trois clusters. Parmi les propionibactéries laitières, seules quelques souches regroupent la majorité des clusters. Il est important de noter qu'aucun cluster de gènes codant potentiellement des métabolites spécialisés n'a été identifié dans les 34 génomes de *P. freudenreichii* analysés. Seuls 4 clusters codant potentiellement des terpènes et 5 clusters putatifs de bactériocines ont été détectés dans les 8 génomes d'*Acidipropionicum* sp. analysés. Dans les 11 génomes positifs de propionibactéries laitières, le nombre de clusters de gènes varie de 1 à 12 par génome, avec cinq souches contenant plus de trois clusters.

Nature des clusters identifiés chez les propionibactéries cutanées et laitières

Les clusters des métabolites spécialisés appartiennent majoritairement aux familles des NRPS (*non-ribosomal peptide synthases*) (93 clusters) et RiPPs (*ribosomally synthetized and post-tranlationally modified peptides*) (173 clusters). Six clusters de PKS (*polyketides synthases*) ainsi que 4 clusters de terpène/arylpolyène ont également été trouvés (Tableau 2.1.4 – 9 et Annexes 1.2 – 1 à 1.2 – 6).

Un même cluster de NRPS est présent dans 87 souches de propionibactéries cutanées. Au sein des propionibactéries laitières, chacune de deux souches de *P. propionicum* possèderait 2 clusters de NRPS et *P. acidifaciens* F0233 présenterait, lui aussi, 2 clusters de NRPS.

Les clusters de PKS sont présents uniquement dans les génomes de propionibactéries laitières, à savoir 3 clusters présents dans un génome de *P. acidifaciens* F0233 et 1 et 3 clusters de PKS respectivement présents dans deux génomes de *P. propionicum*.

Les clusters de terpènes sont absents de l'ensemble des génomes de propionibactéries analysés, hormis dans deux souches d'*A. acidipropionici,* qui possèdent chacune deux clusters de terpènes (Tableau 2.1.4 – 9).

Une grande variété de clusters de gènes de bactériocines est présente dans les différents génogroupes de propionibactéries cutanées. La majorité de souches de *Cutibacterium* sp. possède un cluster codant la synthèse d'une bactériocine de classe II (non modifiée). Certains sous-groupes de *C. acnes* possèdent aussi des clusters codant la synthèse d'un lanthipeptide de classe II, d'un LAP (*linear azole- or azoline-containing peptide*) ou d'un thiopeptide. *C. avidum* et les souches proches possèdent un cluster codant la synthèse d'un peptide cyclisé tête-queue (*head-to-tail circulized peptide*) (Tableau 2.1.4 - 9). Les propionibactéries laitières possèdent moins de clusters de bactériocines, retrouvées dans les génomes de quelques souches seulement. En effet, 5 de 6 souches d'*A. acidipropionici* possèdent le cluster codant la synthèse d'une bactériocine de classe III. Deux souches de *P. propionicum* hébergent un cluster de lanthipeptide de classe III. De plus, une des souches de *P. propionicum* présente un cluster codant la synthèse d'un LAP. Enfin, *P. acidifaciens* F0233 regroupe quatre clusters de bactériocines : thiopeptide, sactipeptide, lasso peptide et un peptide non classifié.

Tableau 2.1.4 – 9

Nombres de clusters potentiels de gènes de métabolites spécialisés identifié dans les génomes des propionibactéries cutanées et laitières. Chiffres noirs – nombres de clusters identifiés par anti-SMASH, chiffres rouges – nombres de clusters identifiés par BAGEL (PKS, polyketide synthases ; NRPS, non ribosomal peptide synthases ; RiPPs, ribosomally synthetized and post-tranlationally modified peptides ; LAP, Linear azole- or azoline-containing peptides).

Groupes			Propionibactéries cutanées					Propionibactéries laitières					
Genres			*Cutibacterium*					*Acidipropionibacterium*			*Propionibacterium*		
Espèces			*C. acnes*	*C. humerusii'*	*C. avidum*	*C. granulosum*	non classées	*A. acidipropionici*	*A. thoenii*	*A. jensenii*	*P. freudenreichii*	*P. acidifaciens*	*P. propionicum*
Nombre de génomes testés			94	4	14	3	14	6	1	1	34	2	2
Clusters de gènes identifiés	Megaenzymes	PKS										3	4
		NRPS	75	4			8					2	4
		Hybrides PKS/NRPS											
		Terpènes											
		Terpènes/Arylpolyène						4					

RIPPs	Lanthipeptide classe II	14 (14)				1					2
	LAP	20									1
	Thiopeptide	9				2				1	
	Lasso peptide									1	
	Head-to-tail cyclized peptide			2		5					
	Sactipeptide									1	
	Autres RiPP non classifiés									1	
	Classe II non modifié	91 (12)	4	1	3 (1)	9(2)					
	Classe III >10kDa						5				

2.1.4.2.1 Clusters de gènes de NRPS

Un seul cluster de gènes de NRPS a été prédit dans les 87 génomes de propionibactéries cutanées analysés (Figure 2.1.4 – 3). Le cluster serait absent de seulement 15 souches de *C. acnes* appartenant au complexe clonal 3 (clade IA1) et 2 souches du clade IC (singletons). De plus, deux souches de *Cutibacterium* sp. non classées ne possèdent pas de cluster de NRPS. Le cluster serait aussi absent des génomes de *C. avidum* et *C. granulosum* (Annexes 1.2 – 1 à 1.2 - 3).

Le cluster de gènes serait composé de 10 gènes, dont 3 coderaient les domaines du système NRPS, avec deux modules (AT et CAT) et un domaine thioestérase terminant la synthèse du peptide. La 4'-phosphopantéthényl transférase permet d'activer les domaines de thiolation en transférant le bras phosphopantéthényl du coenzyme-A vers le résidu sérine du domaine T. Le cluster contient aussi des gènes de modification du peptide, un gène de transport et un gène de régulation transcriptionnelle. Les monomères rentrant dans la composition de la région centrale (core) du produit putatif prédit par antiSMASH est présenté à droite de la Figure 2.1.4 – 3 et Annexe 1.2 - 7.

Figure 2.1.4 – 3

Cluster NRPS prédit dans les génomes de propionibactéries cutanées. Les domaines de NRPS sont identifiés par des lettres : A – domaine d'adénylation, T – domaine de thiolation (ou PCP), C – domaine de condensation, TE –

thioestérase. A droite, représentation de la composition de la région centrale (core) du produit putatif de NRPS prédit par antiSMASH. Les étoiles symbolisent des résidus inconnus, pouvant correspondre à des structures très variées (ex. acides gras ou acides aminés, organisés en structures cycliques ou branchées). Il est important de noter que le produit final peut être très différent du fragment prédit par la bio-informatique. Exemple de *Cutibacterium acnes* 266, NCBI Locus tag PAZ_c13.

Au total, six clusters de gènes de NRPS ont été prédits au sein de 46 génomes des propionibactéries laitières analysés. Ces clusters sont localisés au sein de génomes de quatre souches qui hébergent chacune 2 clusters.

Deux clusters complets de NRPS ont été prédits dans le génome de *P. acidifaciens* F0233 (Figure 2.1.4 – 4 et Annexe 1.2 - 8). Le premier cluster serait composé de 10 gènes, dont 2 coderaient des complexes NRPS : le premier présenterait un module CAcMTT (C=domaine de condensation ; A=domaine d'adénylation ; cMT=domaine méthyltransférase ; T=domaine de thiolation) et le deuxième deux modules CATCAT (C=domaine de condensation ; A=domaine d'adénylation ; T=domaine de thiolation). Deux autres gènes coderaient un domaine A (adénylation) et un domaine TE (thioestérase). Le cluster serait flanqué par des gènes de transposase, ce qui suggère qu'il pourrait être un élément génétique mobile. Le produit prédit par antiSMASH pourrait contenir une alanine en position ß et une cystéine en position γ. Le deuxième cluster contiendrait quatre gènes, dont deux coderaient des domaines NRPS. Le premier contient deux modules CATCAT et le deuxième un domaine C (de condensation) à la place d'une thioestérase, ce qui suggère que le produit pourrait être libéré de la synthase par une réaction de condensation, comme déjà rapporté auparavant (Keating et al., 2001).

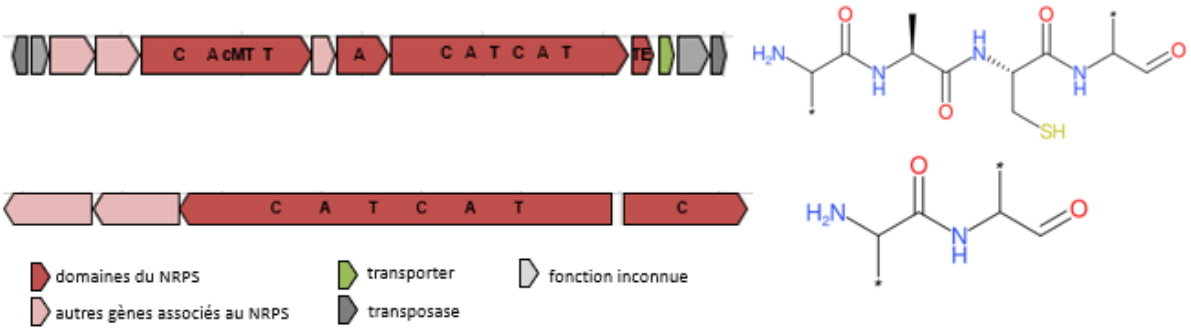


Figure 2.1.4 – 4

Clusters NRPS identifiés dans le génome de *P. acidifaciens* F0233. Les domaines de NRPS sont identifiés par des lettres : A – domaine d'adénylation, T – domaine de thiolation (ou PCP), C – domaine de condensation, cMT – méthyltranférase, TE – thioestérase. A droite, représentation des compositions des régions centrales (cores) des produits putatifs des NRPS prédits par antiSMASH. Les étoiles symbolisent des résidus inconnus, pouvant correspondre à des structures très variées (ex. acides gras ou acides aminés, organisés en structures cycliques

ou branchées). Il est important de noter que le produit final peut être très différent du fragment prédit par bio-informatique.

De plus quatre fragments de clusters ont été détectés à différentes localisation dans le génome de *P. acidifaciens* F0233. Ils contiendraient des domaines NRPS isolés, ne formant pas de modules complets (Annexe 1.2 - 9).

Dans chacun des deux génomes de *P. propionicum*, deux clusters de gènes de NRPS identiques ont été prédits (Figure 2.1.4 – 5 et Annexe 1.2 - 10). Le premier cluster comprend 30 gènes, dont 10 coderaient des protéines présentant des domaines de NRPS. Un gène coderait une protéine présentant deux modules CAT, les autres gènes coderaient des protéines présentant un à deux domaines. Le cluster coderait aussi des enzymes associées, pouvant jouer un rôle dans les modifications du produit final. Plusieurs gènes de transporteurs et deux gènes de régulation d'expression des gènes seraient aussi présents. La partie centrale (core) du produit final prédit par antiSMASH contiendrait les molécules suivantes : dihydrobenzoate (ou salicylate), alanine, valine, cystéine et d'autres acides aminés indéterminés. Le deuxième cluster de *P. propionicum* serait composé de 21 gènes, dont trois contiendraient chacun un domaine NRPS. Le cluster comporterait également des gènes codant des transporteurs, des gènes de modification et un régulateur transcriptionnel.

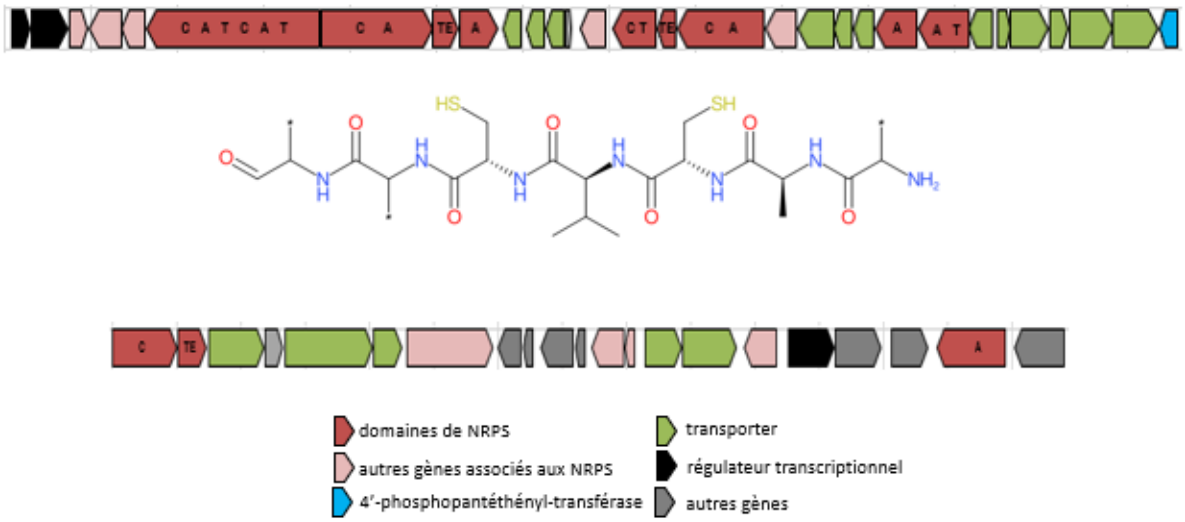


Figure 2.1.4 – 5

Clusters NRPS identifiés dans les génomes de *P. propionicum*. Les domaines de NRPS sont identifiés par des lettres : A – domaine d'adénylation, T – domaine de thiolation (ou PCP), C – domaine de condensation, TE – thioestérase. Au milieu, représentation de la composition de la région centrale (core) du produit putatif de NRPS prédit par antiSMASH. Les étoiles symbolisent des résidus inconnus, pouvant correspondre à des structures très variées (ex. acides gras ou acides aminés, organisés en structures cycliques ou branchées). Il est important de noter que le produit final peut être très différent du fragment prédit par bio-informatique.

Il est important de noter que les clusters de gènes retrouvés chez les propionibactéries n'ont pas d'homologue parmi les clusters connus, ce qui indique qu'ils pourraient produire des composés originaux.

2.1.4.2.2 Clusters de gènes des PKS

Les génomes de *Cutibacterium* analysés ne contiendraient pas de clusters de PKS.

Des clusters de PKS ont été détectés uniquement dans les génomes des propionibactéries laitières. Comme dans le cas des clusters des NRPS, les sept clusters des PKS sont retrouvés chez une souche de *P. acidifaciens* F0233 (3 clusters) et deux souches de *P. propionicum,* F0230a et NBRC 14587, qui contiendraient 1 cluster et 3 clusters, respectivement (Annexes 1.2 – 11).

Clusters de PKS de *P. acidifaciens* F0233

Dans le génome de *P. acidifaciens* F0233, trois clusters de gènes de PKS sont retrouvés (Figure 2.1.4 - 6). Ces trois clusters sont dépourvus de domaine AT (acyl-tansférase), et pourraient donc correspondre à des PKS de type II. Dans ce cas, les domaines AT sont en général localisés dans une autre partie du génome et fonctionnent en trans-.

Le premier cluster est composé de 7 gènes, dont trois domaines PKS, deux cétosynthases et une déshydratase, associés à des gènes de transport. Il est en revanche dépourvu de domaine de thiolation. Onze pourcents de gènes de ce cluster partagent des similarités avec les clusters de la nystatine (MIBiG BGC0000115 et BGC0000116).

Le deuxième cluster est composé de 25 gènes avec 8 domaines de PKS. Le cluster se termine avec un gène codant un domaine cyclase, qui pourrait participer à un mécanisme inhabituel de libération du produit. Plusieurs gènes associés pourraient être impliqués dans les modifications du produit. Des gènes de ce cluster partagent 27 % de similarité avec le cluster de résistomycine produite par *Streptomyces resistomycificus* (MiBIG BGC0000264). Il s'agit d'un polycétide de type II cyclique qui présente une activité antibactérienne en ciblant des polymérases d'ARN et d'ADN (Jakobi and Hertweck, 2004).

Le troisième cluster, composé de 18 gènes, comporte cinq domaines de PKS, entourés par des gènes des transposases. Des gènes de transporteurs, de régulation transcriptionnelle et des enzymes de modification, ainsi qu'un gène de 4'PPT y sont associés.

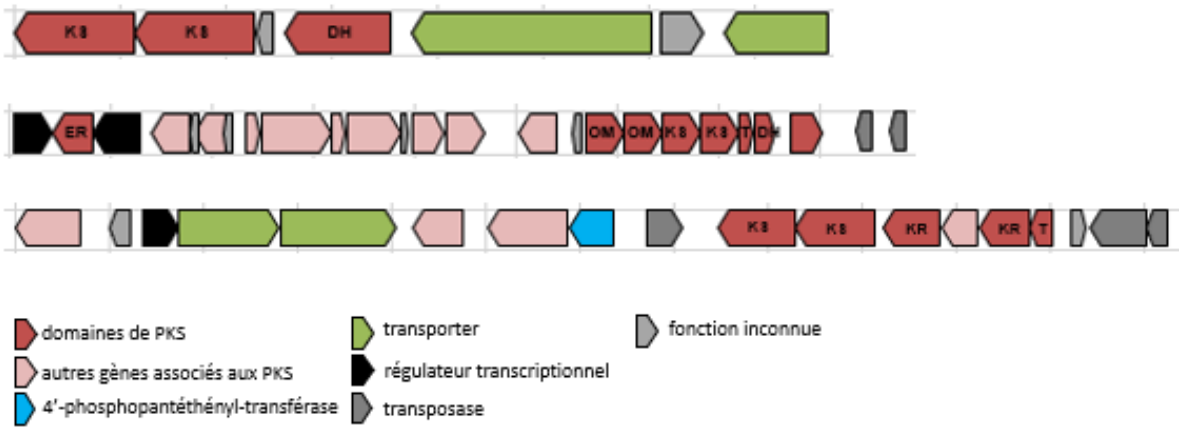


Figure 2.1.4 – 6

Clusters de gènes de PKS identifiés dans le génome de *P. acidifaciens* F0233. Les régions codant les domaines de PKS sont identifiées par des lettres : KS - cétosynthase, T – domaine de thiolation (ou ACP), KR–cétoréductase, ER – enoylréductase, OM – O-méthyltransférase, DH – deshydratase.

Clusters de PKS de *P. propionicum*

Un cluster de PKS a été détecté dans le génome de *P. propionicum* F0230a et trois clusters dans le génome de *P. propionicum* NBRC 14587. Il s'agirait de PKS de type I, fonctionnant avec des domaines trans-AT. Les modules de PKS dans ces clusters possèdent des domaines d'arrimage d'acyles (ATd – AT *docking*). Ils interagissent avec des domaines AT situés dans une autre partie du génome et participent au chargement des résidus fournis par ces domaines vers des domaines de thiolation.

Le cluster de *P. propionicum* F0230a est grand, mesure plus de 80 kb, et contient 28 gènes, dont 15 correspondraient à des domaines de PKS (Figure 2.1.4 – 7A). Ce cluster présente 44 % de similarité avec le cluster de synthase d'acide bongkrek (MIBiG BGC0000173) de *Burkholderia gladioli*. Il s'agit d'une toxine respiratoire létale, qui agit en inhibant le translocateur mitochondrial des nucléotides d'adénine. Cette toxine a parfois été à l'origine d'intoxications graves après la consommation d'un plat traditionnel d'Asie du Sud-est contaminé par *B. gladioli.* Le mécanisme d'action de cette toxine pourrait cependant être intéressant du point de vue thérapeutique comme agent cytotoxique, car le blocage mitochondrial induit à terme une apoptose cellulaire.

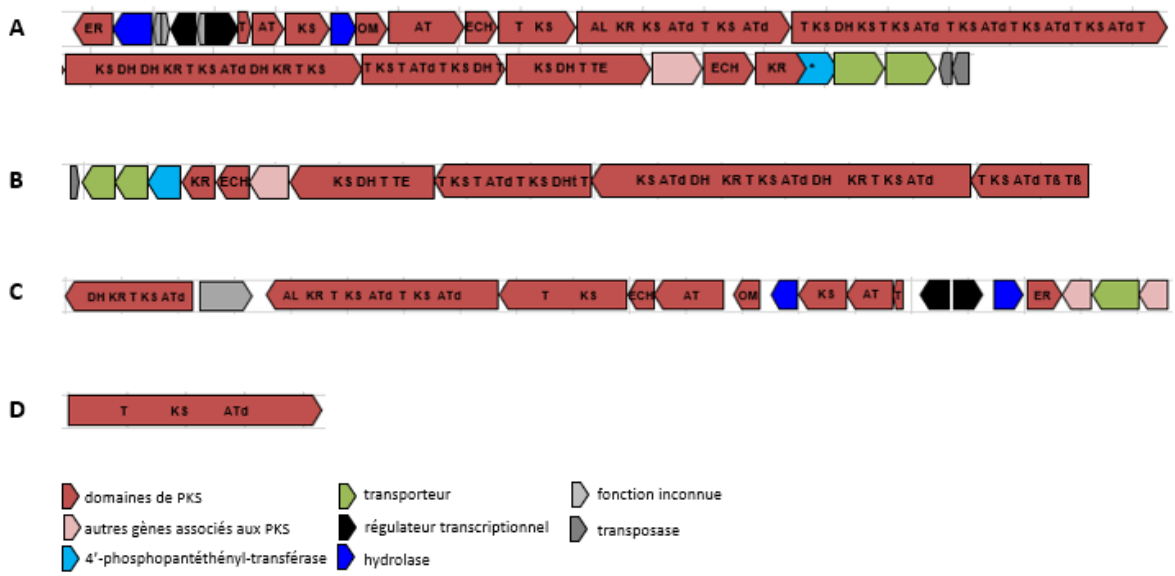


Figure 2.1.4 – 7

Clusters PKS identifiés dans le génome de *P. propionicum* F0230a (A) et *P. propionicum* NBRC 14587 (B, C, D). Les domaines de PKS sont identifiés par des lettres : KS - cétosynthase, T – domaine de thiolation (ou ACP), KR– cétoréductase, ER – enoylréductase, OM – O-méthyltransférase, DH – déshydratase.

Le premier cluster de *P. propionicum* NBRC 14587 comporte 11 gènes, dont 4 codant potentiellement de larges modules de PKS suivis de deux domaines PKS, de 4'PPT et des gènes codant des protéines de transport (Figure 2.1.4 – 7B). Il partage 11 % de similarité avec le cluster de gènes de la difficidine décrite pour la première fois chez *Bacillus subtilis* (MIBiG BGC0000176_c1). C'est une molécule macrocyclique polyinsaturée qui exprime une activité bactéricide en provoquant les changements dans la paroi cellulaire (Wu et al., 2015).

Le deuxième cluster est composé de 18 gènes, dont 10 avec des domaines de PKS (Figure 2.1.4 – 7C). Des gènes de régulation transcriptionnelle, de transport et de modification sont aussi présents. Ce cluster partage 26 % de similarité avec le cluster de synthèse de thailandamide de *Burkholderia thailandensis* (MIBiG BGC0000186.1).

La dernière structure découverte chez *P. propionicum* NBRC 14587 correspond à un gène codant un seul module de PKS. Il pourrait s'agir d'un fragment de cluster qui a été divisé entre deux contigs (Figure 2.1.4 – 7D).

2.1.4.2.3 Clusters de gènes des bactériocines

Au sein des propionibactéries cutanées, 161 clusters de gènes de RiPPs, correspondant à 15 clusters de lanthipeptides de classe II, 20 clusters de LAPs (linear azole-containing peptides), 11 clusters de thiopeptides, 7 clusters de peptides cyclisés tête-queue (*head-to-tail cyclized peptide*) et 108 clusters de bactériocine non modifiée lactococcine 972-like, ont été identifiés. Il faut noter que les clusters de LAPs ont été identifiés uniquement avec BAGEL, les clusters de thiopeptide uniquement avec antiSMASH. De plus, anti-SMASH a détecté 108 gènes de bactériocine non modifiée, alors que BAGEL n'en a identifié que 15 (Tableau 2.1.4 – 9 et Annexes 1.2 -1 à 1.2 - 6). Plusieurs îlots génétiques codant des clusters de gènes putatifs des bactériocines ont été décrits chez *C. acnes*. Cependant une annotation plus détaillée de leur contenu n'a pas été effectuée (Scholz, Bruggemann et al. 2016). Les clusters de bactériocines sont répartis de manière variable dans différents phylogroupes de *C. acnes* (Annexes 1.2 -1 à 1.2 – 3) avec l'indication des îlots/indels d'après les données de Scholz et Bruggemann, 2016.

Au sein des propionibactéries laitières, cinq souches d'*A. acidipropionici* présenteraient un gène codant une bactériocine de classe III (>10 kDa), de type lincocine M-18. Une souche de *P. acidifaciens* contiendrait quatre clusters de gènes de bactériocines (thiopeptide, lasso peptide, sactipeptide et une bactériocine putative non classifiée). Deux souches de *P. propionicum* contiendraient des gènes codant un lanthipeptide de classe III. De plus, *P. propionicum* F0230 coderait un peptide de type LAP (Annexes 1.2 – 4 à 1.2 – 6).

<u>Cluster de bactériocine non modifiée</u>

Le cluster prépondérant chez *C. acnes* est un cluster de bactériocine non modifiée de classe II proche de la lactococcine 972 (classe IId) (PF09683; TIGR01653), décrite chez *Lactococcus lactis* IPLA 927.

Le cluster est composé de sept gènes (Figure 2.1.4 – 8 et Annexe 1.2 - 13). Le gène codant le peptide précurseur, présentant 44 % de similarité avec la lactococcine 972, est suivi par trois gènes de fonction inconnue. Le cluster présenterait aussi un gène de perméase qui est souvent associé aux bactériocines de la famille de la lactococcine 972 et pourrait être impliqué dans l'immunité à la bactériocine. On retrouve aussi deux transporteurs de type ABC pouvant être impliqués dans la sécrétion de la bactériocine. Comme décrit précédemment, ce cluster est présent dans toutes les souches de *C. acnes* de phylogroupe I et absent chez les souches du clade III (Scholz, Bruggemann et al. 2016). Dans le groupe II, dans la région correspondante au cluster, plusieurs gènes sont absents, notamment le gène du peptide lactococcin-like (Annexe 1.2 - 13). En revanche, dans une autre région

du génome des souches du groupe II, un cluster contenant un gène de peptide avec 34 % de similarité avec la lactococcine 972 est retrouvé. Il est associé à un gène de perméase et à un transporteur de type ABC (Annexe 1.2 - 13). Les clusters de gènes de bactériocine lactococcin-like sont aussi retrouvés dans les génomes de '*C. humerusii*' et *C. granulosum*, ainsi que chez une souche de *C. avidum* (Annexe 1.2 - 13).

Figure 2.1.4 – 8

Composition du cluster de gène de bactériocine non modifiée lactococcin 972-like

Cluster de LAP

Le deuxième cluster avec une forte prévalence au sein de *C. acnes* est le cluster de gènes de peptides LAP (*linear azol(in)e-containing peptides*) (Figure 2.1.4 – 9 et Annexes 1.2 – 1 et 1.2 - 14). Il est retrouvé chez les souches de *C. acnes* appartenant uniquement au type C selon le schéma de single locus typing (Arnison, Bibb et al. 2013). Le point caractéristique des LAP est la présence de combinaisons de thiazole et d'hétérocycles de (méthyl)oxazole dérivés de cystéine, de sérine ou de thréonine. La première molécule décrite dans ce groupe était la streptolysine S, connue comme le facteur ß-hémolytique des streptocoques. Les clusters présents chez *C. acnes* hébergent deux gènes de peptides précurseurs qui partagent 54,4 % d'identité avec la streptolysine S. Les clusters contiennent aussi un domaine déshydrogénase de type SagB, une peptide maturase de type SagC et une cyclodéhydratase de type YcaO/SagD. Les trois protéines (SagBCD) sont indispensables à la synthèse des LAPs (Arnison, Bibb et al. 2013). Enfin, le cluster comporte deux gènes de protéases impliquées probablement dans l'immunité et deux gènes de transporteurs de type ABC, pouvant être impliqués dans la sécrétion de la bactériocine.

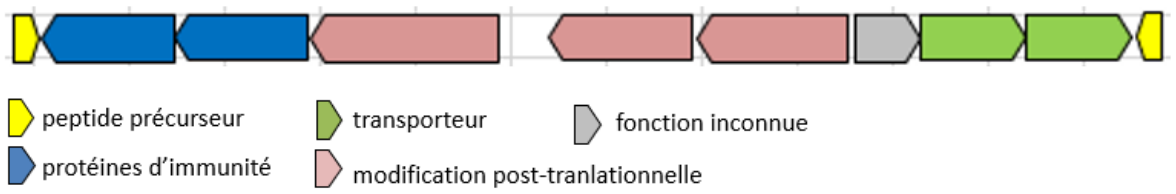


Figure 2.1.4 – 9

Composition du cluster de gènes de bactériocine de type LAP

Cluster de de lanthipeptide de classe II

Au sein de souches de *C. acnes*, un cluster de gènes de lanthipeptide de classe II a été détecté. Les lanthipeptides sont caractérisés par la présence d'acides aminés spécifiques, lanthionine (Lan), méthyllanthionine (MeLan) et/ou labionine (Lab). Les lanthipeptides qui présentent souvent une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif sont appelés lantibiotiques. Le cluster contient 11 gènes, dont un gène de peptide précurseur, un ou deux gènes de lanthipeptide synthases, cinq gènes de protéines de transport et un gène de régulation transcriptionnelle. Les synthases de lanthipeptide appartiennent à la classe d'enzymes bifonctionelles LanM qui contiennent un domaine déshydratasse N-terminal et un domaine cyclase C-terminal (Zhang et al., 2012). Le cluster est présent chez les souches de *C. acnes* de phylogroupe IC et chez les souches SLST-E, un sous-groupe de souches SLST-F et -A.

Un cluster identique est aussi présent chez une souche de *C. avidum*. Un cluster très similaire est retrouvé dans deux souches de *P. propionicum* (Figure 2.1.4 – 10 et Annexe 1.2 - 15).

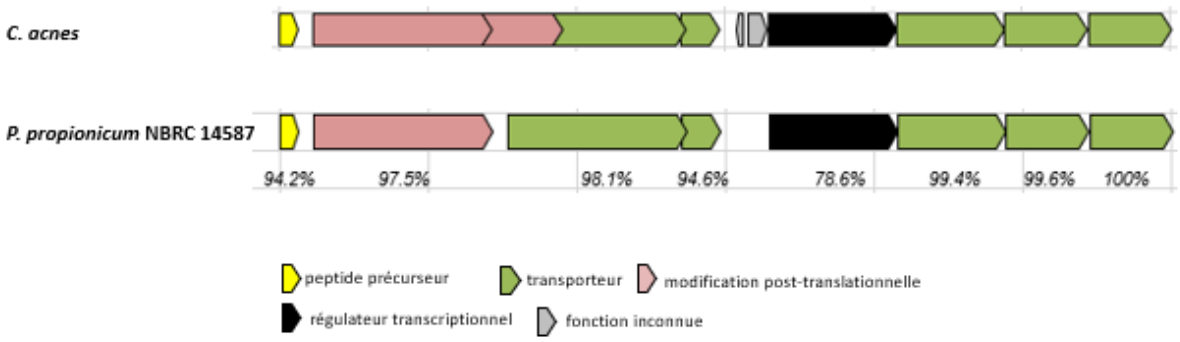


Figure2.1.4 – 10

Composition des clusters de gènes de lanthipeptide de type II dans le génome de *C. acnes* et de *P. propionicum* NRBC 14857. Les chiffres représentent les pourcentages de similarité de gènes.

Cluster de thiopeptides

Les thiopeptides (ou thiazolyl peptides) possèdent de nombreuses activités, notamment un puissant effet antibactérien vis-à-vis d'espèces à Gram positif (Arnison et al., 2013). Leur potentiel thérapeutique est cependant limité par leur faible hydrosolubilité. Ils constituent une des familles de RiPPs qui subissent le plus de modifications post-traductionnelles. En effet, au sein d'un cluster de gènes codant la synthèse d'un thiopeptide, sept gènes au minimum sont habituellement retrouvés (i) un gène codant un peptide précurseur, (ii) trois gènes codant l'appareil d'hétérocyclisation, (iii) deux gènes codant la machinerie de déshydratation de Sérine/Thréonine et (iv) un gène codant l'enzyme de cycloaddition. De plus, comme pour les autres bactériocines, les clusters peuvent comporter des gènes d'immunité, de transport et des modifications post-traductionnelles supplémentaires (Bennallack and Griffitts, 2017).

Dans les clusters identifiés chez *C. acnes*, les sept gènes sont retrouvés (Figure 2.1.4 – 11 et Annexe 1.2 - 16) : un à deux gènes codant un peptide précurseur, trois gènes d'hétérocyclisation (YcaO-like cyclodéshydratase, ThiF-like protéine qui permet la reconnaissance du substrat et une déshydrogénase dépendante de l'ATP, indiqués en rose clair), deux gènes impliqués dans la déshydratation de Ser/Thr (indiqués en bordeaux) et un gène de cycloaddition (indiqué en rose saumon). Ce cluster est présent chez *C. acnes* de phylogroupes IB et III.

Dans le génome de *P. acidifaciens* F0233, on note un peptide précurseur putatif. On retrouve deux gènes pouvant être impliqués dans l'hétérocyclisation (déshydrogénases de type SagD), deux gènes de déshydratation Ser/Thr et un gène de cycloaddition. Le cluster comporte aussi deux gènes de transporteur de type ABC, pouvant être impliqué dans l'export du thiopeptide.

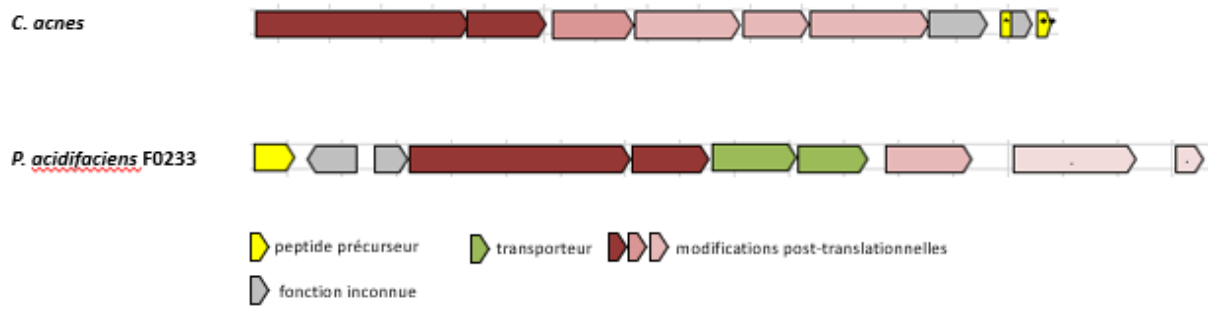


Figure 2.1.4 – 11

Composition des clusters de gènes codant des thiopeptides dans le génome de *C. acnes* et de *P. propionicum* FO233.

Cluster de peptide circulaire tête-queue (*head-to-tail circular peptide*)

Un cluster de gènes d'un peptide circulaire tête-queue (*head-to-tail circular peptide*) a été prédit dans deux génomes de *C. avidum* et cinq génomes de souches proches de *C. avidum*.

Ce type de peptides forme une boucle en établissant un lien entre les extrémités N et C-terminales. Le terme « circulaire » a été adopté pour ces peptides pour les différencier des peptides cycliques du groupe II, dont la synthèse suit des étapes enzymatiques très différentes (Maqueda et al., 2008). Plusieurs espèces de bactéries lactiques produisent des composés de la famille des peptides circulaires. Ce type de bactériocines présente une activité inhibitrice vis-à-vis de bactéries à Gram positif, notamment les espèces d'intérêt alimentaire. La structure circulaire donne des caractéristiques de résistance aux températures élevées, aux traitements chimiques et aux protéases (van Belkum et al., 2011).

Le cluster de *C. avidum* contient un gène de peptide précurseur, un gène putatif de modifications post-traductionnelles (alpha-beta hydrolase), un gène de transporteur de type ABC pouvant être impliqué dans l'export de la bactériocine. De plus, un gène putatif de régulation transcriptionnelle et un petit peptide avec un domaine PilT, qui pourrait être impliqué dans l'immunité, ont été prédits. De plus, on identifie plusieurs gènes codant des protéines qui présenteraient des domaines transmembranaires qui sont souvent retrouvés dans les clusters des peptides circulaires (Figure 2.1.4-12 et Annexe 1.2 - 17) (van Belkum et al., 2011).

Figure 2.1.4 – 12

Composition du cluster de gènes d'un peptide circulaire tête-queue

Cluster de lasso peptides

Une autre classe de RiPPs sont les lasso peptides qui ont une structure ressemblant à un lasso : un noyau macrolactame de sept à neuf acides aminés et une queue peptidique linéaire qui est repliée dans la boucle macrolactame. Cette conformation, grâce aux encombrements stériques, renforcée parfois par des ponts disulfures, rend les lasso peptides résistants à la température, aux traitements chimiques et aux protéases.

Un cluster de gènes de lasso peptide a été prédit dans le génome de *P. acidifaciens* F0233. Il contient 10 gènes dont des gènes typiques pour ce type de peptides. Un gène de peptide précurseur

putatif qui code un peptide de 41 acides aminés possède 49 % de similarités avec le peptide précurseur du lasso peptide streptomonomicine de *Streptomonospora alba.* Trois gènes codent des protéines impliquées dans des modifications post traductionnelles : (i) une transglutaminase qui joue le rôle de leader-peptidase, (ii) un peptide pourvu d'un domaine PqqD qui est un élément de reconnaissance du peptide précurseur permettant son arrimage aux enzymes modificatrices et (iii) une protéine homologue à la synthase d'asparagine qui agit comme une lactame synthase dépendante de l'ATP et assure la cyclisation du lasso peptide (Figure 2.1.4 – 13 et Annexe 1.2 - 18) (Hegemann et al., 2015). Des gènes de transport pouvant jouer un rôle dans l'immunité et dans l'export du peptide et des gènes de régulation transcriptionnelle sont également présents.

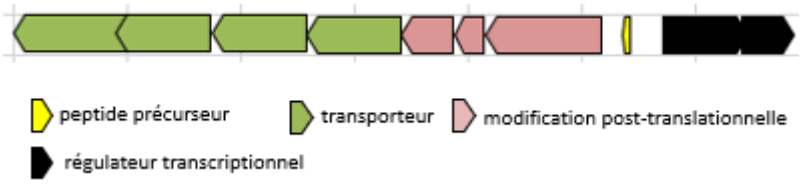


Figure 2.1.4 – 13

Composition d'un cluster de gènes d'un lasso peptide

Cluster de sactipeptide

Le génome de *P. acidifaciens* F0233 hébergerait également un cluster de gènes de sactipeptide. Le nom sactipeptide provient de leur structure qui contient une liaison entre un atome de sulfure et le carbone alpha de la chaîne peptidique (**s**ulfur to **a**lpha-**c**arbon). Le peptide précurseur du cluster présente 60 % de similarité avec le peptide subtilosine A produite par les souches de *Bacillus* sp. Le peptide précurseur est généralement modifié par une enzyme contenant le radical SAM (AlbA chez *Bacillus* sp.) qui génère des liaisons thioéther entre l'atome de soufre de la cystéine avec le carbone alpha de la thréonine. Chez *P. acidifaciens*, un gène codant une protéine similaire à AlbA (33 % d'identité) est retrouvé. D'autres gènes caractéristiques du cluster de la subtilosine (protéases clivant le peptide leader AlbE, AlbF), ne sont pas retrouvés dans le génome de *P. acidifaciens.* Cependant, un gène de protéine de transport similaire à AlbC (33 % d'identité), transporteur de type ABC impliqué dans l'export du peptide, et un gène de régulation transcriptionnelle sont présents (Figure 2.1.4 – 14 et Annexe 1.2 - 19).

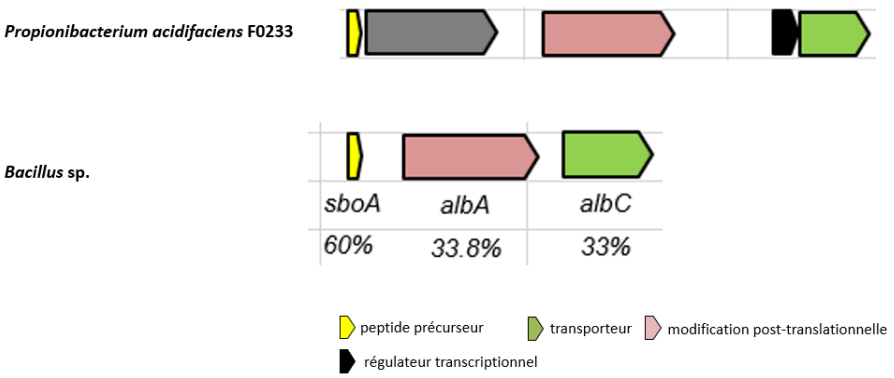


Figure 2.1.4 – 14

Composition du cluster de gènes d'un sactipeptide de *P. acidifaciens* F0233 et similarité (en italique) avec les gènes impliqués dans la synthèse d'un sactibiotique, subtilosine A, chez *Bacillus* sp.

Cluster de RIPPs de classe III

Un gène codant une protéine proche de la lincocine M18 (PF04454) a été identifiée dans 5 des 6 génomes d'*A. acidipropionici* analysés. Il coderait une protéine de 264 aa et présente 49 % d'identité avec le gène de la lincocine M18 de *Brevibacterium linens (*CAA63787.1), qui a été décrite comme ayant une activité antimicrobienne contre un large spectre de bactéries à Gram positifs, dont *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *S. aureus* (Valdés-Stauber and Scherer, 1994).

2.1.5 Conclusions

Des différences dans la proportion des comportements antagonistes chez les propionibactéries laitières et cutanées ont été montrées :

- Les pourcentages d'interactions de compétition seraient différents selon la nature de la souche expéditrice et la nature de la souche cible : Ces interactions sont de 31,3 % entre souches expéditrices cliniques / souches cibles issues de prélèvements cliniques. Pour les souches expéditrices laitières, ces interactions sont majoritairement avec des propionibactéries, quelles soient d'origine clinique (37,5 % d'interactions inhibitrices) ou laitière (33,3 % d'interactions inhibitrices).

- La proportion de propionibactéries présentant des activités inhibitrices serait significativement différente selon le type d'habitat et serait directement liée au genre bactérien considéré : 25,8 %

des souches de *Cutibacterium*, sur les 66 testées, et 22,5 % des souches d'*Acidipropionibacterium* sp., sur les 40 testées, inhibent au moins une souche cible. Les souches de *Propionibacterium freudenrenchii*, sur les 66 testées, ne présentent aucune activité inhibitrice, dans les conditions testées. Au sein du genre *Acidipropionibacterium*, deux espèces, *A. thoenii* et *A. jensenii,* sur les trois analysées, présentent des activités inhibitrices.

- Aucun cluster de gènes de métabolites spécialisés n'a été détecté dans les 34 génomes de *P. freudenreichii*, alors qu'ils sont présents dans la majorité des souches de *C. acnes* et dans quelques souches d'*Acidipropionibacterium* sp.

Il existerait des différences de spectre d'activités entre les souches de *Cutibacterium* et les souches d'*Acidipropionibacterium* testées :

- Le spectre de l'activité inhibitrice est plus large pour les souches de *Cutibacterium* sp. : la majorité des souches de *C. acnes* inhibe 6 à 10 souches cibles, alors que la majorité des souches d'*Acidipropionibacterium* sp. inhibent 1 à 5 cibles.

- L'activité inhibitrice est non spécifique pour les souches de *C. acnes* et spécifique pour les souches d'*Acidipropionibacterium* sp. Les *Cutibacterium* inhibent un large panel de souches cliniques et alimentaires, hormis les souches cibles de *Cutibacterium* sp. testées. L'activité inhibitrice des *Acidipropionibacterium* sp. est spécifique vis-à-vis des souches de propionibactéries (cutanées et laitières) et de *Lactobacillus* sp. testées.

L'analyse des génomes des propionibactéries disponibles dans les bases de données indique :

- qu'aucun cluster de gènes de métabolites spécialisés n'a été détecté dans les 34 génomes de *P. freudenreichii*, alors qu'ils sont présents dans la majorité des souches de *C. acnes* et dans quelques souches d'*Acidipropionibacterium* sp.
- qu'une grande quantité et diversité de clusters de gènes codant potentiellement la synthèse de métabolites spécialisés sont présents au sein de *Cutibacterium* sp. et peuvent expliquer la largeur du spectre d'action, qui est non spécifique à quelques genres bactériens. Seuls des clusters de terpènes et de bactériocines de classe III ont été détectés dans les 8 génomes d'*Acidipropionibacterium* sp. analysés.

2.1.6 Discussion

La compétition par interférence, impliquant des molécules antimicrobiennes, est un phénomène fréquent dans le monde bactérien. La synthèse de métabolites spécialisés entraîne un coût pour le producteur qui doit être équilibré par les bénéfices qu'elle apporte. Ce fait permet d'explorer les forces évolutives sélectionnant les comportements antagonistes. Par ailleurs, les différents habitats peuvent être plus ou moins sélectifs pour les souches produisant des molécules antimicrobiennes, selon le type de contraintes abiotiques et la compétition écologique qu'ils imposent.

Les propionibactéries laitières et cutanées sont issues de deux habitats naturels très différents. Lors de cette étude, des différences de fréquence, d'intensité et de spécificité des interactions de compétition et des activités inhibitrices ont été démontrées entre les trois groupes de bactéries propioniques, *Cutibacterium* sp., caractéristique de l'habitat « cutané », *Propionibacterium* et *Acidipropionibacterium,* deux genres caractéristiques de l'habitat « laitier ».

Les contraintes biotiques et abiotiques liées à ces habitats pourraient être à l'origine de la sélection de différents types de comportements compétitifs au sein des populations de propionibactéries adaptées à ces habitats et expliquer les résultats obtenus.

La majorité (>80 %) des souches de *P. freudenreichii* isolées sont issues de fromages à pâte pressée cuite de type Emmental (Thierry et al., 2011). Le processus de fabrication de ce type de fromages impose aux bactéries des conditions abiotiques très sélectives : température supérieure à 50 °C pendant plusieurs heures, salinité et acidité relativement élevées, présence d'ions cuivre, conditions d'anaérobiose stricte (Beuvier and Duboz, 2013). Ces conditions sont défavorables à la majorité des espèces présentes dans le lait pendant les 24 premières heures de fabrications. Les seuls concurrents potentiels des propionibactéries qui persistent dans le fromage en cours de maturation sont des lactobacilles (Grappin et al., 1999). Il a été cependant montré qu'ils établissaient des relations de coopération avec *P. freudenreichii,* en lui fournissant du lactate comme substrat nutritif (Beuvier and Duboz, 2013; Thierry et al., 2011). Le grand nombre de stress abiotiques sélectionnerait donc des souches de *P. freudenreichii* en fonction de leur résistance à ces stress. Les mécanismes de compétition par interférence ne seraient pas sélectionnés faute de concurrents partageant la même niche écologique, ce qui serait en accord avec le principe de « *competition sensing* » de Cornforth & Foster (2013).

Le fromage en cours de maturation s'apparente à des conditions de « culture en batch ». En début de fabrication, les éléments nutrionnels sont abondants et les microorganismes peuvent présenter une croissance exponentielle. Cette phase est suivie par des conditions de carence

nutritionnelle, dans laquelle on est face à un « goulot d'étranglement » où les microorganismes se retrouvent en phase stationnaire de croissance puis meurent. A ces conditions s'ajoute l'accumulation de produits de métabolisme qui rendent le milieu encore moins favorable (ex. diminution de pH par de l'acide lactique). Dans les conditions de « culture en batch », on passe habituellement par plusieurs phases de « goulot d'étranglement » entrecoupées par de brèves périodes de multiplication de souches le mieux adaptées (Leisner & Haaber 2012). La pression de sélection s'exerçant dans ce type d'habitat va sélectionner des souches qui ont les meilleures capacités de survie (la mortalité la plus faible). Ici aussi, *P. freudenreichii* est particulièrement bien adapté et prédomine grâce aux mécanismes de compétition par exploitation. En effet, cette espèce est capable d'accumuler un grand nombre de molécules de réserve (polyphosphates, glycogène, tréhalose) en exploitant une grande variété de substrats initiaux (Aburjaile et al., 2016a). On peut penser donc, une fois de plus, que le coût d'un comportement antagoniste (compétition par interférence) n'est pas justifié pour cette espèce et ne sera pas sélectionné au cours de l'évolution.

L'ensemble des contraintes biotiques et abiotiques de cet habitat spécifique expliqueraient l'absence de phénotype antagoniste parmi les souches de *P. freundenreichii*.

Pour *Acidipropionibacterium* sp., qui ont une moindre résistance aux facteurs abiotiques lors de la fabrication du fromage, la stratégie de compétition par interférence pourrait être favorable face à un plus grand nombre de concurrents potentiels. En effet, les conditions de fabrication de fromages de type Leerdameer, dans lequel on constate une forte proportion d' *Acidipropionibacterium* sp., sont moins stringentes que pour l'Emmental (Britz and Riedel, 1994). Une plus forte proportion d'espèces de propionibactéries laitières et de lactobacilles persiste donc à la fin du processus de cuisson. Dans ce contexte, la stratégie de compétition par interférence pourrait être favorisée chez *Acidipropionibacterium*. Les substances produites ont, selon nos résultats, un spectre d'activité étroit, concernant exclusivement les espèces d'origine alimentaire qu'*Acidipropionibacterium* sont susceptibles de côtoyer dans cet habitat naturel (*Lactobacillus* sp. et autres propionibactéries). La production de substances antimicrobiennes pourrait aussi améliorer la survie d'*Acidipropionibacterium* grâce à la lyse des souches concurrentes, ce qui pourrait permettre d'apporter des éléments nutritifs dans une situation de carence nutritionnelle lors du processus de maturation du fromage.

Au sein des propionibactéries laitières analysées, la majorité de gènes prédits codant la synthèse d'antimicrobiens est distribuée dans les génomes de seulement quelques souches (*A. acidipropionicum*, *P. acidifaciens* et *P. propionicum*) qui hébergeraient jusqu'à 12 clusters de gènes. Il est important de souligner que les génomes de *P. freudenreichii* ne contiendraient pas de cluster de

gènes de métabolites spécialisés, ce qui est en concordance avec les résultats des études précédentes qui ont identifié une seule bactériocine au sein de cette espèce bactérienne (propionicine F) (Brede et al., 2004). La PCR spécifique ciblant le gène de cette bactériocine (*pcf*A) l'a détecté uniquement chez deux souches de *P. freudenreichii* au sein de la collection criblée dans cette étude. Le cluster codant cette molécule présente un pourcentage de bases GC inférieur au reste du génome et une utilisation différente des codons, ce qui suggère qu'il a été acquis par transfert horizontal de gènes. Les études génomiques confirment donc que les stratégies de survie de *P. freudenreichii* dans leur habitat naturel sont peu favorables à la sélection de gènes de compétition par interférence. Il est difficile de tirer des conclusions de l'étude des génomes d'*Acidipropionibacterium* sp., vu le faible nombre de représentants analysés. Aucun cluster de gènes codant pour des antimicrobiens putatifs n'a été détecté dans les deux génomes d'*A. thoenii* et *A. jensenii* présents dans la base de données NCBI. Il semble pourtant que les clusters de gènes d'antimicrobiens soient assez fréquents, vu le nombre de bactériocines décrites chez ces deux espèces bactériennes (cf. chapitre 1.2.3.2.2.3).

Il se peut que nos observations soient biaisées par l'échantillonnage de souches de *P. freudenreichii* présentes dans les collections internationales. En effet, comme dit précédemment, la majorité de souches séquencées dans la base NCBI et les souches utilisées dans cette étude sont issues des fromages de type Emmental. Cependant, les souches de *P. freudenreichii* ont aussi été isolées d'autres sources (déjections bovines, herbe, sol, machines de traite), qui constituent l'habitat naturel de cette espèce. Notre aperçu de la diversité et du potentiel antagoniste de ce groupe bactérien peut donc être très parcellaire. De plus, on ne peut pas exclure que l'absence de phénotype observé pourrait être due aux conditions expérimentales utilisées dans cette étude (utilisation de milieux de laboratoire dans lesquels des gènes d'antagonisme pourraient ne pas être exprimés).

Les conditions rencontrées dans l'habitat des propionibactéries cutanées sont très différentes. La peau constitue un environnement qui peut s'apparenter à une culture continue, dans laquelle la vitesse de réplication constitue la force sélective, pouvant favoriser les comportements compétitifs. *C. acnes* domine dans les follicules pileux grâce aux mécanismes de compétition par exploitation. En effet, les follicules pileux, notamment ceux des régions sébacées de la peau, sont colonisés de manière prédominante par deux espèces lipophiles : *C. acnes* et un champignon – *Malassezia* sp. En effet, *C. acnes* est équipé de plusieurs lipases, ce qui permet la décomposition des triglycérides (qui constituent 40 % des composants du sébum) et donne à l'espèce un avantage compétitif (Christensen & Brüggemann, 2014). La métabolisation des lipides procure aussi un effet de compétition par interférence, puisqu'elle aboutit à la fabrication d'acides gras qui diminuent le pH et exercent un effet antimicrobien vis-à-vis de microorganismes de la flore cutanée transitoire qui sont potentiellement pathogènes, tels que *S. pyogenes* ou *S. aureus*. Les souches de *C. acnes* semblent, quant à elles,

résistantes aux acides gras grâce à l'utilisation de la déiminase d'arginine qui génère du NH_3 qui contre la diminution du pH (Christensen & Brüggemann, 2014).

En plus des métabolites primaires à activité antimicrobienne, *C. acnes* produit une grande variété de métabolites spécialisés, qui confèrent aussi des avantages compétitifs face aux concurrents. Dans notre étude, environ 25 % des souches de *C. acnes* présentaient une activité inhibitrice à spectre d'action large. Cette observation est corroborée par l'étude génomique, qui montre une forte prévalence et une diversité de clusters de gènes d'antimicrobiens prédits dans les génomes de *C. acnes* disponibles dans la base NCBI. Parmi ces clusters, deux sont rencontrés dans la plupart des génomes de *C. acnes* analysés. Il s'agit d'un cluster de NRPS et d'un cluster de bactériocine de type lactococcine 972. De plus, certains phylogroupes portent des îlots génomiques hébergeant des gènes de synthèse de différentes classes de bactériocines (thiopeptide, LAP, lanthipeptide de classe II) (Scholz et al., 2016). Les autres espèces de *Cutibacterium* sp. (*C. avidum*, *C. granulosum*) présenteraient relativement peu de gènes de métabolites antagonistes.

Les analyses comparatives de Scholz & Kilian (2016) concernant l'historique évolutif du genre *Cutibacterium* sp. montrent que les souches les mieux adaptées à la nouvelle niche « cutanée » ont été favorisées. L'espèce la plus ancienne du point de vue évolutif est *C. granulosum*, suivie de *C. avidum* et de *C. 'humerusii'*. L'espèce apparue le plus tardivement serait *C. acnes*, au sein de laquelle le phylogroupe IA semblerait le plus récent et le plus prédominant. Le scénario envisagé par les auteurs est la transmission de souches environnementales de propionibactéries dans la nouvelle niche, la peau humaine, suivie par un processus itératif d'adaptation avec apparition de nouveaux clones et leur expansion au détriment de souches fondatrices. Ce type d'évolution aurait abouti à un modèle d'arbre phylogénétique « en escalier », avec relativement peu d'espèces « anciennes » et de nombreuses lignées de l'espèce la plus récente - *C. acnes*. Ainsi le phylogroupe IA de *C. acnes,* qui est le plus récent et le plus prédominant, présenterait des adaptations métaboliques, *via* l'acquisition de gènes de lipases, ou de gènes de métabolites spécialisés antagonistes, qui pourraient contribuer à son succès évolutif (Scholz and Kilian, 2016).

Curieusement, aucune des souches cibles de *Cutibacterium* sp. n'a été inhibée par les souches expéditrices de propionibactéries cutanées, ce qui pourrait être lié à une forte proximité phylogénétique, qui diminue la probabilité d'inhibition selon le principe de sélection des individus apparentés qui partagent les mêmes gènes (*kin selection* – cf. paragraphe 1.1.4) (West et al., 2006). Cette absence d'inhibition permettrait l'existence de plusieurs clones de *C. acnes* au sein d'une même niche sur la peau de chaque individu, comme cela a été constaté lors des études du microbiote cutané (Lomholt & Kilian, 2010).

Dans leur habitat naturel, les souches de *C. acnes* sont susceptibles de rencontrer une grande diversité de microorganismes concurrents, notamment dans des zones cutanées sèches et humides (Barnard and Li, 2017). Les molécules antimicrobiennes qu'ils produisent devraient donc avoir un spectre d'activité large, ce qui a été confirmé lors de notre criblage. En effet, les souches cliniques de *Cutibacterium* sp. inhibent une grande variété d'espèces cliniques et alimentaires à Gram positif. Il est possible que le spectre d'inhibition soit dépendant du phylotype de *C. acnes*. En effet, nous avons vu dans l'étude génomique que les différents phylotypes de *C. acnes* hébergeaient des clusters de gènes d'antimicrobiens spécifiques. En parallèle, nous savons que certains phylotypes de *C. acnes* seraient associés à des pathologies cutanées, telles que l'acné ou la dermatite atopique. Dans une étude du métagénome des follicules pileux des individus sains et acnéiques, Barnard et al. ont en effet constaté un déséquilibre de la flore, avec une plus forte diversité des espèces chez les patients avec acné. Ces patients ont notamment une plus faible proportion de *C. acnes* et *C. granulosum*. Au sein de *C. acnes*, chez les patients acnéiques, on détecte une surreprésentation des ribotypes 4 et 5, en comparaison aux individus sains, chez qui les rybotypes 2 et 6 sont plus abondants. Les propriétés antagonistes des certains ribotypes pourraient provoquer un déséquilibre de la flore cutanée en inhibant des espèces commensales bénéfiques et en provoquant une réaction inflammatoire du tissu cutané. Des études plus poussées seront toutefois nécessaires pour déterminer le rôle des métabolites antagonistes dans le déséquilibre du microbiote cutané associé à des pathologies.

2.2 Conclusions : relation habitat / comportement antagoniste

Pour survivre et proliférer dans des habitats naturels, les microorganismes doivent faire face à différents types de stress : stress abiotique (pression, température) et stress compétitif (compétition par exploitation de nutriments et compétition par production de substances antimicrobiennes).

En prenant comme modèle d'étude les espèces de propionibactéries laitières (*Propionibacterium* spp., *Acidipropionibacterium* spp.) et cutanées (*Cutibacterium* spp.), proches phylogénétiquement mais présentes dans des habitats très différents, nous avons pu étudier l'influence du type d'habitat sur la sélection et la spécificité des comportements de type compétitif liés à la production de substances antagonistes, par deux approches complémentaires, phénotypique et génomique.

La fréquence des comportements de type compétitif des propionibactéries est significativement différente selon le type d'habitat et est directement liée au genre bactérien considéré : en effet, 25 % des souches de *Cutibacterium* et 22,5 % des souches

d'*Acidipropionibacterium* sp. inhibent au moins une souche cible, alors que les souches de *Propionibacterium* sp. ne présentent aucune activité antimicrobienne. L'activité antagoniste des *Cutibacterium* s'exerce vis-à-vis d'un large panel de souches cliniques et alimentaires (large spectre d'activité), alors que l'activité antagoniste des *Acidipropionibacterium* sp. est spécifique vis-à-vis des propionibactéries (cutanées et laitières) et des *Lactobacillus* sp. En accord avec les données phénotypiques, aucun cluster de gènes de métabolites spécialisés n'a été détecté dans les 34 génomes de *Propionibacterium freudenreichii*, alors qu'ils sont présents dans la majorité de souches de *Cutibacterium* sp. et dans quelques souches d'*Acidipropionibacterium* sp.

L'exemple de *P. freudenreichii* suggère que les habitats très sélectifs, avec un grand nombre de stress abiotiques tel que celui des fromages à pâte pressée cuite de type Emmental, privilégient les espèces très résistantes mais ne présentant pas de comportement compétitif, puisque le nombre de concurrents potentiels dans ces conditions est très limité.

Acidipropionibacterium sp. présente une plus forte fréquence d'inhibitions, ce qui est en accord avec le fait que leur habitat, fromages de type Leerdamer, est moins stringent et comporte une plus grande proportion des concurrents potentiels. L'activité antimicrobienne de ce genre bactérien est spécifiquement dirigée contre les espèces partageant cet habitat laitier (autres propionibactéries laitières et lactobacilles).

Cutibacterium sp., caractéristique d'un habitat peu sélectif, présentant une grande diversité bactérienne, comme la peau des mammifères, présentent une forte proportion de souches ayant des comportements compétitifs. Au sein des génomes de *Cutibacterium* sp., une grande diversité de composés antimicrobiens (NRPS, bactériocines de type thiopeptide, lantibiotique,…) est détectée. Cette diversité assure un large spectre d'espèces inhibées, ce qui donne un avantage compétitif face à un panel de concurrents potentiels.

Une meilleure connaissance de la fréquence et de la diversité des activités inhibitrices et des interactions de compétition présentes chez les des propionibactéries permet d'envisager leur utilisation afin de lutter contre les microorganismes pathogènes, responsables notamment des pathologies dermatologiques. Lors du criblage phénotypique, nous avons constaté une activité inhibitrice importante d'une souche laitière d'*Acidipropionibacterium* vis-à-vis d'une souche pathogène de *Streptococcus pyogenes*. Dans la deuxième partie de ces travaux de thèse, nous avons utilisé deux approches complémentaires, phénotypique et génomique, pour caractériser la nature des substances antagonistes anti-*S. pyogenes* détectées.

2.3 Activité anti-*Streptococcus pyogenes* d'*Acidipropionibacterium jensenii* CIRM-BIA 1785

2.3.1 Contexte

Streptococcus pyogenes (streptocoque de groupe A, SGA) est une des principales causes d'infections de la peau et des tissus mous et de pharyngite dans le monde. L'incidence mondiale des infections à *S. pyogenes* est estimée à environ 700 millions de cas par an avec une mortalité atteignant 500 000 personnes. Les SGA sont responsables d'un panel très varié de pathologies. Au niveau cutané, ils peuvent provoquer des infections de la couche cornée superficielle (impétigo), de l'épiderme superficiel (érysipèle), des tissus sous-cutanés (dermo-hypodermite), des fascia (fasciite nécrosante) et des muscles (myosite ou myonécrose). La gravité de ces infections est variable. Par exemple, l'impétigo est une pathologie bénigne, alors que la fasciite nécrosante peut rapidement mettre en jeu le pronostic vital du patient, en causant des nécroses rapidement extensives des tissus. Cette capacité à infecter et à nécroser les tissus sous-cutanés et les muscles vaut à *S. pyogenes* le surnom de « bactérie mangeuse de chair » (*flesh eating bacteria*). Les SGA peuvent aussi être à l'origine de toxi-infections graves, telles que le syndrome de choc toxique streptococcique (Krzyściak et al., 2013).

Bien que les SGA soient en général très sensibles aux antibiotiques, certains patients souffrent d'infections récurrentes, qui pourraient être dues au portage chronique d'une souche (DeMuri and Wald, 2014). Le portage est défini comme échec microbiologique de traitement, où l'on retrouve la même souche bactérienne dans les suites d'un traitement antibiotique bien conduit. Gastanaduy et al. (1980) ont montré, sur un groupe de 132 patients traités pour une angine à SGA par de la pénicilline, que les cultures restaient positives chez 20 % des patients après la première cure, 50 % après la deuxième cure et 42 % après la troisième cure d'antibiotique. L'éradication du portage de *S. pyogenes* peut donc nécessiter des stratégies alternatives, adjuvantes à l'antibiothérapie, avec idéalement un spectre d'activité étroit, ne perturbant pas le microbiote naturel et n'induisant pas de sélection d'antibiorésistance (Krzyściak et al., 2013).

Depuis plusieurs années, la stratégie probiotique et l'utilisation des bactériocines représentent des approches alternatives dans la prévention et le traitement des maladies infectieuses, non seulement au niveau intestinal, mais aussi dans d'autres sites du corps où le microbiote joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie physiologique, tels que la peau (Cotter et al., 2013; Holzapfel et al., 1998).

Des espèces du groupe des *Cutibacterium*, notamment *Cutibacterium acnes* produisent des composés antibactériens (Faye et al., 2000, 2011; Ratnam et al., 1999). Cependant, *C. acnes* est une propionibactérie cutanée impliquée dans la physiopathologie de l'acné, dont l'utilisation en tant que probiotique semble difficile.

Les propionibactéries laitières des genres *Propionibacterium* et *Acidipropionibacterium*, utilisées dans les procédés de fabrication des fromages de type Emmental, constituent une source potentielle de produits antimicrobiens. En effet, plusieurs composés antibactériens ont été décrits dans ce groupe bactérien, présentant une activité vis-à-vis de certaines espèces à Gram positif. L'activité de la propionicine T1 et de la propionicine (Jenseniine) P issues *d'Acidipropionibacterium thoenii* et d'*Acidipropionibacterium jensenii*, respectivement, ont fait objet des brevets en tant que traitements possibles de l'acné (US patent no. 2003/0096365A1 et US patent no. 2001/006221847B1) (Barefoot and Ratnam, 1999). En effet, ces molécules sont intéressantes, compte tenu de leur robustesse (résistance à des températures de 100 °C pendant 30 min, résistance au pH de 2 à 10, stabilité dans des solutions de NaCl, dans des alcools et dans l'urée) et de leur spectre d'activité étroit, permettant de conserver l'équilibre du microbiote cutané (Faye et al., 2011).

Par ailleurs, les propionibactéries laitières présentent des propriétés probiotiques, qui permettraient de produire les composés intéressants *in situ*. Elles ont en effet des capacités de résistance aux facteurs environnementaux, ce qui leur permettrait de survivre dans l'habitat cutané qui est relativement hostile. En effet, elles supportent des conditions d'acidité et de carence en nutriments, grâce à de nombreux mécanismes d'adaptation au stress (Thierry et al., 2011). De plus, des donnés *in vitro* et *in vivo* suggèrent la capacité des propionibactéries laitières, spécifiquement de *P. freudenreichii,* à moduler la réponse immunitaire intestinale (Rabah et al., 2017). Les métabolites des propionibactéries laitières exercent aussi un effet anti-cancéreux, principalement par l'induction de l'apoptose. Il a aussi été montré que les propionibactéries laitières, comme d'autres bactéries probiotiques, pouvaient lier des métaux lourds et des toxines (ex. aflatoxine) qui ont un fort potentiel cancérigène (Cousin et al., 2011; Rabah et al., 2017).

Finalement, certaines espèces laitières telles que *P. freudenreichii* et *A. acidipropionici* figurent sur la liste d'agents possédant le statut « QPS » (*qualified presumption of safety*) dans la législation européenne, et les tests de sécurité des autres souches de propionibactéries laitières sont également rassurants, permettant leur utilisation en tant que probiotiques (Meile et al., 2008, EFSA, 2008).

L'utilisation de propionibactéries laitières, ou des produits de leur métabolisme, pourrait être envisagée dans des stratégies d'éradication de portage chronique de *S. pyogenes*, pour diminuer les

récurrences des infections et le réservoir de cette bactérie « mangeuse de chair » (Krzyściak et al., 2013).

2.3.2 Objectifs

Dans l'étude précédente, l'activité inhibitrice des souches du groupe des propionibactéries d'origines cliniques et laitières a été testée, par la méthode de double couche d'agar, vis-à-vis de souches cibles, alimentaires et cliniques (Tableau 2.1.4 – 1). Cette technique permet de visualiser des activités antimicrobiennes liées à des processus de compétition par exploitation et/ou par interférence.

Streptococcus pyogenes est une des principales causes d'infections de la peau et un pathogène majeur, pour lequel des solutions alternatives aux traitements par les antibiotiques sont recherchées.

Une activité anti-*S. pyogenes* a été mise en évidence pour 6 souches de propionibactéries, 4 souches d'origine clinique (C*. acnes* cPAB F10, cPAB F12, cPAB G2 et cPAB C8) et 2 souches d'origine laitière (*A. jensenii* dPAB E4 et *A. thoenii* dPAB F3) (Tableau 2.1.4 – 5). L'utilisation de bactéries propioniques laitières offre l'avantage d'avoir des souches qui pour certaines figurent sur la liste QPS et qui peuvent, de plus, offrir des potentialités en tant que probiotiques. La souche *A. jensenii* E4 - CIRM-BIA 1785 - présente une activité antagoniste anti-*S. pyogenes* qui se manifeste par une zone d'inhibition importante, de 30 mm de diamètre, et par un spectre d'activité étroit, essentiellement orienté vers des souches bactériennes appartenant au genre *Lactobacillus* et au groupe des propionibactéries, en plus de *S. pyogenes*.

L'objectif de cette étude est de caractériser la nature des substances antagonistes à activité anti-*S. pyogenes* produites par la souche d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785. L'étude s'est focalisée sur la caractérisation des métabolites spécialisés impliqués dans la compétition par interférence. Deux approches complémentaires, phénotypique et génomique, ont été utilisées : (i) l'activité biologique et les propriétés physico-chimiques du composé anti-streptococcique produit dans le surnageant de culture ont été caractérisés et des essais de purification du composé actif ont été réalisés ; (ii) les clusters de gènes de métabolites spécialisés présents dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, qui pourraient potentiellement être responsables de l'activité antibactérienne de cette souche, ont été analysés. Ces deux approches sont complémentaires, puisque l'analyse des clusters de gènes de métabolites spécialisés permettra de connaître la nature des molécules candidates et aidera à orienter

les techniques de purification du composé ant-streptococcique présent dans le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785.

2.3.3 Méthodes

2.3.3.1 Souches bactériennes

Les souches bactériennes cibles utilisées dans cette étude (Tableau 2.3.3 – 1) proviennent de la collection du Laboratoire de Bactériologie du CHRU de Nancy (collection LBN). Les souches sont cultivées en milieu M17 (Biokar) à 37 °C en atmosphère anaérobie en jarre (AnaeroGen, Thermo Scientific™ Oxoid, Waltham, Etats-Unis) pendant 24 heures.

Tableau 2.3.3 – 1.

Souches cibles de streptocoques utilisées et origine

N° collection	Espèce	Origine
LBN 646	*Streptococcus vestibularis*	biopsie pancréas
LBN 647	*Streptococcus mitis/oralis*	os gros orteil Gauche
LBN 648	*Streptococcus dysgalactiae*	abcès cuisse
LBN 649	*Streptococcus gallolyticus*	abcès scrotal
LBN 650	*Streptococcus intermedius*	abcès fosse iliaque
LBN 651	*Streptococcus pyogenes*	loge externe jambe
LBN 652	*Streptococcus pyogenes*	os
LBN 653	*Streptococcus pyogenes*	liquide synovial
LBN 654	*Streptococcus agalactiae*	hémoculture périphérique
LBN 655	*Streptococcus agalactiae*	hémoculture périphérique
LBN 656	*Streptococcus agalactiae*	hémoculture périphérique
LBN 657	*Streptococcus pneumoniae*	hémoculture périphérique
LBN 658	*Streptococcus pneumoniae*	hémoculture périphérique

La souche expéditrice *A. jensenii* CIRM-BIA 1785 est issue de la collection CIRM-BIA (cf. Annexe 2.1 – 1) du Laboratoire Science & Technologie du Lait & de l'Œuf (STLO), UMR 1253 INRA / AGROCAMPUS OUEST de Rennes. *A. jensenii* CIRM-BIA 1785 est incubé à 30 °C en atmosphère anaérobie en jarre dans un bouillon YEL (*Yeast Extract Lactate*) composé de 1 % de tryptone (Biokar, Pantin, France), 1 % d'extrait de levure (Biokar), de 2,1 % de sirop de lactate de sodium (60 %, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), de 0,3 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4 et de 0,06 $g.L^{-1}$ de $MnSO_4$ (Hettinga et al., 1968).

Les souches d'*A. jensenii* et de streptocoques sont conservées à -80 °C dans un bouillon YEL ou dans un bouillon M17, respectivement, contenant 20 % de glycérol, et cultivées deux fois successivement avant utilisation.

2.3.3.2 Tests d'activité : méthode de diffusion des surnageants de culture en milieu gélosé

Le test de diffusion des surnageants de culture en milieu gélosé a été réalisé selon la description de Schillinger & Lücke (1989). La souche d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 est cultivée en bouillon YEL en anaérobiose à 30 °C pendant 5 jours. Les surnageants des cultures sont obtenus après centrifugation des cultures à 5 000 g pendant 30 minutes à 4 °C, puis filtration sur des membranes à 0,45 µm (Millipore).

Les souches indicatrices sont cultivées dans le milieu M17 à 37 °C en anaérobiose pendant 24 heures. La densité optique (600 nm) de la suspension est ajustée à 0,01 et la suspension bactérienne est ensuite ajoutée à 15 mL de milieu M17 gélosé (agar à 1,2 %), maintenu en surfusion à 50 °C. Le milieu inoculé est ensuite versé dans des boîtes de Petri et laissé jusqu'à solidification. Les puits de 6 mm de diamètre sont creusés dans la gélose avec un emporte-pièce stérile en verre (3 puits par boîte de Petri).

Un volume de 30 µL de surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 est ajouté dans chaque puits. La gélose est laissée à 4 °C pendant 1 heure pour permettre la diffusion du surnageant, puis incubée à 37 °C en anaérobiose pendant 24 h. Les diamètres des zones d'inhibition de croissance autour de chaque puits sont mesurés en millimètres. Les tests ont été réalisés en triplicata et les valeurs rapportées représentent la moyenne des trois mesures.

2.3.3.3 Tests de stabilité de l'activité antibactérienne du surnageant

La stabilité à la température et au pH de l'activité antibactérienne du surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 vis-à-vis de *S. pyogenes* LBN 614 a été testée. Pour la stabilité thermique, le surnageant a été exposé à une température de 65, 80, 100 et 121 °C pendant 15, 30 et 60 minutes. Le surnageant a ensuite été refroidi et l'inhibition de *S. pyogenes* LBN 614 a été testée par la technique de diffusion en milieu gélosé. Pour la stabilité à différents pH, le surnageant a été ajusté à des valeurs

de pH comprises entre 2 et 11, en utilisant des solutions concentrées de NaOH et d'HCl, et incubé pendant 2 heures à 22 °C. Les surnageants ont été neutralisés en utilisant des solutions concentrées de NaOH et d'HCl, avant de déterminer l'activité antibactérienne par la technique de diffusion en milieu gélosé.

La stabilité de la substance antimicrobienne à la digestion enzymatique a été testée avec la protéinase K (Sigma), la trypsine (Sigma), la pepsine (Sigma), la papaïne (Merck), la pronase (CALBiochem-BEHRING CORP). Un volume de 500 µL de surnageant a été traité avec chacune des enzymes à une concentration finale de 1 $mg.mL^{-1}$. Un témoin sans traitement enzymatique a été réalisé. Toutes les préparations ont été incubées à 37 °C pendant 90 minutes. L'enzyme a ensuite été inactivée par incubation à 100 °C pendant 3 minutes avant de tester l'activité du surnageant vis-à-vis de *S. pyogenes* LBN 614 par la technique de diffusion en milieu gélosé.

Le surnageant non traité (natif) a été analysé comme témoin positif. Une bactériocine sensible aux enzymes protéolytiques, la pédiocine (Sigma), a été traitée par les enzymes de la même manière que le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 afin de servir de témoin positif et de valider l'activité des enzymes protéolytiques et le protocole utilisé.

2.3.3.4 Purification partielle du composé antimicrobien

A. jensenii CIRM-BIA 1785 a été cultivé dans du bouillon YEL pendant 72 heures. Un volume de 1,5 L de culture a ensuite été centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes. Le culot bactérien a été éliminé et le surnageant filtré sur une membrane à 0,2 µm (Merck). Les composés du surnageant ont ensuite été soumis à une précipitation avec du sulfate d'ammonium à 35 % (2 h, 4 °C). L'ensemble a été centrifugé à 10 000 g pendant 15 min à 4°C, puis re-solubilisé et dialysé (seuil de coupure 1000 Da).

Pour une analyse électrophorétique, l'échantillon a été soumis à une précipitation à l'acide trichloroacétique (20 %), suivie de lavages avec de l'acétone. Une électrophorèse SDS-PAGE en tampon Tris-tricine (Schägger, 2006) a alors été réalisée. Un standard de masse moléculaire (Novex Sharp, Invitrogen) a été utilisé. En parallèle, un gel non coloré a été recouvert de 20 mL d'agar mou (0,8 % agar) contenant la souche indicatrice *S. pyogenes* LBN 614, comme décrit précédemment.

2.3.3.5 Protocole de purification des lasso peptides

Pour concentrer et pré-purifier les échantillons, une extraction en phase solide a été réalisée : 10 mL de surnageant a été chargé sur une cartouche SepPak Plus C8 (Waters) ; la fraction de rinçage a

été obtenue après passage de 3 mL d'un mélange H_2O / CH_3CN / HCOOH (90/10/0,1), et la fraction d'élution après passage de 1 mL d'un mélange H_2O / CH_3CN / HCOOH (20/80/0,1).

Les fractions d'élution et de rinçage ont été évaporées à l'aide d'un speed-vac puis reprises dans les solutions suivantes : reprise de la fraction de rinçage dans 400 µL H_2O / CH_3CN/ HCOOH (70/30/0,1) et reprise de la fraction d'élution dans 1 mL H_2O / CH_3CN/HCOOH (20/80/0,1).

Les fractions ont été analysées à l'unité "Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes" (UMR 7245 CNRS-MNHN) par LC-MS sur un spectromètre de masse Ultimate 3000 RSLC (Thermo Scientific) ESI-Q-TOF mass spectrometer (Maxis II ETD, Bruker Daltonics), équipé d'une colonne Acclaim RSLC Polar Advantage II column (2.2 µm, 2.1 × 100 mm, Thermo Scientific), avec un débit de 300 $\mu L.min^{-1}$. Le volume d'injection était fixé à 2 µL. Un gradient d'acétonitrile a été réalisé.

2.3.3.6 Détection de clusters de gènes des métabolites spécialisés

L'ADN de la souche d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 a été séquencé à la plateforme GeT-PlaGe (Castanet-Tolosan, France) en utilisant un instrument PacBio RSII. L'assemblage a été réalisé par les ingénieurs de la plateforme, à la demande du STLO qui a mis à disposition pour ce travail la souche d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785.

Le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 a été intégré dans la plateforme MicroScope MAGE (Vallenet et al., 2017) pour une annotation automatisée et experte des gènes et pour l'étude comparative. Les dénominations des ORFs suivent la dénomination automatisée proposée par MicroScope MAGE. L'annotation a été affinée par une analyse avec BLASTp (*Basic Local Alignment Search Tool*) et la recherche des domaines conservés (*Conserved Domain search tool*) du NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Le logiciel antiSMASH (*Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell*) avec les paramétrages par défaut (Weber et al., 2015) a été utilisé afin d'identifier les clusters de gènes de métabolites spécialisés. Les précurseurs des RiPPs ont été identifiés en combinant les analyses avec antiSMASH et BAGEL3 (van Heel et al., 2013). Les limites des clusters ont été réajustées manuellement par analyse de la synthénie des séquences protéiques dans les clusters de gènes prédits automatiquement par antiSMASH. La prédiction fonctionnelle de domaines des NRPS et des PKS a été effectuée avec NaPDoS (*Natural Product Domain Seeker*) (Ziemert et al., 2012).

2.3.4 Résultats

2.3.4.1 Activité antibactérienne d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785

Afin d'analyser l'étendue de l'activité anti-*Streptococcus*, l'activité du surnageant de culture de cette souche vis-à-vis d'autres souches de *Streptococcus* sp. a été déterminée (Tableau 2.3.4 - 1).

L'activité anti-*S. pyogenes* était présente dans le surnageant de culture. Le spectre d'activité n'était pas limité à une seule souche de streptocoques. En effet, toutes les souches de *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. vestibularis*, *S. mitis/oralis*, *S. gallolyticus*, *S. intermedius* et *S. dysgalactiae* testées ont été inhibées par le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, avec des diamètres d'inhibition variant de 4,3 à 12,5 mm (Tableau 2.3.4 - 1).

L'activité antimicrobienne observée précédemment était donc liée, soit totalement soit au moins partiellement, à la production d'une substance présente dans le surnageant de culture et apte à diffuser dans le milieu gélosé et à exprimer une activité inhibitrice visualisée par un halo d'inhibition de la souche cible.

Tableau 2.3.4 – 1

Diamètres des zones d'inhibition des souches de *Streptococcus* sp. par le surnageant de culture de la souche *A. jensenii* CIRM-BIA 1785 (test de diffusion en milieu gélosé).

Souches cibles	Diamètre d'inhibition (mm)
Streptococcus pyogenes LBN 614	11± 0,5
Streptococcus pyogenes LBN 651	11,8 ± 0,5
Streptococcus pyogenes LBN 652	11,2 ± 0,9
Streptococcus pyogenes LBN 653	11 ± 0,6
Streptococcus pneumoniae LBN 656	5 ± 0,7
Streptococcus pneumoniae LBN 657	10,2 ± 0,4
Streptococcus agalactiae LIBio 297	10,5 ± 0,4
Streptococcus agalactiae LBN 654	9,2 ± 0,9
Streptococcus agalactiae LBN 655	10,8 ± 0,5
Streptococcus vestibularis LBN 646	4,3 ± 1,1
Streptococcus gallolyticus LBN 649	10,8 ± 0,3
Streptococcus mitis/oralis LBN 647	10 ± 0
Streptococcus intermedius LBN 650	12,5 ± 0,5
Streptococcus dysgalactiae LBN 648	10 ± 0,0

2.3.4.2 Caractérisation des propriétés du surnageant d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785

La substance antibactérienne est détectée dans le surnageant de culture après 48 heures de croissance d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, alors que la souche est en phase stationnaire tardive, et l'activité biologique se maintien pendant la phase stationnaire de croissance. Les diamètres des zones d'inhibition restent compris entre 11-12 mm pour les surnageants de cultures collectés entre 48 et 72 heures d'incubation de la souche productrice (Figure 2.3.4 – 1).

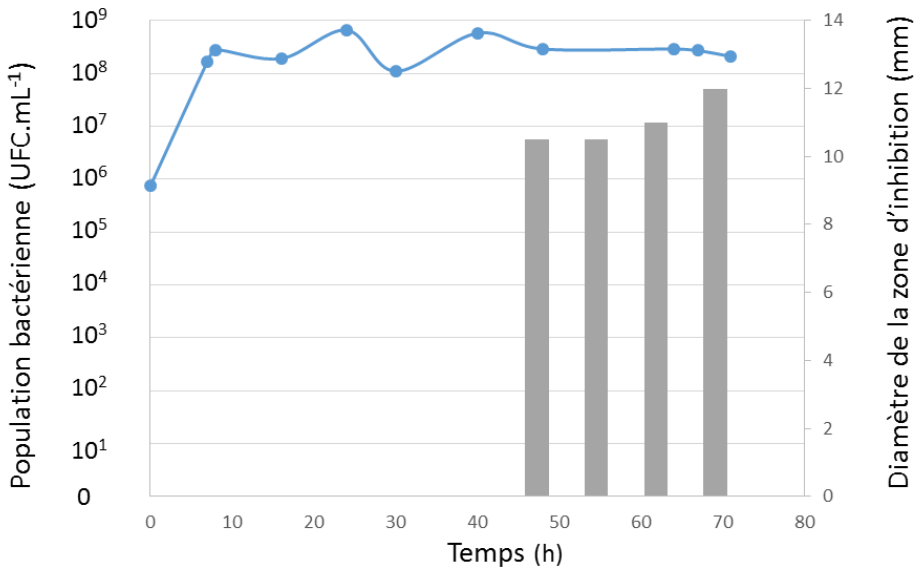


Figure 2.3.4 – 1

Croissance (courbe bleue) d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 et activité anti *S. pyogenes* LBN 614 de la substance inhibitrice (test de diffusion en milieu gélosé, histogramme gris) lors d'une culture en milieu YEL à 30 °C.

L'activité inhibitrice du surnageant n'a pas été affectée par le traitement par les enzymes protéolytiques testées telles que protéinase K, trypsine, pepsine, papaïne, pronase (Tableau 2.3.4 – 2 et Figure 2.3.4 – 2). La pédiocine, bactériocine utilisée comme témoin positif permettant de vérifier l'activité des différents enzymes protéolytiques, perd son activité anti-streptococcique après les différents traitements enzymatiques réalisés (Figure 2.3.4 – 2). Cet essai permet donc de valider la fonctionnalité des enzymes et des traitements appliqués.

Ces résultats suggèrent que la substance produite n'est pas de nature protéique, ou est un peptide/protéine qui possède une configuration lui permettant de résister aux traitements protéolytiques.

Tableau 2.3.4 – 2

Diamètres des zones d'inhibition vis-à-vis de la souche *S. pyogenes* LBN 614 (test de diffusion en milieu gélosé) par les surnageant d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 traité par différentes enzymes.

Enzymes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	Surnageant traité par l'enzyme	Témoin sans enzyme avec un traitement thermique identique	Témoin positif (surnageant natif)
Protéinase K	10,5	10,5	11
Pronase	10,5	10,5	11
Papaïne	10,5	11	11
Trypsine	10,5	11	11
Pepsine	10,5	11	11,5

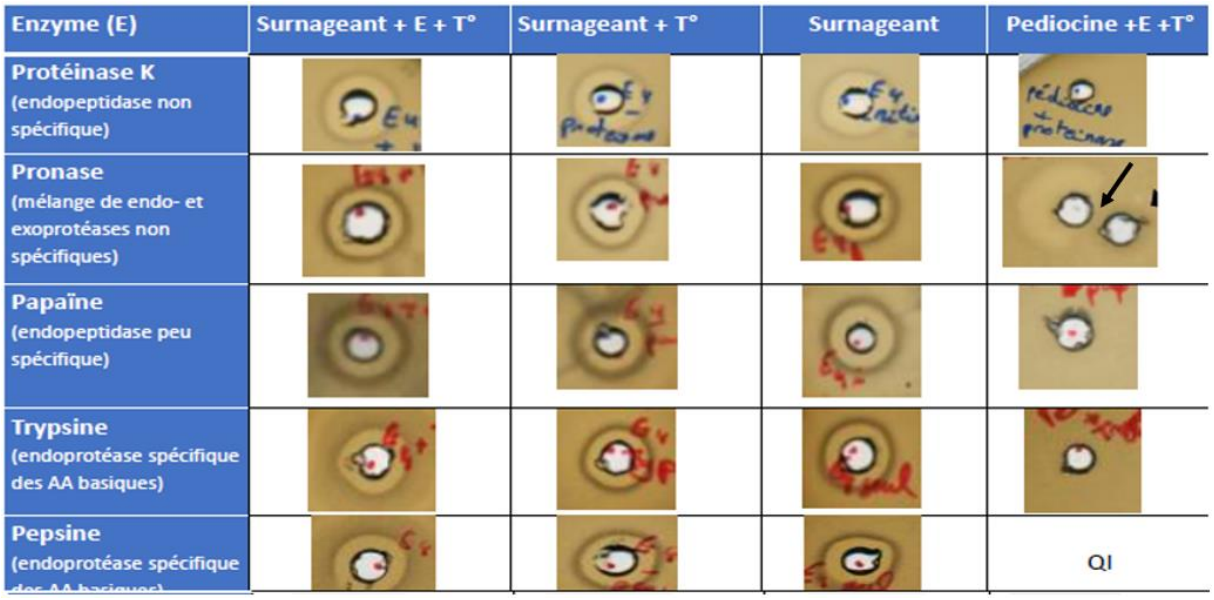


Figure 2.3.4 – 2

Visualisation des diamètres d'inhibition observés après un traitement avec différentes enzymes (E) protéolytiques du surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 (Surnageant + E +T). Des surnageants traités par la température (surnageant + T°), un surnageant brut (surnageant) servent de témoins. De la pédiocine traitée de façon similaire par les enzymes (pédiocine + E +T°) sert de témoin de perte d'activité inhibitrice après un contact avec les enzymes. Dans le test pédiocine/pronase, la pédiocine non traitée a été ajouté dans le puits de gauche et la pronase dans le puits de droite. L'absence d'halo d'inhibition est observée dans la zone ou la pédiocine rencontre la diffusion de la pronase, indiquant la sensibilité de la pédiocine à l'activité enzymatique testée.

Le composé produit possède une très bonne stabilité thermique. En effet, le surnageant a conservé son activité inhibitrice après un traitement thermique allant jusqu'à 30 minutes à 121 °C. Une légère diminution des diamètres d'inhibition (7-9 mm *versus* 11 mm pour le contrôle positif) a été observée après 60 minutes de traitement à 65, 80 100 et 121 °C (Tableau 2.3.4 - 3). Les activités inhibitrices sont également stables après 1 mois à 22 °C et 4 °C.

L'activité n'est pas affectée par des valeurs de pH variant de 2 à 11 (Tableau 2.3.4 – 4).

Tableau 2.3.4 – 3

Diamètres des zones d'inhibition de la souche indicatrice lors des tests d'activité par diffusion en milieu gélosé du surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 ayant subi différents traitements thermiques vis-à-vis de la souche *S. pyogenes* LBN 614.

Températures	Durée du traitement	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Températures	Durée du traitement	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Témoin		11			
65 °C	5 min	11	121 °C	5 min	11
65 °C	15 min	11	121 °C	15 min	11
65 °C	30 min	10	121 °C	30 min	11
65 °C	60 min	9	121 °C	60 min	7
80 °C	5 min	11	22 °C	24 h	11
80 °C	15 min	11	22 °C	7 j	11
80 °C	30 min	10	22 °C	1 mois	11
80 °C	60 min	8			
100 °C	5 min	11	4 °C	24 h	11
100 °C	15 min	11	4 °C	7 j	11
100 °C	30 min	11	4 °C	1 mois	11
100 °C	60 min	8			

Tableau 2.3.4 – 4

Diamètres des zones d'inhibition de la souche indicatrice *S. pyogenes* LBN 614 lors des tests d'activité par diffusion en milieu gélosé du surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 ayant subi différentes conditions de pH.

pH	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
2	10 ± 0,8
3	10,3 ± 0,5
4	11 ± 0,7
5	11,2 ± 0,5
6	11,6 ± 0,9
7	12,5 ± 0,6
8	12 ± 0,8
9	11,7 ± 0,7
10	10,7 ± 0,3
11	10,4 ± 0,4

2.3.4.3 Purification partielle du composé inhibiteur produit par *A. jensenii* CIRM-BIA 1785

Après traitement du surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 avec 35 % de sulfate d'ammonium, le précipité a été dialysé et concentré par précipitation à l'acide trifluoroacétique. L'extrait a ensuite été soumis à une électrophorèse en SDS-PAGE, qui a révélé une bande d'une masse moléculaire apparente d'environ 2 kDa, qui correspondait à une zone d'activité inhibitrice visualisée par le test du gel d'activité (Figure 2.3.4 – 3).

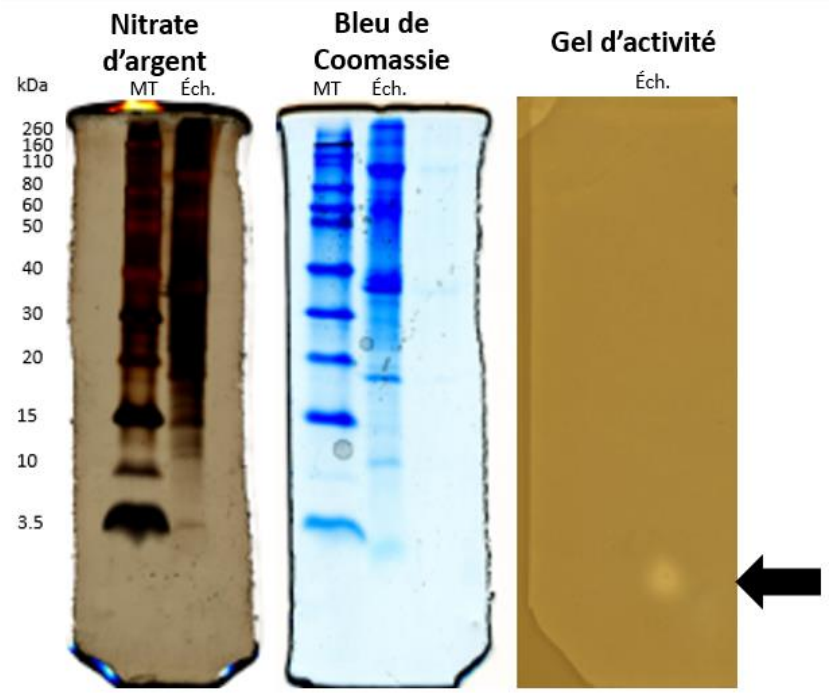


Figure 2.3.4 – 3

Analyse électrophorétique du précipité de surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785. A gauche, les gels colorés par le nitrate d'argent et le bleu de Coomassie, à droite, le gel d'activité avec une zone d'inhibition de croissance de la souche *de S. pyogenes* LBN 614 visualisé par la zone claire indiquée par la flèche. MT – marqueur de taille, Ech. – échantillon.

Le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 contient donc une substance à activité antibactérienne, d'une masse apparente voisine de 2 KDa dont la caractérisation plus poussée n'a pas été possible.

Lors de l'analyse du génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, un cluster de gènes codant potentiellement la synthèse d'un lasso peptide a été détecté (cf. chapitre 2.3.4.6.1). Les propriétés physico-chimiques d'un lasso peptide peuvent correspondre avec les caractéristiques de la substance anti-streptococcique contenue dans le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785. Nous avons donc tenté de réaliser une purification ciblant spécifiquement un lasso peptide.

2.3.4.4 *Purfication spécifique au lasso peptide*

Un test d'inhibition sur gélose a révélé une activité du surnageant de départ et de la fraction d'élution qui pourrait correspondre à l'activité d'un lasso peptide contre *Streptococcus pyogenes* (cf. chapitre 2.3.4.6.1 et 2.3.4.7).

Cependant, aucun peptide correspondant à tout ou partie des fragments supposés, prédits par l'analyse bio-informatique, GAGIGTAAuGWWPLADR ou GEFIGPYDuQILPLEDHSK, n'a pu être identifié en spectrométrie de masse sur la base du ratio m/z (ions 2+ ou 3+).

2.3.4.5 *Conclusions : propriétés biologiques et physico-chimiques du composé antibactérien*

Le composé présent dans le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 inhibe le développement en milieu gélosé de toutes les souches cliniques testées de *S. pyogenes,* de *S. pneumoniae* et de *S. agalactiae* et d'une large gamme de streptocoques commensaux.

La substance antibactérienne détectée dans le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 présente une masse moléculaire apparente de moins de 3,5 kDa. Elle est résistante à la protéolyse et à un traitement thermique allant jusqu'à 60 min à 121 °C, dans les conditions de milieu testées. Cette activité présente une grande stabilité lors de stockage du surnageant à température ambiante et à +4 °C. Elle est aussi résistante aux modifications de pH.

Comme mentionné précédemment, les différents essais de purification n'ayant pas permis d'obtenir le composé inhibiteur produit en quantité suffisante pour déterminer sa composition et sa nature, un séquençage du génome de la souche productrice a été réalisé afin d'identifier les clusters de gènes de métabolites spécialisés pouvant être responsables de la synthèse du composé.

2.3.4.6 Clusters de gènes de métabolites spécialisés présents dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785

Le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 a été assemblé complètement. Le chromosome présente une taille de 3,17 Mpb. On retrouve de plus deux séquences de 86 kpb et 85 kpb correspondant probablement aux plasmides. Le chromosome et une des séquences plasmidiques comporte 68 % de bases GC, alors que le deuxième plasmide contient 66 % de bases GC.

Quatre clusters de gènes de métabolites spécialisés ont été identifiés dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, un situé sur un des plasmides et trois sur le chromosome. Les clusters de gènes chromosomiques correspondent à un lasso peptide, un terpène-polyène et une NRPS. Le cluster plasmidique est un cluster hybride PKS/NRPS.

2.3.4.6.1 Le cluster de gènes d'un lasso peptide

Les lasso peptides sont une classe de RiPPs dotés d'une particularité structurelle : un noyau macrolactame de sept à neuf acides aminés et une queue peptidique linéaire qui est repliée dans la boucle macrolactame, donnant au peptide une apparence de lasso. En général, la production d'un lasso peptide nécessite au moins trois gènes codant un peptide précurseur (A), une leader-petidase (B) et une lactame synthase dépendante de l'ATP (C), qui assure la cyclisation du noyau macrolactame. Les clusters peuvent contenir des gènes additionnels, mais jusqu'à présent il n'a pas été prouvé qu'une enzyme supplémentaire était nécessaire pour produire un lasso peptide mature (Hegemann et al., 2015).

L'organisation des gènes du cluster de lasso peptide d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 (Figure 2.3.4 – 4) et les fonctions putatives des protéines codées par chaque CDS (Tableau 2.3.4 – 5) indiquent que le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 comprend 10 gènes putatifs codant deux peptides précurseurs (A et A1), une leader-peptidase (B), un élément de reconnaissance du peptide précurseur (E), une lactame synthase (C), une protéine d'export et d'immunité (transporteurs de type ABC) et une protéine de régulation.

La première et la deuxième CDSs (v1_1173 et v1_1172) codent des protéines de 560 et de 106 acides aminés (aa) présentant des fortes similarités avec une synthase d'asparagine (Figure 2.3.4 – 4). Cette enzyme est homologue avec le gène de la lactame synthase (lasso cyclase) (C) qui catalyse la formation de la boucle macrolactame entre le groupe α-amino N-terminal et un aspartate ou un glutamate de la chaîne peptidique. Toutefois, la lactame synthase (C) est en général codée par une seul gène et non deux, comme c'est le cas ici (Hegemann et al., 2015). La CDS v1_1171 code une protéine de 86 acides aminés hébergeant un domaine PqqD. Ce domaine agit comme une molécule chaperonne nécessaire à la reconnaissance du substrat par l'enzyme (E). Il est fréquemment rencontré dans les clusters de gènes des RiPPs et connu sous le nom d'élément de reconnaissance du peptide précurseur (RRE – RiPP *precursor peptide recognition element*) (Burkhart et al., 2015; Sumida et al., 2019). La CDS v1_1170 coderait une protéine transglutaminase-like de 156 aa correspondant à une leader peptidase (B). On suppose que les homologues de la transglutaminase dans les clusters des lasso peptides fonctionnent comme des cystéine-protéases dépendantes de l'ATP, impliquées dans la protéolyse du peptide leader. La CDS v1_1167 coderait un domaine liant l'ATP de 306 aa d'un transporteur de type ABC. La CDS v1_1166 coderait une protéine membranaire de 282 aa du transporteur ABC. Le transporteur peut être impliqué dans l'export du lasso peptide et dans l'immunité du producteur. Enfin, les CDSs v1_1165 et v1_1164 codent des protéines de 407 et 224 acides aminés

correspondant à une histidine kinase, qui pourrait être impliquée dans la régulation de l'expression des gènes du cluster.

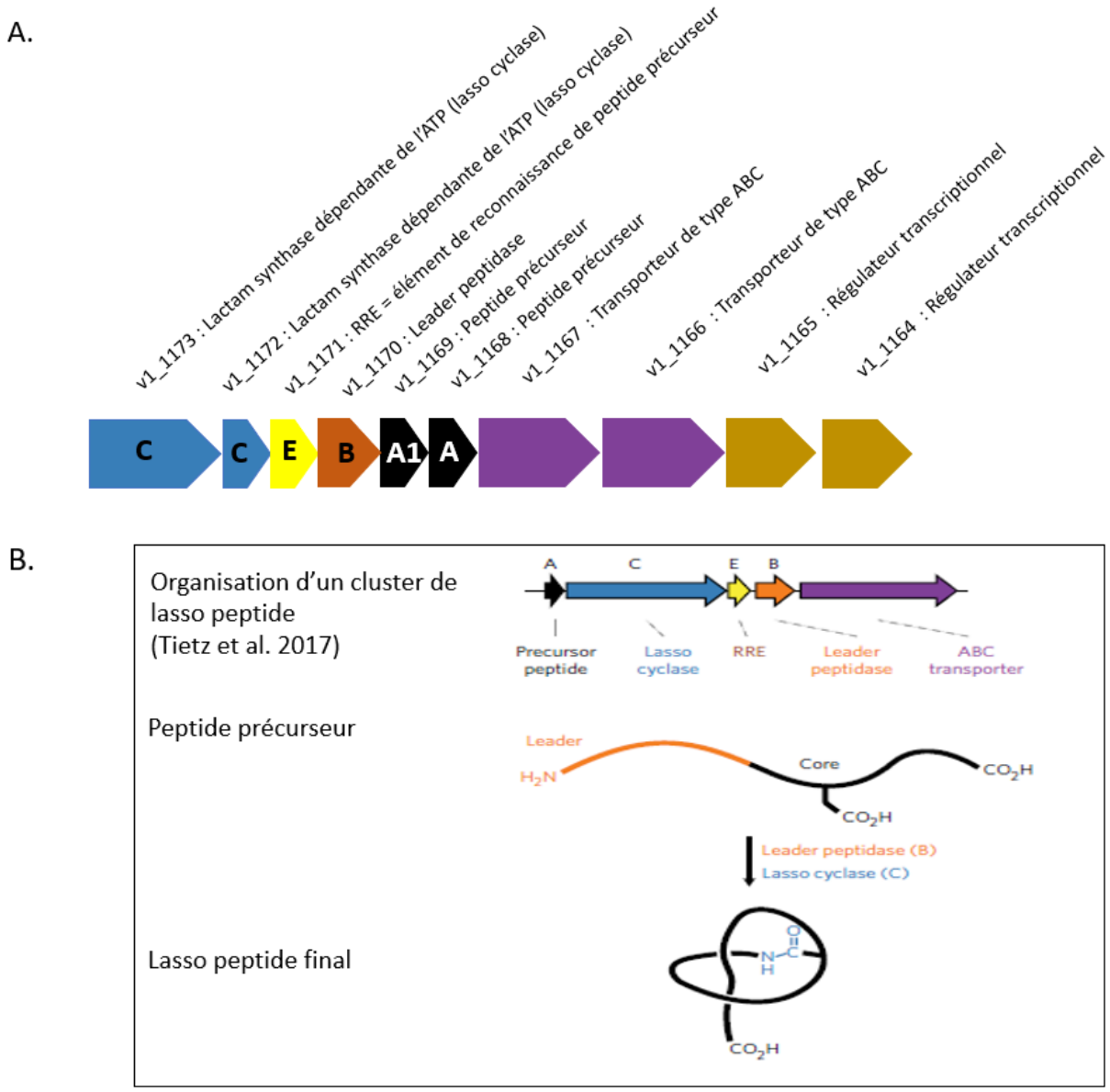


Figure 2.3.4 – 4

A. Cluster de gènes d'un lasso peptide identifié dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785. « v1_11… » correspondent aux numéros des CDS dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785' (cf. Tableau 2.4 – 6)

B. Schéma de synthèse d'un lasso peptide avec modification post -translationelles par leader peptidase et lasso cyclase. A, A1 – peptide précurseur du lasso peptide, B – leader peptidase responsable du clivage du peptide leader, C – lasso cyclase responsable de la formation de la boucle dans le lasso peptide final, E – élément de reconnaissance du peptide précurseur (RRE - RiPP *precursor peptide recognition element*) permettant l'attachement de la leader peptidase et de la lasso cyclase au peptide précurseur (d'après Tietz et al. 2017).

Tableau 2.3.4 –5

Séquences codantes d'ADN - *Coding DNA sequences* (CDS) - identifiées dans le cluster de gènes d'un lasso peptide dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785

CDS (locus tag PJEN1785-)	Phase de lecture	Fonction proposée	Taille (aa)	Protéines présentant la plus forte ressemblance (accession number)	E-value
v1_1173	-1	ATP-dependent lactam synthase (C)	560	Asparagine synthase *Rhodococcus equi* (WP_032404573.1)	7e-149
v1_1172	-3	ATP-dependent lactam synthase (C)	106	Asparagine synthase *Rhodococcus fascians* (WP_037149975.1)	3e-15
v1_1171	-2	Precursor peptide recognition element (E)	86	PqqD family protein *Nonomuraea candida* (WP_043619128.1)	1e-12
v1_1170	-1	Leader peptidase (B)	156	Polyketide beta-ketoacyl synthase *Streptomyces griseochromogene*s (WP_067302413.1)	4e-33
v1_1169	-3	Precursor peptide (A1)	40	Hypothetical protein HMPREF1129_2968 *Actinomyces naeslundii* str. Howell 279 (EJN86033.1)	4e-07
v1_1168	-1	Alternative precursor peptide (A)	39	Hypothetical protein HMPREF1129_2968 *Actinomyces naeslundii* str. Howell 279 (EJN86021.1)	2e-07
v1_1167	-2	ABC transporter (D)	306	ABC-2 type transport system ATP-binding protein *Actinomadura echinospora* (SEG53657.1)	3e-105
v1_1166	-2	ABC transporter (D)	282	ABC transporter *Streptomyces caeruleatus* (WP_062725052.1)	8e-80
v1_1165	-3	Response regulator	407	Two-component sensor histidine kinase *Pseudopropionibacterium propionicum (WP_014845508.1)*	0.0
v1_1164	-2	Response regulator	224	DNA-binding response regulator *Pseudopropionibacterium propionicum* (WP_061787231.1)	4e-128

Le premier peptide précurseur putatif est le plus probablement codé par CDS v1_1169, qui correspond à un peptide de 40 acides aminés (Figure 2.4 - 5). Le peptide contient une partie « leader » de 22 acides aminés, avec des motifs très conservés au sein des lasso peptides connus, YxxPxLxxxGxxxxxTx. Ces motifs sont reconnus par l'élément de reconnaissance RRE (Tietz et al., 2017). La deuxième partie code le lasso peptide de 18 acides aminés avec une masse moléculaire théorique de 1,83 kDa. La CDS v1_1168 coderait un deuxième peptide précurseur putatif de 39 acides aminés. Dans ce cas, le motif "leader" contient 21 acides aminés et a les mêmes motifs conservés mis à part une isoleucine à la place de la leucine dans la position 6 (YxxPx**I**xxxGxxxxxTx). Le lasso peptide putatif a 18 acides aminés avec une masse théorique de 2,13 kDa (Figure 2.3.4 - 5).

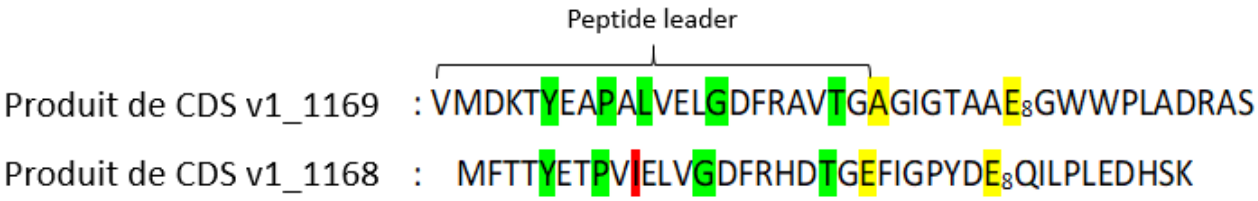


Figure 2.3.4 – 5

Séquences en acides aminés des lasso peptides putatifs d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 (les acides aminés conservés des peptides leader sont surlignés en vert, le résidu discordant du peptide leader est surligné en rouge, les résidus potentiellement impliqués dans la formation de la boucle macrolactame sont surlignés en jaune.

Selon l'analyse antiSMASH, le cluster de lasso peptide identifié dans le chromosome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 présente des similarités avec un cluster de gènes de la michiganine A de *Clavibacter michiganensis* (MIBiG BGC0000528) (28 % de gènes montrant une similarité). La michiganine A est un lantibiotique de type mersacidine qui agit probablement sur la synthèse de la paroi cellulaire (Holtsmark et al., 2006).

2.3.4.6.2 Les clusters de la polycétide synthase (PKS) et de la synthase de peptides non ribosomaux (NRPS)

Les PKS et les NRPS sont des grands complexes multi-enzymatiques qui synthétisent une grande variété de composés naturels. Les PKS et les NRPS sont organisés en modules qui travaillent comme des chaînes d'assemblage. Les modules sont localisés sur une ou plusieurs protéines qui assemblent les chaînes de polymères de manière séquentielle ou itérative (cf. chapitre 1.1.3.3).

Une PKS de type I est habituellement composée de plusieurs modules, dont chacun contient un domaine acyltransférase (AT), une protéine porteuse d'acyle (ACP, appelée aussi domaine de thiolation T) et un domaine cétosynthase. Un module typique de NRPS contient au minimum un domaine d'adénylation (A), une protéine porteuse de peptidyle (PCP, appelée aussi, comme pour les PKS, domaine de thiolation T) et un domaine de condensation (C). Les domaines sont responsables de (i) la reconnaissance et l'activation d'un acyle ou d'un acide aminé (domaines AT ou A, respectivement), (ii) la liaison et le transport du résidu vers les domaines catalytiques respectifs (domaines T) et (iii) la formation de liaison (domaines KS et C). De plus, des domaines de modification peuvent faire partie de modules de PKS et NRPS (hétérocyclisation, oxydation, déshydratasse etc…), ce qui génère une très grande diversité de composés polycétoniques et de peptides non ribosomaux.

2.3.4.6.2.1 Cluster NRPS

L'organisation des gènes inclus dans le cluster de gènes de NRPS d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 (Figure 2.3.4 - 6) indique que le cluster comprendrait 11 gènes codant des domaines d'adénylation, de condensation et de thiolation, ainsi que des protéines de transport et de régulation transcriptionnelle.

Les fonctions présumées codées par chacune des CDSs putatives sont présentées sur la Figure 2.3.4 – 6 et résumées dans le Tableau 2.3.4 – 6. La première CDS (v1_2715) coderait un répresseur transcriptionnel de 207 aa homologue des protéines régulatrices de la transcription de la famille TetR. Les trois CDSs suivantes (v1_2716 à 2718 de 488, 436 et 266 aa, respectivement) coderaient des protéines de fonction inconnue. La CDS v1_2716 contiendrait un domaine ferrédoxine et la CDS v1_2718 coderait une protéine présentant un domaine appartenant à la famille des ferritines. La CDS v1_2719 coderait une 4'-phosphopantetheinyl transférase (4'-PPT) de 225 aa. Les 4'-PPT participent au transfert et à la liaison du bras phosphopantéthéinyl du coenzyme A vers un résidu sérine du domaine de thiolation (T=PCP). Ceci permet l'activation des domaines T, en passant d'une forme « apo- » inactive vers une forme « holo- » fonctionnelle (Beld et al., 2014). La CDS v1_2720 coderait un domaine de condensation de 293 aa. L'analyse avec NaPDoS a montré sa similarité avec un domaine C de yersinibactine, qui appartient à la classe de domaines de cyclisation. Ce type de domaines catalyse la formation de la liaison peptidique et la cyclisation de résidus cystéine, serine ou thréonine dans la chaîne peptidique croissante. Il a été montré que les domaines C portent un motif HHXXXDG qui est responsable de leur activité (Stachelhaus et al., 1998). Ce motif est absent dans la CDS v1_2720, ce qui suggère que le domaine C qu'elle code est non fonctionnel. La CDS v1_2721 coderait un domaine d'adénylation de 697 aa, responsable de la sélection et de l'activation d'acides aminés incorporés dans

le peptide non ribosomal. Ce domaine serait spécifique de la cystéine. La CDS v1_2722 coderait un bi-domaine thiolation (T=PCP)-condensation (Marahiel, 2016). La partie « condensation » est aussi homologue de la yersiniabactine et est également dépourvue du motif HHXXXDG. La CDS v1_2723 correspond à une protéine de 193 aa de fonction inconnue. Les trois CDSs suivant codent des protéines de type transporteur ABC.

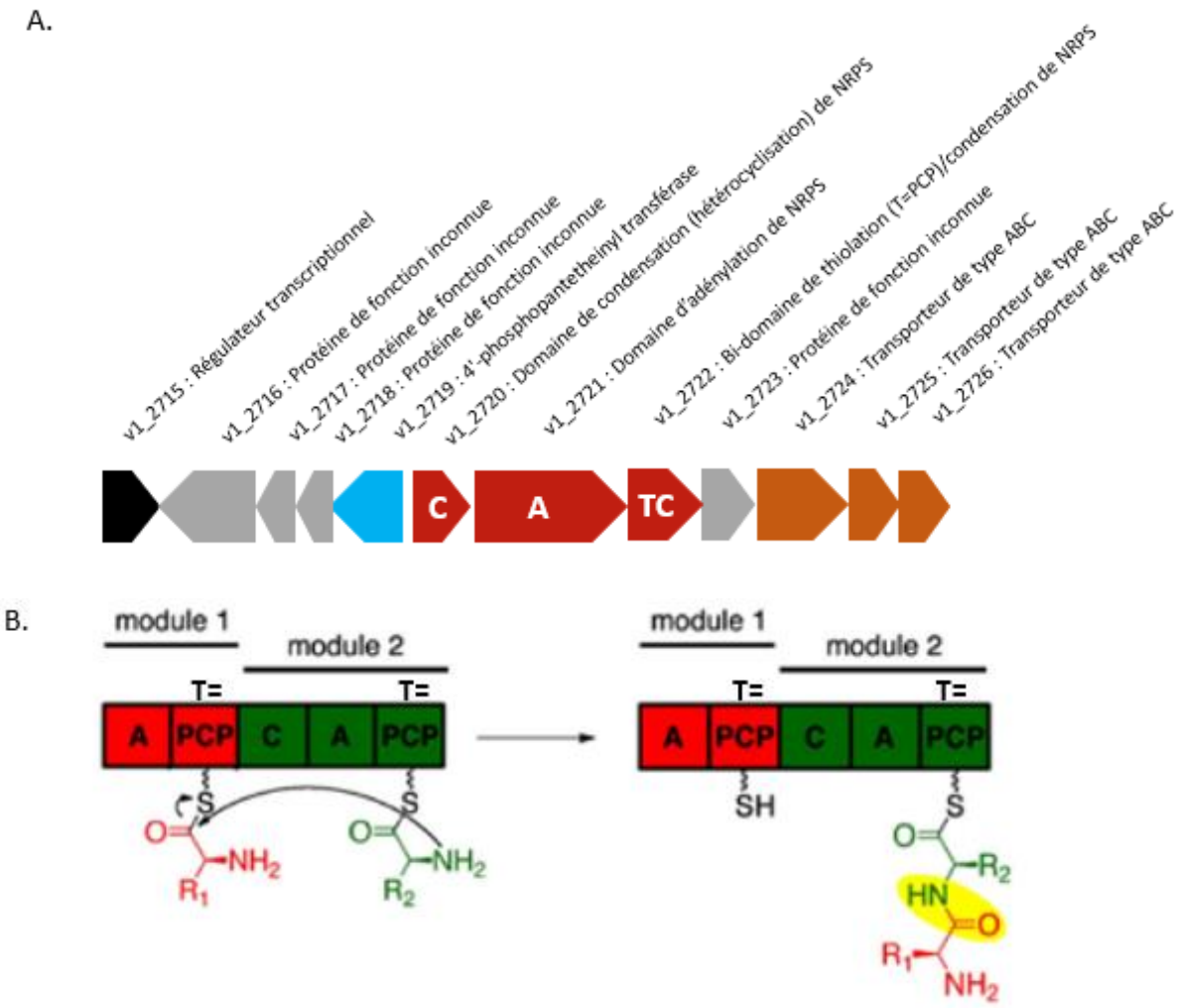


Figure 2.3.4 – 6

A. Composition du cluster de gènes de NRPS d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785. Les domaines de NRPS sont indiqués en rouge : C, domaine de condensation ; A, domaine d'adénylation ; TC, bi-domaine de thiolation (T=PCP)-condensation

B. Les NRPS sont composées de modules contenant habituellement trois domaines de base. (1) Le domaine d'adénylation (A) sélectionne et active spécifiquement un acide aminé. Celui-ci est ensuite transféré vers (2) une protéine porteuse de peptide (PCP – *peptidyl carrier protein*) appelé aussi domaine de thiolation (T). Deux acides aminés attachés à des PCP voisines sont ensuite liés par une liaison peptidique grâce à l'activité (3) d'un domaine de condensation (C) (Hur et al., 2012).

Tableau 2.3.4 – 6

Coding DNA sequences (CDS) identifiés dans le cluster de gènes NRPS dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785

CDS (locus tag PJEN1785)	Phase de lecture	Fonction proposée	Taille (aa)	Protéines présentant la plus forte ressemblance (accession number)	E-value
v1_2715	2	Repressor protein	207	TetR family transcriptional regulator *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_028703851.1)	1e-143
v1_2716	-3	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain-containing protein	488	4Fe-4S binding domain-containing protein *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_051237985.1)	0.0
v1_2717	-2	Protein of unknown function	436	4Fe-4S binding domain-containing protein *Acidipropionibacterium acidipropionici* (WP_028701285.1)	6e-22
v1_2718	-3	Conserved exported protein of unknown function	266	hypothetical protein *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_028701934.1)	8e-170
v1_2719	-2	4'-phosphopantetheinyl transferase	225	Phosphopantetheinyl transferase family protein *Propionibacterium acidifaciens* (WP_021797247.1)	2e-19
v1_2720	1	NRPS condensation (heterocyclization) domain	293	Non-ribosomal peptide synthetase *Corynebacterium* sp. HMSC074C05 (WP_070856059.1)	5e-23
v1_2721	1	NRPS adenylation domain	697	Amino acid adenylation domain-containing protein *Corynebacterium jeikeium* (WP_028701937.1)	4e-180
v1_2722	3	NRPS thiolation and condensation didomain	341	Non-ribosomal peptide synthetase *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_028701937.1)	4e-143
v1_2723	1	Protein of unknown function	193	Hypothetical protein *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_028701938.1)	3e-131
v1_2724	3	ABC transporter ATP-binding protein	365	ABC transporter *Corynebacterium* sp. HMSC074C05 (WP_070855985.1)	6e-97
v1_2725	2	permease component of ABC transporter	280	ABC transporter *Corynebacterium* spp. (WP_049172223.1)	6e-58
v1_2726	1	putative ABC-2 type transporter	237	ABC transporter *Corynebacterium jeikeium* (WP_049172227.1)	1e-33

Les NRPS typiques de classe A ont un module A-T d'initiation, un ou des modules C-A-T intermédiaires et un module C-A-T-TE de terminaison. Il existe aussi des variants des NRPS (classe B et C) avec des modules qui travaillent de manière itérative ou non-linéaire (cf. chapitre 1.1.3.3). La synthétase de yersiniabactine en est l'exemple, car elle contient trois modules de NRPS mais un seul domaine A (Miller et al., 2002).

Dans le cas d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, on peut supposer que le cluster de gènes de NRPS code une synthétase non-linéaire avec deux domaines C non-fonctionnels.

2.3.4.6.2.2 Cluster hybride PKS/NRPS

L'ADN plasmidique d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 contient un cluster hybride PKS/NRPS de 34,6 kb. Dans la base MIBiG, il y a présence d'un cluster de guadinomine dont les gènes montrent 11 % de similarité. La guadinomine est un inhibiteur du système de sécrétion de type III des bactéries à Gram négatif.

Le cluster PKS/NRPS d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 (Figure 2.3.4 – 7, Tableau 2.3.4 - 7) contient 15 gènes et est flanquée par plusieurs gènes de transposases.

Figure 2.3.4 – 7

Composition du cluster de gènes de l'hybride PKS/NRPS d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785. Les domaines des synthases sont indiqués en rouge : FAAL, AMP-ligase d'acides gras; KS, cétosynthase ; KR, cétoréductase ; T, domaine de thiolation (comprenant les domaines ACP et PCP) ; nMT, n-méthyl-transférase ; DH, déshydratase ; ER, enoylréductase ; AT, acyltransférase ; C, domaine de condensation ; A, domaine d'adénylation

La CDS v1_pb0019 coderait une AMP-ligase d'acyl gras (FAAL - *fatty acyl-AMP ligase*). FAAL activent les acides gras en acyles adénylés puis catalysent leur transfert sur les domaines T des PKS ou des NRPS pour produire des métabolites lipidiques (Hayashi et al., 2011). La CDS v1_pb0020 coderait un module putatif de PKS de 443 aa contenant des domaines ACP et KS. La CDS v1_pb0021 coderait une protéine de 1127 aa hébergeant des domaines AT, KR et ACP. La CDS v1_pb0022 coderait une protéine contenant des domaines KS/KR/ACP/KS. Une protéine de 1529 aa, codée par la CDS

v1_pb0023 présenterait des domaines AT, DH, ER, KR et ACP. La CDS v1_pb0024 coderait une protéine de 1062 aa portant des domaines KS, AT et DH. La CDS v1_pb0025 coderait une protéine de 498 aa contenant des domaines KR et ACP. La CDS v1_pb0026 coderait une thioestérase putative de 253 aa. La CDS v1_pb0027 coderait un domaine hybride de 1392 aa, contenant des domaines KS et AT d'une PKS et un domaine C d'une NRPS. L'analyse NaPDoS de la séquence d'acides aminés du domaine C montre 26 % de similarité avec le domaine C de la lychénicine produite par *Bacillus licheniformis,* qui appartient à la classe de domaine d'épimérisation. Ce type de domaine change la chiralité du dernier acide aminé dans la chaîne, de L- en D-acide aminé. La CDS suivante (v1_pb0028) coderait un domaine C de NRPS de 316 aa. L'analyse NaPDoS détecte 26 % de similarité avec le domaine C d'iturine décrite chez *Bacillus subtilis,* qui appartient à la classe de domaines DCL. Ce type de domaines lie le L-acide aminé du peptide au D-acide aminé. Le produit putatif de la CDS v1_pb0029 est une protéine NRPS de 1373 aa comportant des domaines A, n-méthyltransférase, PCP et thioestérase. 4'PPT est codé par la CDS v1_pb0030 (240 AA). Les deux CDSs suivantes (v1_pb0031 et v1_pb0032) coderaient des sous-unités d'un transporteur de type ABC (une perméase de 773 aa et une protéine liant l'ATP de 232 aa, respectivement). Les domaines de ce transporteur correspondraient à un système d'export de lipoprotéines de type ABC, ce qui suggère qu'il pourrait être impliqué dans l'export du produit de la synthase PKS/NRPS.

L'analyse NaPDoS des séquences d'acides aminés des domaines KS de l'hybride montre que six d'entre eux partagent 49 – 58 % de similarité avec des domaines modulaires et hybrides d'une myxobactérie tellurique, *Sporangium cellulosum,* synthétisant l'épothilone. L'épothilone appartient à une classe de molécules cytotoxiques dont le mécanisme est semblable à celui des taxanes (diterpènes utilisés en chimiothérapie, produits par l'if). Les domaines KS modulaires incorporent chacun une sous-unité du polymère croissant. Un domaine de l'hybride présente 57 % de similarité avec un domaine KS modulaire de *Salinispora arenicola*, une actinobactérie marine, qui synthétise la rifamicine. Les modules KS hybrides catalysent la réaction entre un acide aminé et un précurseur acyle.

Une proposition de la composition du produit de l'hybride PKS/NRPS (Figure 2.3.4 – 8) montre que le premier résidu pourrait correspondre à une 4-hydoxy-phenyl-glycine ou à une 3,5-dichloro-4-hydroxy-L-phenylglycine, suivi par quatre dérivés de malonyl. La dernière sous-unité pourrait correspondre au tryptophane. La masse moléculaire du produit est estimée à moins de 1 kDa.

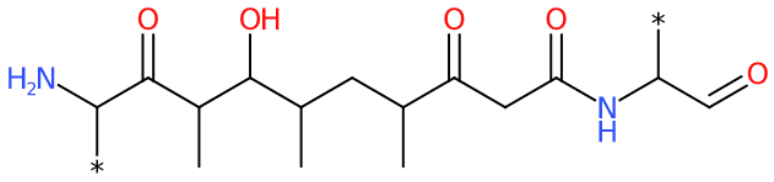


Figure 2.3.4 – 8

Structure du produit de cluster de gènes de l'hybride PKS/NRPS d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 prédite par antiSMASH et générée avec https://cdkdepict-openchem.rhcloud.com. Les étoiles symbolisent des résidus inconnus, pouvant correspondre à des structures très variées (ex. acides gras ou acides aminés, organisés en structures cycliques ou branchées). Il est important de noter que le produit final peut être très différent du fragment prédit par la bio-informatique.

Tableau 2.3.4 - 7

Coding DNA sequences (CDS) identifiées dans le cluster de gène hybride PKS/ NRPS dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785

CDS (Locus tag PJEN1785 plasmid 2)	Phase de lecture	Fonction proposée	Taille (aa)	Protéines présentant la plus forte ressemblance (accession number)	E-value
v1_pb0018	1	Protein of unknown function	77	Hypothetical protein SAMN05660209_04382 *Geodermatophilus africanus* (SDZ01768.1)	1.5
v1_pb0019	3	Putative fatty acyl-AMP ligase (FAAL)	682	Fatty-acid--CoA ligase *Mycobacterium abscessus* (WP_074356269.1)	8e-105
v1_pb0020	3	PKS ACP and KS domains	443	Type I polyketide synthase *Streptomyces davawensis* (WP_015655464.1)	3e-117
v1_pb0021	2	PKS AT, KR and ACP domains	1127	Beta-ketoacyl synthase *Amycolatopsis keratiniphila* (WP_072026251.1)	7e-66
v1_pb0022	1	PKS KS, KR, ACP and KS domains	1420	Type I polyketide synthase *Archangium gephyra* (WP_047858716.1)	2e-170
v1_pb0023	3	PKS AT, DH, ER, KR and ACP domains	1529	Polyketide synthase *Mycobacterium shinjukuense* (WP_083046832.1)	0.0
v1_pb0024	2	PKS KS, AT and DH domains	1062	Polyketide synthase *Mycobacterium lacus* (WP_085161666.1)	2e-141
v1_pb0025	1	PKS KR and ACP domains	498	Polyketide synthase *Mycobacterium parafortuitum* (WP_083143782.1)	2e-68
v1_pb0026	2	Putative thioesterase	253	Putative thioesterase *Calothrix* sp. HK-06 (WP_073622413.1)	1e-47
v1_pb0027	3	Hybrid PKS KS, AT and NRPS C domains	1392	Type I polyketide synthase *Propionibacterium acidifaciens* (WP_051245523.1)	0.0
v1_pb0028	2	NRPS C domain	316	Non-ribosomal peptide synthetase *Myxococcus xanthus* (WP_011554010.1)	7e-46
v1_pb0029	3	NRPS A, nMT, PCP and Thioesterase domains	1373	Non-ribosomal peptide synthetase *Moorea bouillonii* (WP_081431043.1)	9e-149
v1_pb0030	-3	4'phosphopantetheinyl transferase	240	Phosphopantetheinyl transferase EntD *Actinoplanes philippinensis* (SFF06041.1)	3e-44
v1_pb0031	-1	ABC transporter permease	773	ABC transporter permease *Propionibacterium acidifaciens* (WP_028707000.1)	0.0
v1_pb0032	-2	ABC transporter (ATP-binding protein)	232	ABC transporter ATP-binding protein *Propionibacterium acidifaciens* (WP_021796868.1)	2e-126

2.3.4.6.2.3 Cluster de gènes de terpène-arylpolyène

Le cluster de gènes de terpène d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 partage 50 % de similarité avec le cluster de gènes de synthèse des caroténoïdes MIBIG BGC0000636_c1. La production de pigment de type carotène a été précédemment décrite chez *A. jensenii* (Vanberg et al., 2007). Les caroténoïdes sont des pigments terpénoïdes avec des masses moléculaires d'environ 540 Da, produits par une grande variété de microorganismes. Les pigments caroténoïdes peuvent exercer une certaine activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif (Al-Abd et al., 2015; Mohana et al., 2013).

Le cluster de gènes du terpène d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 serait composé de 15 gènes (Tableau 2.3.4 – 8). Les CDSs v1_2346 et v1_2347 correspondraient aux fragments du cytochrome P450 de 231 et 189 aa. Les CDSs v1_2348 et v1_2349 coderaient des sous-unités de cyclase de lycopène (189 et 103 aa). La CDS v1_2350 coderait une oxydoréductase de 562 aa. La CDS v1_2351 correspondrait à un régulateur transcriptionnel de 190 aa, suivi d'un petit ARN nucléolaire (SNORD69 - v1 misc RNA8). La CDS v1_2352 coderait une synthase de géranylgéranyl pyrophosphate de 367 aa. Une synthase de phytoène (241 aa) serait codée par la CDS v1_2353. Les trois CDSs suivantes (v1_2354-6) coderaient des fragments de la phytoène déshydrogénase de 188, 176 et 251 aa. La CDS v1_2357 coderait une férrochélatase (405 aa). Les CDSs v1_2358 et v1_2359 correspondraient aux protéines de fonction indéterminée (45 et 394 aa). La CDS v1_2360 coderait une épimérase putative (143 aa). Finalement, la CDS v1_2361 coderait une protéine membranaire de 420 aa de fonction inconnue qui contiendrait un domaine de protéine bactérienne d'exigence de basse température A (LtrA - *low temperature requirement A protein*).

Tableau 2.3.4 - 8

Coding DNA sequences (CDS) identifiées dans le cluster de gènes d'un terpène dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785

CDS (locus tag PJEN1785)	Phase de lecture	Fonction proposée	Taille (aa)	Protéines présentant la plus forte ressemblance (accession number)	E-value
v1_2346	-1	Putative cytochrome P450 (fragment)	231	Cytochrome *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_071161758.1)	4e-160
v1_2347	-2	Putative cytochrome P450 (fragment)	189	Cytochrome *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_071161758.1)	5e-110
v1_2348	1	Lycopene cyclase (crtYc?)	189	Lycopene cyclase *Micrococcales* bacterium 73-15 (OJX94726.1)	5e-54
v1_2349	2	Lycopene cyclase (crtYd)	103	Lycopene cyclase *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_028703707.1)	1e-67
v1_2350	1	Putative oxidoreductase (crtQ? crtU?)	562	Isorenieratene synthase *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_084149488.1)	0.0
v1_2351	-1	Putative transciptional regulator	190	MarR family transcriptional regulator *Acidipropionibacterium jensenii* (AMS05715.1)	1e-131
v1 misc RNA8	-1	SNORD69			
v1_2352	3	Putative geranylgeranyl pyrophosphate synthase (crtE?)	367	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase *Arthrobacter* sp. EpRS71 (WP_062071149.1)	2e-110
v1_2353	1	Phytoene synthase (crtB)	241	Phytoene synthase *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_084149489.1)	3e-164
v1_2354	3	Putative phytoene dehydrogenase (fragment)(crtI?)	188	Phytoene dehydrogenase *Acidipropionibacterium acidipropionici* (WP_071001119.1)	3e-104
v1_2355	2	Phytoene dehydrogenase (fragment)	176	Phytoene dehydrogenase *Acidipropionibacterium acidipropionici* (WP_071001119.1)	1e-65
v1_2356	1	Putative phytoene dehydrogenase	251	Phytoene dehydrogenase *Acidipropionibacterium acidipropionici* (WP_071001119.1)	1e-173
v1_2357	3	Ferrochelatase	405	Ferrochelatase *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_051238586.1)	0.0
v1_2358	3	Protein of unknown function	45	Hypothetical protein *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_028703712.1)	6e-15
v1_2359	2	Protein of unknown function	394	Hypothetical protein *Acidipropionibacterium jensenii* (WP_028703712.1)	0.0
v1_2360	1	Putative epimerase	143	Hypothetical protein *Acidipropionibacterium acidipropionici* (WP_062819750.1)	6e-88
v1_2361	1	Membrane protein of unknown function	420	Low temperature requirement A protein (LtrA) *Microbacterium azadirachtae* (KJL37141.1)	5e-57

2.3.4.7 Conclusions : candidats potentiels suite à l'analyse des clusters de gènes de métabolites spécialisés présents dans le génome

La présence de clusters de gènes de métabolites spécialisés qui pourraient être responsables de la synthèse du composé antistreptococcique a été recherchée dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA1785.

Quatre clusters ont été identifiés par le programme antiSMASH : (1) un NRPS, (2) un groupe de gènes codant pour la biosynthèse d'un terpène, (3) un cluster codant la synthèse d'un lasso peptide, localisés sur le chromosome et (4) un hybride PKS/NRPS hébergé par un plasmide.

Le cluster de gènes codant pour lasso peptide permettrait la synthèse de deux lasso-peptides de 18 acides aminés, de masse moléculaire de 1,83 et 2,13 kDa, respectivement.

Le cluster de NRPS contiendrait deux domaines de condensation potentiellement non fonctionnels, ce qui rendrait la synthèse d'un peptide non ribosomal peu probable. Aucun produit n'a été d'ailleurs prédit par le logiciel antiSMASH.

Le produit de l'hybride PKS/NRPS aurait une masse moléculaire théorique de moins de 1 kDa, ce qui est inférieur à la masse apparente de 2 kDa observée sur le gel SDS-PAGE du précipité issu du surnageant d'*A. jensenii* CIRM-BIA1785.

C'est également le cas du produit putatif du cluster de synthèse d'un terpène, homologue à un pigment caroténoïde dont la masse moléculaire est habituellement de 540 Da.

Compte tenu de ces résultats, le candidat le plus probable pour la synthèse de composé antimicrobien serait le cluster du lasso peptide. En effet, les peptides précurseurs putatifs auraient des masses moléculaires qui pourraient coïncider avec la masse molaire apparente de 2 kDa du composé partiellement purifié du surnageant d'*A. jensenii* CIRM-BIA1785. Cependant, les essais d'enrichissement des fractions actives n'ont pas permis l'identification par spectrométrie de masse du composé actif.

2.3.5 Discussion

Dans cette étude, un composé antimicrobien, produit par *A. jensenii* CIRM-BIA 1785, dirigé plus particulièrement contre des souches cliniques de streptocoques, a été mis en évidence.

L'activité anti-*S. pyogenes* et anti-*S. pneumoniae,* deux pathogènes humains majeurs, pourraient avoir des applications cliniques intéressantes (Krzyściak et al., 2013). En effet, *S. pyogenes* est responsable de manifestations cliniques très diverses, allant des infections non-invasives du pharynx et de la peau, jusqu'aux infections sévères, invasives telles que la fasciite nécrosante et le sepsis entraînant une morbi-mortalité importante. *S. pneumoniae* est un pathogène opportuniste qui affecte principalement les enfants, les personnes âgées et les immunodéprimés. Il est une des premières causes bactériennes d'otite et de pneumonie avec une incidence en France de 500 000 et 110 000 cas par an, respectivement. Il est aussi une des causes principales de méningite bactérienne, qui est associée à une mortalité élevée et peut être à l'origine de graves séquelles fonctionnelles. Les streptocoques commensaux de la sphère oro-pharyngée peuvent, quant à eux, être responsables d'infections loco-régionales mais aussi des bactériémies et d'endocardites.

Bien que la résistance aux antibiotiques ne soit pas un problème majeur dans la prise en charge des infections à streptocoques, certains patients souffrent d'infections récurrentes, dues notamment à *S. pyogenes.* En effet, il a été constaté que ce microorganisme pouvait établir un réservoir intracellulaire, grâce aux mécanismes d'internalisation et de résistance à la lyse intracellulaire. Il est aussi capable de formation des biofilms. Ces deux mécanismes lui permettent d'échapper à l'action des antibiotiques et à la réponse immune de l'hôte. De plus, les bactéries de la flore orale (*Haemophilus* spp., *Moraxella* spp.) peuvent fabriquer des ß-lactamases qui détruisent les pénicillines utilisées en première intention pour le traitement des infections à streptocoques (DeMuri and Wald, 2014; Fiedler et al., 2015). Tous ces mécanismes peuvent conduire aux problèmes d'éradication de portage de *S. pyogenes* conduisant notamment à des récurrences de pharyngite et d'érysipèle.

L'éradication de portage de *S. pyogenes* peut donc nécessiter des stratégies alternatives, adjuvantes à l'antibiothérapie, avec idéalement un spectre d'activité étroit, ne perturbant pas le microbiote naturel et n'induisant pas de sélection d'antibiorésistance. Les métabolites spécialisés bactériens, tels que les bactériocines, pourraient jouer un rôle d'adjuvants aux traitements antibactériens classiques, comme ça a été montré pour la bactériocine la plus étudiée, la nisine (Shin et al., 2016). Ce lantibiotique présente une activité anti-biofilm et peut activer des mécanismes de réponse immunitaire de l'hôte. Pour des infections des plaies, un pansement libérant la nisine a non seulement montré une activité antibactérienne, mais a aussi accéléré le processus de cicatrisation

(Heunis et al., 2013). Des études plus poussées sont nécessaires pour savoir si le composé produit par *A. jensenii* CIRM-BIA1785 pourrait être exploité de manière similaire.

Les données dont on dispose actuellement suggèrent que le composé pourrait être un bon candidat pour l'utilisation sous forme purifiée, compte tenu de la robustesse de la molécule, sa résistance aux traitements thermiques, à l'acidité et à l'action des protéases. Les deux approches - phénotypique et génomique - suggèrent qu'il pourrait s'agir d'un lasso peptide.

Jusqu'à présent, neuf bactériocines ont été décrites chez *A. jensenii* et *A. thoenii* (cf. chapitre 1.2.3.2.2.3). Ces protéines avaient une masse moléculaire de 6 383 à 22 300 Da. Leur spectre d'activité concernerait principalement les autres propionibactéries laitières et cutanées et les lactobacilles, ainsi que quelques autres espèces à Gram positif présentes dans les flores laitières. Les propionicines PLG1 et GBZ-1 présentaient en plus une activité contre des pathogènes à Gram négatif d'intérêt alimentaire (*E. coli, Campylobacter* sp., *Vibrio* sp.). Cependant les études n'ont pas évalué l'activité de ces souches vis-à-vis des pathogènes cliniques faisant notamment partie des flores orales ou cutanées, tels que les streptocoques. C'est donc une première étude qui montre une activité importante d'une souche d'*A. jensenii* contre des souches cliniques de streptocoques.

Les lasso peptides appartiennent aux RiPPs de classe I. Ces peptides d'environ 20 acides aminés présentent une topologie particulière, ressemblante à un lasso, où l'extrémité C-terminale est repliée et passe dans une boucle macro-lactame N-terminale composée de 7 à 9 résidus (Hegemann et al., 2015). Cette topologie est maintenue grâce à un encombrement stérique des acides aminés de la queue C-terminale pour les lasso peptides de type II. Pour les lasso peptides de type I et III, la structure est en plus stabilisée par des ponts disulfures entre des résidus cystéine (Hegemann et al., 2015).

A notre connaissance, c'est le premier cluster de gènes d'un lasso peptide décrit chez les propionibactéries en général et plus particulièrement chez *Acidipropionibacterium* spp. En effet, les bactériocines décrites jusqu'à présent dans ce genre bactérien avaient une masse moléculaire plus élevée (6,3 – 22,3 kDa) et étaient sensibles aux enzymes protéolytiques, contrairement à la molécule produite par *A. jensenii* CIRM-BIA1785 (Ben-Shushan et al., 2003; Brede et al., 2004; Faye et al., 2000, 2002; Grinstead and Barefoot, 1992; Lyon and Glatz, 1991; Miescher et al., 2000; Ratnam et al., 1999; Van der Merwe et al., 2004). De plus, le lasso peptide est une molécule originale car il a très peu de ressemblance avec les lasso peptides décrits jusqu'à présent (Hegemann et al., 2015; Tietz et al., 2017).

La conformation particulière des lasso peptides leur confère en général une grande stabilité aux protéases et à la chaleur, ce qui était le cas pour la substance contenue dans le surnageant d'*A. jensenii* CIRM-BIA1785, dont l'activité antibactérienne persiste après autoclavage et après traitement par différentes enzymes protéolytiques. Cette stabilité exceptionnelle a été décrite pour la première

fois pour le lasso peptide microcine J25 (MccJ25). D'après les études de MccJ25, elle pourrait être due au rapprochement de la boucle avec la queue du peptide. Cependant, d'après les données connues pour les lasso peptides décrits plus récemment, cette stabilité n'est pas universelle (Hegemann et al., 2015).

Nous avons vu que l'élément de reconnaissance du RiPP (RRE) était nécessaire pour des modifications post-traductionnelles du lasso peptide. Les analyses réalisées avec antiSMASH et BAGEL3 ont classé le gène de RRE codant une protéine de 90 acides aminés en tant que peptide précurseur. Ce problème d'annotation par des outils bioinformatiques a déjà été rapporté par des auteurs travaillant sur d'autres lasso peptides (Tietz et al., 2017). L'annotation correcte a été possible grâce à l'analyse des CDSs putatifs avec BLASTp. Ceci souligne l'importance d'une analyse prudente de gènes des métabolites spécialisés prédits par des outils bioinformatiques.

Le cluster de gènes du lasso peptide d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 contient des gènes d'un transporteur de type ABC. Il a été suggéré que les lasso peptides codés par des clusters contentant ce type de transporteurs pouvaient avoir une activité antimicrobienne (Hegemann et al., 2015). En effet, les transporteurs peuvent être impliqués d'une part dans l'export du peptide et d'autre part jouer un rôle dans l'auto-immunité vis-à-vis de la molécule. De plus, le cluster de gènes du lasso peptide d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 code aussi des protéines régulatrices de type histidine kinase, qui pourraient être impliquées dans la régulation de l'expression du lasso peptide, comme ça été décrit pour la streptomonomycine (Metelev et al., 2015). Comme pour d'autres lasso peptides, sa production chez *A. jensenii* pourrait être déclenchée par des carences nutritionnelles en phase stationnaire de croissance. Ceci serait en accord avec nos résultats puisque nous avons observé que la production de la substance antibactérienne chez *A. jensenii* CIRM-BIA 1785, débute à 48 heures d'incubation, quand la phase stationnaire de croissance est déjà présente depuis au moins 24 heures.

La souche d'*A. jensenii* CIRM-BIA1785 pourrait aussi produire le composé *in situ* dans une stratégie probiotique. Cependant, la souche CIRM-BIA1785 présente une activité ß-hémolytique sur des milieux au sang, qui a été décrite pour d'autres souches de *A. jensenii*, *A. thoenii* et *A. acidipropionici*. Elle pourrait être liée à la production de pigment rouge-orangé par ces souches, qui est très similaire au pigment hémolytique granadène (caroténoïde) décrit chez *Streptococcus agalactiae* (Rosa-Fraile et al., 2006; Vanberg et al., 2007). La ß-hémolyse peut constituer un facteur de virulence et pose question quant à l'utilisation sécurisée de ce type de souches comme probiotique. Cependant, les tests de sécurité sont plutôt rassurants. Une souche d'*A. jensenii* a été administrée aux rats à des fortes doses de 10^{10} UFC par jour pendant 81 jours. Les effets toxiques et la translocation de la souche ont été évalués. Les résultats n'ont montré aucun effet indésirable sur l'état de santé, la

prise de poids ou les organes internes. De plus, il a été montré que la souche d'*A. jensenii* présente de nombreux caractères probiotiques, avec une bonne survie dans des conditions gastriques et une bonne adhésion aux cellules épithéliales, ce qui est nécessaire pour une colonisation du site ciblé (Huang et al., 2003; Meile et al., 2008).

2.3.6 Conclusion

Dans cette étude, une activité antimicrobienne d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, dirigée plus particulièrement contre des souches cliniques de streptocoques, a été mise en évidence. La substance antibactérienne détectée dans le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 présente une masse moléculaire apparente de moins de 3,5 kDa. Elle est résistante à la protéolyse, à la température et aux variations de pH. Ces propriétés pourraient être intéressantes pour son utilisation comme thérapeutique alternative dans l'éradication de portage de streptocoques pathogènes, tels que *S. pyogenes*. Les tentatives de purification de la substance n'ont pas permis de l'isoler et de la caractériser davantage. Cependant, dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, on détecte plusieurs clusters de gènes pouvant potentiellement coder la synthèse des antimicrobiens, dont un lasso peptide qui pourrait être responsable de l'activité antibactérienne de cette souche.

3 Conclusions et perspectives

Dans la théorie darwiniste, les ressources d'un milieu donné étant limitées, au sein d'une population qui l'habite, il se produit une lutte pour l'existence. Seulement les individus les mieux adaptés peuvent survivre. Ceci conduit à une modification graduelle de la population, avec une accumulation de caractères favorables au fil du temps.

Dans le monde bactérien, un des traits favorables à la survie est la production de substances antagonistes qui limitent la croissance des microorganismes concurrents. La synthèse de métabolites antagonistes constitue cependant un coût énergétique pour le producteur, qui doit être balancé par les bénéfices qu'il apporte. Notre hypothèse était que, selon le type de stress et de concurrence rencontrés par les bactéries dans leur habitat, la stratégie d'antagonisme peut être sélectionnée ou perdue au cours de l'évolution, selon la balance coût-bénéfice. Nous avons choisi comme modèle deux types d'habitats caractéristiques et différents, hébergeant des propionibactéries phylogénétiquement proches. Le groupe des propionibactéries laitières est retrouvé dans les fromages à pâte pressée cuite, et celui des propionibactéries cutanées colonise la peau et les muqueuses des mammifères. Selon des données récentes, les propionibactéries cutanées ont évolué à partir d'espèces laitières en s'adaptant à l'habitat cutané (Scholz and Kilian, 2016). Nous avions donc pu comparer l'influence de deux types d'habitats sur la sélection de la stratégie de compétition interférentielle au sein de ce groupe bactérien.

Les résultats de notre criblage phénotypique des activités inhibitrices et génotypique des clusters de gènes de métabolites spécialisés présents dans les génomes, suggèrent qu'un habitat très sélectif des propionibactéries laitières (espèces de *Propionibacterium*), avec un grand nombre de stress abiotiques, privilégie les espèces bactériennes très résistantes mais non inhibitrices. En effet, sous l'effet de la température, l'acidité et la salinité dans cet habitat (fromages à pâte pressée cuite), le nombre de concurrents potentiels des propionibactéries laitières (particulièrement de *P. freudenreichii*) est très limité. Ceci est confirmé par notre étude phénotypique et génotypique, qui montre que le comportement antagoniste est absent chez *P. freudenreichii*. *A contrario*, la peau des mammifères, colonisée par les propionibactéries cutanées (*Cutibacterium* sp.), constitue un habitat moins sélectif, avec un apport continu des nutriments, et présentant une grande diversité bactérienne. Cet habitat aurait pu favoriser au cours de l'évolution des espèces de *Cutibacterium* avec des phénotypes très compétitifs, aussi bien par l'exploitation des ressources que par la production de substances inhibitrices, comme nous avons pu l'observer lors du criblage des antagonismes et lors de l'analyse génomique.

D'autres études expérimentales seraient nécessaires afin de mieux explorer notre hypothèse, notamment d'autres facteurs pouvant influencer les interactions de compétition. Il serait tout d'abord intéressant de réaliser une étude plus complète des interactions entre les différentes espèces de propionibactéries. En effet, dans notre étude, nous avons pu tester seulement quelques souches de propionibactéries en tant que cibles sensibles à des activités inhibitrices. Nous avons vu que *C. acnes* inhibait des espèces de propionibactéries laitières, mais non celles d'autres *Cutibacterium* sp., alors que des souches d'*Acidipropionibacterium* inhibaient aussi bien *Cutibacterium* sp. que des propionibactéries laitières. Une cartographie complète des interactions réciproques des propionibactéries utilisées dans notre travail pourrait être réalisée. En effet, plusieurs études expérimentales ont analysé les antagonismes au sein d'un même genre bactérien et ont montré que les antagonismes étaient souvent réciproques et liés à une coexistence des souches dans un habitat. Il n'est cependant pas clair si les antagonismes sont plus abondants entre les bactéries très proches phylogénétiquement ou plus distantes (Abrudan et al., 2015; Cordero et al., 2012; Vetsigian et al., 2011). Les propionibactéries seraient un excellent modèle pour mieux explorer la relation entre la distance phylogénétique et l'ampleur des interactions de compétition.

Une étude expérimentale mettant en parallèle le potentiel antagoniste des propionibactéries avec leurs capacités métaboliques et de survie sur des longues durées pourrait aussi être envisagée. Nous avons vu, en effet, que *P. freudenreichii*, qui présente des nombreuses adaptations à la survie dans des conditions de carences nutritionnelles, ne présenterait pas de propriété antimicrobienne. Curieusement, les espèces d'*Acidipropionibacterium,* qui partagent le même type d'habitat que *P. freudenreichii,* comprennent des souches produisant des substances antimicrobiennes. On pourrait réaliser une analyse génomique croisant le potentiel d'adaptation à la survie avec le potentiel antagoniste des propionibactéries laitières, pour explorer l'association entre ces deux phénomènes. De plus, cette analyse pourrait être étayée par une meilleure connaissance des différences des conditions d'habitats de *P. freudenreichii* et d'*Acidipropionibacterium,* qui pourrait expliquer leur comportement antagoniste différent.

Nous avons vu que les activités inhibitrices des propionibactéries laitières avaient un spectre étroit et ciblaient les espèces présentes dans leur habitat et constituant des concurrents potentiels (autres propionibactéries et lactobacilles). Cependant, la raison pour laquelle *P. freudenreichii* n'inhibe pas les lactobacilles, alors que ces souches sont inhibées par les souches d'*Acidipropionibacterium* n'est pas claire. Une analyse croisée des distances phylogénétiques et des réseaux métaboliques déduits du capital génétique des propionibactéries et d'autres espèces présentes dans leur habitat permettrait d'évaluer l'association entre l'antagonisme, la phylogénie et la superposition des niches métaboliques (Russel et al., 2017).

Certaines études montrent que les antagonismes sont fortement influencés par des interactions sociales des bactéries. La présence de plusieurs acteurs peut modifier les comportements antagonistes, en les renforçant ou en les supprimant. Il serait donc intéressant de mettre en place une étude des interactions antagonistes des propionibactéries dans des communautés plus complexes, mettant en jeux plusieurs acteurs issus du même habitat (Abrudan et al., 2015; Cornforth and Foster, 2013).

De plus, on pourrait envisager d'explorer l'influence des facteurs abiotiques rencontrés dans le milieu naturel, en utilisant les modèles expérimentaux mimant le fromage ou la peau (Callewaert et al., 2014; Fox et al., 2004) et non des milieux de laboratoire, comme cela a été le cas dans notre étude.

Nous avons mentionné dans la discussion des résultats de la cartographie des interactions antagonistes des propionibactéries, qu'un biais potentiel pouvait être constitué par le choix des souches de propionibactéries laitières utilisées. En effet, la majorité de souches de *P. freudenreichii* séquencées dans la base NCBI et les souches utilisées dans cette étude sont issues des fromages de type Emmental. Afin de s'affranchir de ce biais, il serait intéressant d'analyser le potentiel antagoniste des souches de *P. freudenreichii* isolées de l'environnement (déjections bovines, herbe, sol, machines de traite). On pourrait aussi comparer le patrimoine métabolique des souches environnementales avec celles issues du fromage et le mettre en parallèle avec leur potentiel antagoniste.

Il est considéré que les espèces bactériennes du genre *Cutibacterium* sp. ont probablement évolué à partir de souches de propionibactéries environnementales grâce à des adaptations successives à la nouvelle niche cutanée, avec apparition des nouveaux clones et leur expansion au détriment des souches fondatrices. L'espèce la plus ancienne du point de vue de l'évolution est *C. granulosum*, suivi de *C. avidum* et de *C. 'humerusii'*. L'espèce apparue le plus tardivement est *C. acnes* (Scholz and Kilian, 2016). Les souches cutanées testées dans notre étude appartenaient majoritairement à l'espèce *C. acnes.* Il serait intéressant dans ce contexte de mieux explorer le potentiel antagoniste d'autres espèces de *Cutibacterium.* On pourrait en effet envisager que, lors de l'adaptation à l'habitat cutané, ce potentiel d'inhibition est devenu de plus en plus important, ce qui a contribué au succès et à la prédominance des espèces les plus récentes (*C. acnes*).

Les résultats de ces travaux montrent que les propionibactéries cutanées et plusieurs espèces de propionibactéries laitières constituent une source potentielle de nouvelles molécules antimicrobiennes. Le criblage a détecté une activité antimicrobienne relativement ciblée de certaines souches des propionibactéries vis-à-vis d'espèces présentes dans leurs habitats naturels. Compte tenu des propriétés probiotiques des propionibactéries laitières et de leur statut GRAS, elles pourraient être utilisées comme traitements adjuvants ou alternatifs à l'antibiothérapie. Une activité particulièrement

marquée d'une des souches d'*A. jensenii* (souche CIRM-BIA 1785) vis-à-vis des streptocoques a été explorée, montrant une résistance de la substance aux traitements protéolytiques, à la température et aux variations de pH. La substance est produite dans les phases tardives de croissance. La souche productrice présente un spectre d'activité étroit contre les propionibactéries, les lactobacilles et les streptocoques, dont des nombreuses espèces de streptocoques pathogènes pour l'Homme. La caractérisation génomique suggère que la substance pourrait correspondre à un lasso peptide, ce qui constitue le premier cas de ce type de molécule décrite chez les propionibactéries.

D'autres travaux seraient nécessaires afin de mieux caractériser la substance antimicrobienne détectée dans le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785. En effet, les tentatives d'identification de la séquence par spectrométrie de masse de la substance purifiée ont été infructueuses. D'autres protocoles de purification pourraient être testés, en prenant en compte les propriétés chimiques des substances antagonistes potentielles dont les gènes ont été identifiés dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785. Alternativement, on pourrait envisager une étude comparative des surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 et des mutants dépourvus d'activité antimicrobienne, grâce à une comparaison des profils de spectrométrie de masse des surnageant partiellement purifiés.

Nous sommes actuellement confrontés à une grande crise sanitaire mondiale liée à une mauvaise utilisation des antibiotiques et à la perte de leur activité antimicrobienne, avec la sélection des organismes multi- voire toto-résistants. Cependant, le monde microbien recèle des nombreuses armes alternatives pour combattre les microorganismes pathogènes. Ce travail de thèse s'inscrit dans une démarche de meilleure connaissance des propriétés et du vrai rôle écologique de la compétition par interférence. Ce type de travail représente un préalable indispensable dans le cadre de la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques destinées à prévenir ou guérir les infections bactériennes, en particulier dans le contexte actuel d'émergence de pathogènes de plus en plus résistants vis-à-vis des traitements actuellement disponibles.

Références

Abrudan, M.I., Smakman, F., Grimbergen, A.J., Westhoff, S., Miller, E.L., van Wezel, G.P., and Rozen, D.E. (2015). Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. Proc. Natl. Acad. Sci. *112*, 11054–11059.

Aburjaile, F.F., Rohmer, M., Parrinello, H., Maillard, M.-B., Beaucher, E., Henry, G., Nicolas, A., Madec, M.-N., Thierry, A., Parayre, S., et al. (2016a). Adaptation of Propionibacterium freudenreichii to long-term survival under gradual nutritional shortage. BMC Genomics *17*.

Aburjaile, F.F., Madec, M.-N., Parayre, S., Miyoshi, A., Azevedo, V., Loir, Y.L., and Falentin, H. (2016b). The long-term survival of Propionibacterium freudenreichii in a context of nutrient shortage. J. Appl. Microbiol. *120*, 432–440.

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.

Akiyama, H., Oono, T., Huh, W.K., Yamasaki, O., Akagi, Y., Uemura, H., Yamada, T., and Iwatsuki, K. (2002). Actions of gluco-oligosaccharide against Staphylococcus aureus. J. Dermatol. *29*, 580–586.

Al-Abd, N.M., Mohamed Nor, Z., Mansor, M., Azhar, F., Hasan, M.S., and Kassim, M. (2015). Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of Melaleuca cajuputi extract. BMC Complement. Altern. Med. *15*, 385.

Al-Ghazzewi, F.H., and Tester, R.F. (2010). Effect of konjac glucomannan hydrolysates and probiotics on the growth of the skin bacterium Propionibacterium acnes in vitro. Int. J. Cosmet. Sci. *32*, 139–142.

Al-Ghazzewi, F.H., and Tester, R.F. (2014). Impact of prebiotics and probiotics on skin health. Benef. Microbes *5*, 99–107.

Anand, S., Prasad, M.V.R., Yadav, G., Kumar, N., Shehara, J., Ansari, M.Z., and Mohanty, D. (2010). SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases. Nucleic Acids Res. *38*, W487–W496.

Anastasiou, R., Leverrier, P., Krestas, I., Rouault, A., Kalantzopoulos, G., Boyaval, P., Tsakalidou, E., and Jan, G. (2006). Changes in protein synthesis during thermal adaptation of Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii. Int. J. Food Microbiol. *108*, 301–314.

Anonymous (2008). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on the maintenance of the QPS list of microorganisms intentionally added to food or feed. EFSA J. 1–48.

Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., et al. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. Nat. Prod. Rep. *30*, 108–160.

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., Bémer, P., Kambarev, S., Patel, N.B., Lemenand, O., Caillon, J., Lawson, P.A., and Corvec, S. (2016). Propionibacterium namnetense sp. nov., isolated from a human bone infection. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *66*, 3393–3399.

Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., et al. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics *9*, 75.

Baquerizo Nole, K.L., Yim, E., and Keri, J.E. (2014). Probiotics and prebiotics in dermatology. J. Am. Acad. Dermatol. *71*, 814–821.

Barefoot, S.F., and Ratnam, P. (1999). Composition and method for treating acne.

Barnard, E., and Li, H. (2017). Shaping of cutaneous function by encounters with commensals: Functions of the skin microbiota. J. Physiol. *595*, 437–450.

Barnard, E., Shi, B., Kang, D., Craft, N., and Li, H. (2016). The balance of metagenomic elements shapes the skin microbiome in acne and health. Sci. Rep. *6*.

Barton, L.L., and Northup, D.E. (2011). Microbial ecology (Hoboken: John Wiley & Sons).

Bavington, C., and Page, C. (2005). Stopping bacterial adhesion: a novel approach to treating infections. Respir. Int. Rev. Thorac. Dis. *72*, 335–344.

Becker, K., Heilmann, C., and Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. *27*, 870–926.

Beld, J., Sonnenschein, E.C., Vickery, C.R., Noel, J.P., and Burkart, M.D. (2014). The Phosphopantetheinyl Transferases: Catalysis of a Posttranslational Modification Crucial for Life. Nat. Prod. Rep. *31*, 61–108.

van Belkum, M.J., Martin-Visscher, L.A., and Vederas, J.C. (2011). Structure and genetics of circular bacteriocins. Trends Microbiol. *19*, 411–418.

Bennallack, P.R., and Griffitts, J.S. (2017). Elucidating and engineering thiopeptide biosynthesis. World J. Microbiol. Biotechnol. *33*, 119.

Ben-Shushan, G., Zakin, V., and Gollop, N. (2003). Two different propionicins produced by Propionibacterium thoenii P-127. Peptides *24*, 1733–1740.

Bergey, D.H. (1923). Manual of Determinative Bacteriology (Williams and Wilkins Co.,).

Bergstrom, C.T., and Kerr, B. (2015). Microbiology: Taking the bad with the good. Nature *521*, 431–432.

Bernard, K.A., Shuttleworth, L., Munro, C., Forbes-Faulkner, J.C., Pitt, D., Norton, J.H., and Thomas, A.D. (2002). Propionibacterium australiense sp. nov. Derived from Granulomatous Bovine Lesions. Anaerobe *8*, 41–47.

Beuvier, E., and Duboz, G. (2013). The Microbiology of Traditional Hard and Semihard Cooked Mountain Cheeses. Microbiol. Spectr. *1*.

Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M.G., Lu, X., Schwalen, C.J., Kautsar, S.A., Suarez Duran, H.G., de Los Santos, E.L.C., Kim, H.U., Nave, M., et al. (2017). antiSMASH 4.0-improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. Nucleic Acids Res. *45*, W36–W41.

Boyaval, P., Deborde, C., Corre, C., Blanco, C., and Bégué, É. (1999). Stress and osmoprotection in propionibacteria. Le Lait *79*, 59–69.

Brede, D.A., Faye, T., Johnsborg, O., Ødegård, I., Nes, I.F., and Holo, H. (2004). Molecular and Genetic Characterization of Propionicin F, a Bacteriocin from Propionibacterium freudenreichii. Appl. Environ. Microbiol. *70*, 7303–7310.

Brede, D.A., Lothe, S., Salehian, Z., Faye, T., and Nes, I.F. (2007). Identification of the Propionicin F Bacteriocin Immunity Gene (pcfI) and Development of a Food-Grade Cloning System for Propionibacterium freudenreichii. Appl. Environ. Microbiol. *73*, 7542–7547.

Britz, T.J., and Riedel, K.-H.J. (1994). Propionibacterium species diversity in leerdammer cheese. Int. J. Food Microbiol. *22*, 257–267.

Brüggemann, H. (2005). Insights in the pathogenic potential of Propionibacterium acnes from its complete genome. Semin. Cutan. Med. Surg. *24*, 67–72.

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.

Brzuszkiewicz, E., Weiner, J., Wollherr, A., Thürmer, A., Hüpeden, J., Lomholt, H.B., Kilian, M., Gottschalk, G., Daniel, R., Mollenkopf, H.-J., et al. (2011). Comparative Genomics and Transcriptomics of Propionibacterium acnes. PLoS ONE *6*, e21581.

Buffie, C.G., and Pamer, E.G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. Nat. Rev. Immunol. *13*, 790–801.

Burkhart, B.J., Hudson, G.A., Dunbar, K.L., and Mitchell, D.A. (2015). A Prevalent Peptide-Binding Domain Guides Ribosomal Natural Product Biosynthesis. Nat. Chem. Biol. *11*, 564–570.

Burton, J.P., Chilcott, C.N., Moore, C.J., Speiser, G., and Tagg, J.R. (2006). A preliminary study of the effect of probiotic Streptococcus salivarius K12 on oral malodour parameters. J. Appl. Microbiol. *100*, 754–764.

Butler-Wu, S.M., Sengupta, D.J., Kittichotirat, W., Matsen, F.A., and Bumgarner, R.E. (2011). Genome sequence of a novel species, Propionibacterium humerusii. J. Bacteriol. *193*, 3678.

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

Callewaert, C., Buysschaert, B., Vossen, E., Fievez, V., Van de Wiele, T., and Boon, N. (2014). Artificial sweat composition to grow and sustain a mixed human axillary microbiome. J. Microbiol. Methods *103*, 6–8.

Cane, D.E., and Ikeda, H. (2012). Exploration and mining of the bacterial terpenome. Acc. Chem. Res. *45*, 463–472.

Canesso, M.C.C., Vieira, A.T., Castro, T.B.R., Schirmer, B.G.A., Cisalpino, D., Martins, F.S., Rachid, M.A., Nicoli, J.R., Teixeira, M.M., and Barcelos, L.S. (2014). Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *193*, 5171–5180.

Cardoso, F. S., Castro, R.F., Borges, N., and Santos, H. (2007). Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in Propionibacterium freudenreichii and their role in stress response. Microbiology *153*, 270–280.

Carver, T., Harris, S.R., Berriman, M., Parkhill, J., and McQuillan, J.A. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. Bioinforma. Oxf. Engl. *28*, 464–469.

Cebrián, R., Arévalo, S., Rubiño, S., Arias-Santiago, S., Rojo, M.D., Montalbán-López, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., and Maqueda, M. (2018). Control of Propionibacterium acnes by natural antimicrobial substances: Role of the bacteriocin AS-48 and lysozyme. Sci. Rep. *8*, 1–11.

Chao, L., and Levin, B.R. (1981). Structured habitats and the evolution of anticompetitor toxins in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *78*, 6324–6328.

CHARFREITAG, O., COLLINS, M.D., and STACKEBRANDT, E. (1988). Reclassification of Arachnia propionica as Propionibacterium propionicus comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *38*, 354–357.

Chen, Y.E., and Tsao, H. (2013). The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. J. Am. Acad. Dermatol. *69*, 143–155.e3.

Chen, Y.E., Fischbach, M.A., and Belkaid, Y. (2018). Skin microbiota–host interactions. Nature *553*, 427–436.

Christensen, G.J.M., and Brüggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. Benef. Microbes *5*, 201–215.

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*.

Claverys, J.-P., and Håvarstein, L.S. (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. Nat. Rev. Microbiol. *5*, 219–229.

CMIT (2018). E. PILLY, Maladies Infectieuses et Tropicales (Alinéa Plus Ed).

Colliou, N., Ge, Y., Sahay, B., Gong, M., Zadeh, M., Owen, J.L., Neu, J., Farmerie, W.G., Alonzo, F., Liu, K., et al. (2017). Commensal *Propionibacterium* strain UF1 mitigates intestinal inflammation via Th17 cell regulation. J. Clin. Invest. *127*, 3970–3986.

Conlin, P.L., Chandler, J.R., and Kerr, B. (2014). Games of life and death: antibiotic resistance and production through the lens of evolutionary game theory. Curr. Opin. Microbiol. *21*, 35–44.

Cordero, O.X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., Le Roux, F., Mincer, T., and Polz, M.F. (2012). Ecological Populations of Bacteria Act as Socially Cohesive Units of Antibiotic Production and Resistance. Science *337*, 1228–1231.

Cornforth, D.M., and Foster, K.R. (2013). Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. Nat. Rev. Microbiol. *11*, 285–293.

Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., and Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science *326*, 1694–1697.

Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? Nat. Rev. Microbiol. *11*, 95–105.

Cousin, F.J., Mater, D.D., Foligne, B., and Jan, G. (2011). Dairy propionibacteria as human probiotics: a review of recent evidence. Dairy Sci. Technol. *91*, 1–26.

Cousin, F.J., Jouan-Lanhouet, S., Théret, N., Brenner, C., Jouan, E., Moigne-Muller, G.L., Dimanche-Boitrel, M.-T., and Jan, G. (2016). The probiotic Propionibacterium freudenreichii as a new adjuvant for TRAIL-based therapy in colorectal cancer. Oncotarget *7*, 7161–7178.

Cove, J.H., Holland, K.T., and Cunliffe, W.J. (1983). Effects of oxygen concentration on biomass production, maximum specific growth rate and extracellular enzyme production by three species of cutaneous propionibacteria grown in continuous culture. J. Gen. Microbiol. *129*, 3327–3334.

Csukás, Z., Banizs, B., and Rozgonyi, F. (2004). Studies on the cytotoxic effects of Propionibacterium acnes strains isolated from cornea. Microb. Pathog. *36*, 171–174.

Dalmasso, M., Nicolas, P., Falentin, H., Valence, F., Tanskanen, J., Jatila, H., Salusjärvi, T., and Thierry, A. (2011). Multilocus sequence typing of Propionibacterium freudenreichii. Int. J. Food Microbiol. *145*, 113–120.

Darwin, C. (1859). On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life (London: John Murray).

Davidsson, S., Mölling, P., Rider, J.R., Unemo, M., Karlsson, M.G., Carlsson, J., Andersson, S.-O., Elgh, F., Söderquist, B., and Andrén, O. (2016). Frequency and typing of Propionibacterium acnes in prostate tissue obtained from men with and without prostate cancer. Infect. Agent. Cancer *11*, 26.

Davies, J. (2013). Specialized microbial metabolites: functions and origins. J. Antibiot. (Tokyo) *66*, 361–364.

Degitz, K., Placzek, M., Borelli, C., and Plewig, G. (2007). Pathophysiology of acne. J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG *5*, 316–323.

Dekio, I., McDowell, A., Sakamoto, M., Tomida, S., and Ohkuma, M. (2019). Proposal of new combination, Cutibacterium acnes subsp. elongatum comb. nov., and emended descriptions of the genus Cutibacterium, Cutibacterium acnes subsp. acnes and Cutibacterium acnes subsp. defendens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *69*, 1087–1092.

Delcher, A.L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., and Salzberg, S.L. (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. Nucleic Acids Res. *27*, 4636–4641.

DeMuri, G.P., and Wald, E.R. (2014). The Group A Streptococcal Carrier State Reviewed: Still an Enigma. J. Pediatr. Infect. Dis. Soc. *3*, 336–342.

Deptula, P., Smolander, O.-P., Laine, P., Roberts, R.J., Edelmann, M., Peltola, P., Piironen, V., Paulin, L., Storgårds, E., Savijoki, K., et al. (2018). Acidipropionibacterium virtanenii sp. nov., isolated from malted barley. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *68*, 3175–3183.

Deutsch, S.M., Bivic, P.L., Herve, C., Madec, M.N., LaPointe, G., Jan, G., Loir, Y.L., and Falentin, H. (2010). Correlation of the Capsular Phenotype in Propionibacterium freudenreichii with the Level of Expression of gtf, a Unique Polysaccharide Synthase-Encoding Gene. Appl. Environ. Microbiol. *76*, 2740–2746.

Deutsch, S.-M., Parayre, S., Bouchoux, A., Guyomarc'h, F., Dewulf, J., Dols-Lafargue, M., Baglinière, F., Cousin, F.J., Falentin, H., Jan, G., et al. (2012). Contribution of Surface β-Glucan Polysaccharide to Physicochemical and Immunomodulatory Properties of Propionibacterium freudenreichii. Appl. Environ. Microbiol. *78*, 1765–1775.

Diggle, S.P. (2010). Microbial communication and virulence: lessons from evolutionary theory. Microbiology *156*, 3503–3512.

Douglas, H.C., and Gunter, S.E. (1946). The taxonomic position of Corynebacterium acnes. J. Bacteriol. *52*, 15–23.

Dowd, S.E., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeehan, T., Smith, E., and Rhoads, D. (2008). Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). PloS One *3*, e3326.

Downes, J., and Wade, W.G. (2009). Propionibacterium acidifaciens sp. nov., isolated from the human mouth. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *59*, 2778–2781.

Drott, J.B., Alexeyev, O., Bergström, P., Elgh, F., and Olsson, J. (2010). Propionibacterium acnes infection induces upregulation of inflammatory genes and cytokine secretion in prostate epithelial cells. BMC Microbiol. *10*, 126.

Eishi, Y. (2013). Etiologic link between sarcoidosis and Propionibacterium acnes. Respir. Investig. *51*, 56–68.

Falentin, H., Deutsch, S.-M., Jan, G., Loux, V., Thierry, A., Parayre, S., Maillard, M.-B., Dherbécourt, J., Cousin, F.J., Jardin, J., et al. (2010). The Complete Genome of Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA1T, a Hardy Actinobacterium with Food and Probiotic Applications. PLoS ONE *5*, e11748.

Faye, T., Langsrud, T., Nes, I.F., and Holo, H. (2000). Biochemical and genetic characterization of propionicin T1, a new bacteriocin from Propionibacterium thoenii. Appl. Environ. Microbiol. *66*, 4230–4236.

Faye, T., Brede, D.A., Langsrud, T., Nes, I.F., and Holo, H. (2002). An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from Propionibacterium jensenii. J. Bacteriol. *184*, 3649–3656.

Faye, T., Holo, H., Langsrud, T., Nes, I.F., and Brede, D.A. (2011). The unconventional antimicrobial peptides of the classical propionibacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. *89*, 549–554.

Fiedler, T., KÃ¶ller, T., and Kreikemeyer, B. (2015). Streptococcus pyogenes biofilmsâ€"formation, biology, and clinical relevance. Front. Cell. Infect. Microbiol. *5*.

Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C.L., and Knight, R. (2008). The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 17994–17999.

Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B.-H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfe, 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.

Foligné, B., Deutsch, S.-M., Breton, J., Cousin, F.J., Dewulf, J., Samson, M., Pot, B., and Jan, G. (2010). Promising Immunomodulatory Effects of Selected Strains of Dairy Propionibacteria as Evidenced In Vitro and In Vivo. Appl. Environ. Microbiol. *76*, 8259–8264.

Foligné, B., Breton, J., Mater, D., and Jan, G. (2013). Tracking the microbiome functionality: focus on Propionibacterium species. Gut *62*, 1227–1228.

Fontana, M.B.C., de Bastos, M. do C.F., and Brandelli, A. (2006). Bacteriocins Pep5 and epidermin inhibit Staphylococcus epidermidis adhesion to catheters. Curr. Microbiol. *52*, 350–353.

Foulongne, V., Sauvage, V., Hebert, C., Dereure, O., Cheval, J., Gouilh, M.A., Pariente, K., Segondy, M., Burguière, A., Manuguerra, J.-C., et al. (2012). Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. PloS One *7*, e38499.

Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., and Guinee, T.P. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Major Cheese Groups (Academic Press).

Frontier, S., and Pichod-Viale, D. (2004). Ecosystème : Structure, Fonctionnement, Evolution (Editions Dunod).

Fujimura, S., and Nakamura, T. (1978). Purification and Properties of a Bacteriocin-Like Substance (Acnecin) of Oral Propionibacterium acnes. Antimicrob. Agents Chemother. *14*, 893–898.

Gao, Z., Tseng, C., Pei, Z., and Blaser, M.J. (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 2927–2932.

Gardner, A., West, S.A., and Buckling, A. (2004). Bacteriocins, spite and virulence. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. *271*, 1529–1535.

Gastanaduy, A.S., Kaplan, E.L., Huwe, B.B., McKay, C., and Wannamaker, L.W. (1980). Failure of penicillin to eradicate group A streptococci during an outbreak of pharyngitis. Lancet Lond. Engl. *2*, 498–502.

Gilchrist, T.C. (1900). A bacteriological and microscopical study of over 300 vesicular and pustular lesions of the skin, with a research upon the etiology of acne vulgaris. Johns Hopkins Hosp. Rep. *9*, 409–430.

Goldstein, B.P., Wei, J., Greenberg, K., and Novick, R. (1998). Activity of nisin against Streptococcus pneumoniae, in vitro, and in a mouse infection model. J. Antimicrob. Chemother. *42*, 277–278.

Goodfellow, M., Whitman, W.B., and Bergey, D.H. (2012). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5, The Actinobacteria (New York, NY: Springer New York).

Goodfellow, M, Whitman,W. B., and Bergey, D. H. (2012). The Actinobacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (New York: Springer), p.

Grappin, R., Beuvier, É., Bouton, Y., and Pochet, S. (1999). Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-typecheeses. Le Lait *79*, 3–22.

Gribbon, E.M., Cunliffe, W.J., and Holland, K.T. (1993). Interaction of Propionibacterium acnes with skin lipids in vitro. J. Gen. Microbiol. *139*, 1745–1751.

Grice, E. (2014). The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. Semin. Cutan. Med. Surg. *33*, 98–103.

Grice, E.A., and Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. Nat. Rev. Microbiol. *9*, 244–253.

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.

Grice, E.A., Snitkin, E.S., Yockey, L.J., Bermudez, D.M., Liechty, K.W., Segre, J.A., Mullikin, J., Blakesley, R., Young, A., Chu, G., et al. (2010). Longitudinal shift in diabetic wound microbiota correlates with prolonged skin defense response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 14799–14804.

Grinstead, D.A., and Barefoot, S.F. (1992). Jenseniin G, a heat-stable bacteriocin produced by Propionibacterium jensenii P126. Appl. Environ. Microbiol. *58*, 215–220.

Gueniche, A., Knaudt, B., Schuck, E., Volz, T., Bastien, P., Martin, R., Röcken, M., Breton, L., and Biedermann, T. (2008). Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium Vitreoscilla filiformis lysate on atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. Br. J. Dermatol. *159*, 1357–1363.

Guéniche, A., Bastien, P., Ovigne, J.M., Kermici, M., Courchay, G., Chevalier, V., Breton, L., and Castiel-Higounenc, I. (2010). Bifidobacterium longum lysate, a new ingredient for reactive skin. Exp. Dermatol. *19*, e1-8.

Guerrero, R., Pedrós-Alió, C., Esteve, I., Mas, J., Chase, D., and Margulis, L. (1986). Predatory prokaryotes: Predation and primary consumption evolved in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 2138–2142.

Gwiazdowska, D., and Trojanowska, K. (2006). Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by Propionibacterium freudenreichii ssp. freudenreichii and ssp. shermanii. http://dx.doi.org/10.1051/lait:2006001 *86*.

Hajfarajollah, H., Mokhtarani, B., and Noghabi, K.A. (2014). Newly Antibacterial and Antiadhesive Lipopeptide Biosurfactant Secreted by a Probiotic Strain, Propionibacterium Freudenreichii. Appl. Biochem. Biotechnol. *174*, 2725–2740.

Hamilton, W.D. (1964). The genetical evolution of social behaviour. J. Theor. Biol. *7*, 1–16.

Hardin, G. (1960). The Competitive Exclusion Principle. Science *131*, 1292–1297.

Hayashi, T., Kitamura, Y., Funa, N., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2011). Fatty Acyl-AMP Ligase Involvement in the Production of Alkylresorcylic Acid by a Myxococcus xanthus Type III Polyketide Synthase. ChemBioChem *12*, 2166–2176.

van Heel, A.J., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2013). BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. Nucleic Acids Res. *41*, W448–W453.

Hegemann, J.D., Zimmermann, M., Xie, X., and Marahiel, M.A. (2015). Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products. Acc. Chem. Res. *48*, 1909–1919.

Hettinga, D.H., Vedamuthu, E.R., and Reinbold, G.W. (1968). Pouch method for isolating and enumerating Propionibacteria. J. Dairy Sci. *51*, 1707–1709.

Heunis, T.D.J., Smith, C., and Dicks, L.M.T. (2013). Evaluation of a Nisin-Eluting Nanofiber Scaffold To Treat Staphylococcus aureus-Induced Skin Infections in Mice. Antimicrob. Agents Chemother. *57*, 3928–3935.

Hojo, K., Yoda, N., Tsuchita, H., Ohtsu, T., Seki, K., Taketomo, N., Murayama, T., and Iino, H. (2002). Effect of Ingested Culture of Propionibacterium freudenreichii ET-3 on Fecal Microflora and Stool Frequency in Healthy Females. Biosci. Microflora *21*, 115–120.

Holo, H., Faye, T., Brede, D.A., Nilsen, T., Ødeg\a ard, I., Langsrud, T., Brendehaug, J., and Nes, I.F. (2002). Bacteriocins of propionic acid bacteria. Le Lait *82*, 59–68.

Holtsmark, I., Mantzilas, D., Eijsink, V.G.H., and Brurberg, M.B. (2006). Purification, characterization, and gene sequence of michiganin A, an actagardine-like lantibiotic produced by the tomato pathogen Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 5814–5821.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., and Huis in't Veld, J.H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. *41*, 85–101.

Huang, Y., Kotula, L., and Adams, M.C. (2003). The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, Propionibacterium jensenii 702, in a male Wistar rat model. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. *41*, 1781–1787.

Hur, G.H., Vickery, C.R., and Burkart, M.D. (2012). Explorations of Catalytic Domains in Non-Ribosomal Peptide Synthetase Enzymology. Nat. Prod. Rep. *29*, 1074–1098.

Jakobi, K., and Hertweck, C. (2004). A gene cluster encoding resistomycin biosynthesis in Streptomyces resistomycificus; exploring polyketide cyclization beyond linear and angucyclic patterns. J. Am. Chem. Soc. *126*, 2298–2299.

Jan, G., Leverrier, P., Pichereau, V., and Boyaval, P. (2001). Changes in Protein Synthesis and Morphology during Acid Adaptation of Propionibacterium freudenreichii. Appl. Environ. Microbiol. *67*, 2029–2036.

Jan, G., Belzacq, A.-S., Haouzi, D., Rouault, A., Métivier, D., Kroemer, G., and Brenner, C. (2002). Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. Cell Death Differ. *9*, 179.

Johnson, M.T.J., and Stinchcombe, J.R. (2007). An emerging synthesis between community ecology and evolutionary biology. Trends Ecol. Evol. *22*, 250–257.

Jugeau, S., Tenaud, I., Knol, A.C., Jarrousse, V., Quereux, G., Khammari, A., and Dreno, B. (2005). Induction of toll-like receptors by Propionibacterium acnes. Br. J. Dermatol. *153*, 1105–1113.

Keating, T.A., Ehmann, D.E., Kohli, R.M., Marshall, C.G., Trauger, J.W., and Walsh, C.T. (2001). Chain termination steps in nonribosomal peptide synthetase assembly lines: directed acyl-S-enzyme breakdown in antibiotic and siderophore biosynthesis. Chembiochem Eur. J. Chem. Biol. *2*, 99–107.

Kerr, B., Riley, M.A., Feldman, M.W., and Bohannan, B.J.M. (2002). Local dispersal promotes biodiversity in a real-life game of rock–paper–scissors. Nature *418*, 171–174.

Khosla, C., Herschlag, D., Cane, D.E., and Walsh, C.T. (2014). Assembly line polyketide synthases: mechanistic insights and unsolved problems. Biochemistry (Mosc.) *53*, 2875–2883.

Kligman, A.M., and Christensen, M.S. (2011). Demodex folliculorum: requirements for understanding its role in human skin disease. J. Invest. Dermatol. *131*, 8–10.

Ko, H.L., Pulverer, G., and Jeljaszewicz, J. (1978). Propionicins, bacteriocins produced by Propionibacterium avidum. Zentralblatt Für Bakteriol. Parasitenkd. Infekt. Hyg. Erste Abt. Orig. Reihe Med. Mikrobiol. Parasitol. *241*, 325–328.

Komaki, H., Ichikawa, N., Oguchi, A., Hamada, M., Tamura, T., and Fujita, N. (2015). Genome-based analysis of non-ribosomal peptide synthetase and type-I polyketide synthase gene clusters in all type strains of the genus Herbidospora. BMC Res. Notes *8*.

Koussémon, M., Combet-Blanc, Y., Patel, B.K., Cayol, J.L., Thomas, P., Garcia, J.L., and Ollivier, B. (2001). Propionibacterium microaerophilum sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *51*, 1373–1382.

Krutmann, J. (2009). Pre- and probiotics for human skin. J. Dermatol. Sci. *54*, 1–5.

Krzyściak, W., Pluskwa, K.K., Jurczak, A., and Kościelniak, D. (2013). The pathogenicity of the Streptococcus genus. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *32*, 1361–1376.

Kusano, K., Yamada, H., Niwa, M., and Yamasato, K. (1997). Propionibacterium cyclohexanicum sp. nov., a New Acid-Tolerant ω-Cyclohexyl Fatty Acid-Containing Propionibacterium Isolated from Spoiled Orange Juice. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *47*, 825–831.

Le Maréchal, C., Peton, V., Plé, C., Vroland, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Durant, G., Chuat, V., Loux, V., Foligné, B., et al. (2015). Surface proteins of Propionibacterium freudenreichii are involved in its anti-inflammatory properties. J. Proteomics *113*, 447–461.

Leisner, J.J., and Haaber, J. (2012). Intraguild predation provides a selection mechanism for bacterial antagonistic compounds. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. *279*, 4513–4521.

Leisner, J.J., Jørgensen, N.O.G., and Middelboe, M. (2016). Predation and selection for antibiotic resistance in natural environments. Evol. Appl. *9*, 427–434.

Leverrier, P., Dimova, D., Pichereau, V., Auffray, Y., Boyaval, P., and Jan, G. (2003). Susceptibility and Adaptive Response to Bile Salts in Propionibacterium freudenreichii: Physiological and Proteomic Analysis. Appl. Environ. Microbiol. *69*, 3809–3818.

Leverrier, P., Vissers, J.P.C., Rouault, A., Boyaval, P., and Jan, G. (2004). Mass spectrometry proteomic analysis of stress adaptation reveals both common and distinct response pathways in Propionibacterium freudenreichii. Arch. Microbiol. *181*, 215–230.

Li, M.H.T., Ung, P.M.U., Zajkowski, J., Garneau-Tsodikova, S., and Sherman, D.H. (2009). Automated genome mining for natural products. BMC Bioinformatics *10*, 185.

Liu, J., Yan, R., Zhong, Q., Ngo, S., Bangayan, N.J., Nguyen, L., Lui, T., Liu, M., Erfe, M.C., Craft, N., et al. (2015). The diversity and host interactions of Propionibacterium acnes bacteriophages on human skin. ISME J. *9*, 2078–2093.

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.

Loux, V., Mariadassou, M., Almeida, S., Chiapello, H., Hammani, A., Buratti, J., Gendrault, A., Barbe, V., Aury, J.-M., Deutsch, S.-M., et al. (2015). Mutations and genomic islands can explain the strain dependency of sugar utilization in 21 strains of Propionibacterium freudenreichii. BMC Genomics *16*, 296.

Lucena-Padrós, H., González, J.M., Caballero-Guerrero, B., Ruiz-Barba, J.L., and Maldonado-Barragán, A. (2014). Propionibacterium olivae sp. nov. and Propionibacterium damnosum sp. nov., isolated from spoiled packaged Spanish-style green olives. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *64*, 2980–2985.

Lyon, W.J., and Glatz, B.A. (1991). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by Propionibacterium thoenii. Appl. Environ. Microbiol. *57*, 701–706.

Ma, Y., Madupu, R., Karaoz, U., Nossa, C.W., Yang, L., Yooseph, S., Yachimski, P.S., Brodie, E.L., Nelson, K.E., and Pei, Z. (2014). Human papillomavirus community in healthy persons, defined by metagenomics analysis of human microbiome project shotgun sequencing data sets. J. Virol. *88*, 4786–4797.

Mak, T.N., Fischer, N., Laube, B., Brinkmann, V., Metruccio, M.M.E., Sfanos, K.S., Mollenkopf, H.-J., Meyer, T.F., and Brüggemann, H. (2012). Propionibacterium acnes host cell tropism contributes to vimentin-mediated invasion and induction of inflammation. Cell. Microbiol. *14*, 1720–1733.

Maqueda, M., Sánchez-Hidalgo, M., Fernández, M., Montalbán-López, M., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. (2008). Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Rev. *32*, 2–22.

Marahiel, M.A. (2016). A structural model for multimodular NRPS assembly lines. Nat Prod Rep *33*, 136–140.

Margulis, L., and Sagan, D. (2002). Le monde bactériel (Seuil).

McDowell, A. (2017). Over a Decade of recA and tly Gene Sequence Typing of the Skin Bacterium Propionibacterium acnes: What Have We Learnt? Microorganisms *6*.

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., Patrick, S., Eishi, Y., Lambert, P., and Eady, A. (2013). Propionibacterium acnes in human health and disease. BioMed Res. Int. *2013*, 493564.

Medema, M.H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J.B., Blin, K., de Bruijn, I., Chooi, Y.H., Claesen, J., Coates, R.C., et al. (2015). Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. Nat. Chem. Biol. *11*, 625–631.

Meijerink, M., van Hemert, S., Taverne, N., Wels, M., de Vos, P., Bron, P.A., Savelkoul, H.F., van Bilsen, J., Kleerebezem, M., and Wells, J.M. (2010). Identification of Genetic Loci in Lactobacillus

plantarum That Modulate the Immune Response of Dendritic Cells Using Comparative Genome Hybridization. PLoS ONE *5*, e10632.

Meile, L., Le Blay, G., and Thierry, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: Propionibacterium and Bifidobacterium. Int. J. Food Microbiol. *126*, 316–320.

Metelev, M., Tietz, J.I., Melby, J.O., Blair, P.M., Zhu, L., Livnat, I., Severinov, K., and Mitchell, D.A. (2015). Structure, bioactivity, and resistance mechanism of streptomonomicin, an unusual lasso peptide from an understudied halophilic actinomycete. Chem. Biol. *22*, 241–250.

Miescher, S., Stierli, M.P., Teuber, M., and Meile, L. (2000). Propionicin SM1, a bacteriocin from Propionibacterium jensenii DF1: isolation and characterization of the protein and its gene. Syst. Appl. Microbiol. *23*, 174–184.

Miller, D.A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T.A., and Walsh, C.T. (2002). Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of Yersinia pestis. Chem. Biol. *9*, 333–344.

Mogensen, G., Salminen, S., O'Biren, J., Holzapfel, W., Shortt, C., Fonden, R., Miller, G., Donohue, D., Playne, M., Crittenden, R., et al. (2002). Inventory of Microorganisms with a documented history of use in food.

Mohana, D.C., Thippeswamy, S., and Abhishek, R.U. (2013). Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from Micrococcus spp. Radiat. Prot. Environ. *36*, 168.

Morin, P.J. (2011). Front Matter. In Community Ecology, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. i–x.

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. *57*, 1425–1432.

Nair, D.V.T., and Kollanoor Johny, A. (2018). Characterizing the Antimicrobial Function of a Dairy-Originated Probiotic, Propionibacterium freudenreichii, Against Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serovar Heidelberg in Turkey Poults. Front. Microbiol. *9*.

Nikolouli, K., and Mossialos, D. (2012). Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. Biotechnol. Lett. *34*, 1393–1403.

Oelschlaeger, T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. Int. J. Med. Microbiol. IJMM *300*, 57–62.

Oh, J., Byrd, A.L., Deming, C., Conlan, S., NISC Comparative Sequencing Program, Kong, H.H., and Segre, J.A. (2014). Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. Nature *514*, 59–64.

Orla-Jensen, S. (1909). Die hauptlinien der natürlichen bakterienssystems. Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infekt. Hyg Abt 305–346.

O'Sullivan, J.N., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Hill, C., and Ross, R.P. (2019). Human skin microbiota is a rich source of bacteriocin-producing staphylococci that kill human pathogens. FEMS Microbiol. Ecol. *95*.

Otto, M. (2009). Staphylococcus epidermidis--the “accidental” pathogen. Nat. Rev. Microbiol. *7*, 555–567.

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annu. Rev. Med. *64*, 175–188.

Otto, M., Süssmuth, R., Vuong, C., Jung, G., and Götz, F. (1999). Inhibition of virulence factor expression in Staphylococcus aureus by the Staphylococcus epidermidis agr pheromone and derivatives. FEBS Lett. *450*, 257–262.

Otto, M., Echner, H., Voelter, W., and Götz, F. (2001). Pheromone cross-inhibition between Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Infect. Immun. *69*, 1957–1960.

Paszti-Gere, E., Szeker, K., Csibrik-Nemeth, E., Csizinszky, R., Marosi, A., Palocz, O., Farkas, O., and Galfi, P. (2012). Metabolites of Lactobacillus plantarum 2142 prevent oxidative stress-induced overexpression of proinflammatory cytokines in IPEC-J2 cell line. Inflammation *35*, 1487–1499.

Patel, A., Calfee, R.P., Plante, M., Fischer, S.A., and Green, A. (2009). Propionibacterium acnes colonization of the human shoulder. J. Shoulder Elbow Surg. *18*, 897–902.

Paul, G.E., and Booth, S.J. (1988). Properties and characteristics of a bacteriocin-like substance produced by Propionibacterium acnes isolated from dental plaque. Can. J. Microbiol. *34*, 1344–1347.

Peel, T.N., Cheng, A.C., Buising, K.L., and Choong, P.F.M. (2012). Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 2386–2391.

Peguet-Navarro, J., Dezutter-Dambuyant, C., Buetler, T., Leclaire, J., Smola, H., Blum, S., Bastien, P., Breton, L., and Gueniche, A. (2008). Supplementation with oral probiotic bacteria protects human cutaneous immune homeostasis after UV exposure-double blind, randomized, placebo controlled clinical trial. Eur. J. Dermatol. EJD *18*, 504–511.

Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F.J., and Muñoz-Dorado, J. (2016). Bacterial predation: 75 years and counting!: Bacterial predation. Environ. Microbiol. *18*, 766–779.

Perry, A., and Lambert, P. (2011). Propionibacterium acnes: infection beyond the skin. Expert Rev. Anti Infect. Ther. *9*, 1149–1156.

Piel, J. (2010). Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. Nat. Prod. Rep. *27*, 996–1047.

Poulin, R. (2007). Evolutionary Ecology of Parasites (Princeton University Press).

Rabah, H., do Carmo, F.L.R., and Jan, G. (2017). Dairy Propionibacteria: Versatile Probiotics. Microorganisms *5*.

Ratnam, P., Barefoot, S.F., Prince, L.D., Bodine, A.B., and McCaskill, L.H. (1999). Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by Propionibacterium jensenii B1264. Le Lait *79*, 125–136.

Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. *30*, 17–25.

Rello, J., Ochagavia, A., Sabanes, E., Roque, M., Mariscal, D., Reynaga, E., and Valles, J. (2000). Evaluation of outcome of intravenous catheter-related infections in critically ill patients. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *162*, 1027–1030.

Riley, M. (2009). Bacteriocins, biology, ecology, and evolution. Encycl. Microbiol. 32–44.

Riley, M.A., and Gordon, D.M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Trends Microbiol. *7*, 129–133.

Rosa-Fraile, M., Rodriguez-Granger, J., Haidour-Benamin, A., Cuerva, J.M., and Sampedro, A. (2006). Granadaene: Proposed Structure of the Group B Streptococcus Polyenic Pigment. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 6367–6370.

Russel, J., Røder, H.L., Madsen, J.S., Burmølle, M., and Sørensen, S.J. (2017). Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, 10684–10688.

Ryzhkova, E.P., Shamraichuk, I.L., Kurakov, A.V., and Netrusov, A.I. (2017). Production of antimicrobial polypeptides by Propionibacterium freudenreichii RVS-4-irf. Microbiology *86*, 170–175.

S Fredrickson (1977). Behavior of mixed cultures of microorganisms. Annu. Rev. Microbiol. *31*, 63–87.

Sanford, J.A., and Gallo, R.L. (2013). Functions of the skin microbiota in health and disease. Semin. Immunol. *25*, 370–377.

Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. Nat. Protoc. *1*, 16–22.

Scheithauer, S., Bürgel, U., Ryang, Y.-M., Haase, G., Schiefer, J., Koch, S., Häfner, H., and Lemmen, S. (2009). Prospective surveillance of drain associated meningitis/ventriculitis in a neurosurgery and neurological intensive care unit. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *80*, 1381–1385.

Schillinger, U., and Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. *55*, 1901–1906.

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 Acidipropionibacterium gen. nov., Cutibacterium gen. nov. and Pseudopropionibacterium gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *66*, 4422–4432.

Scholz, C.F.P., Brüggemann, H., Lomholt, H.B., Tettelin, H., and Kilian, M. (2016). Genome stability of Propionibacterium acnes: a comprehensive study of indels and homopolymeric tracts. Sci. Rep. *6*.

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinforma. Oxf. Engl. *30*, 2068–2069.

Shin, J.M., Gwak, J.W., Kamarajan, P., Fenno, J.C., Rickard, A.H., and Kapila, Y.L. (2016). Biomedical applications of nisin. J. Appl. Microbiol. *120*, 1449–1465.

Shinohara, D.B., Vaghasia, A.M., Yu, S.-H., Mak, T.N., Brüggemann, H., Nelson, W.G., De Marzo, A.M., Yegnasubramanian, S., and Sfanos, K.S. (2013). A mouse model of chronic prostatic inflammation using a human prostate cancer-derived isolate of Propionibacterium acnes. The Prostate *73*, 1007–1015.

Singer, A.J., and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. N. Engl. J. Med. *341*, 738–746.

Skinnider, M.A., Dejong, C.A., Rees, P.N., Johnston, C.W., Li, H., Webster, A.L.H., Wyatt, M.A., and Magarvey, N.A. (2015). Genomes to natural products PRediction Informatics for Secondary Metabolomes (PRISM). Nucleic Acids Res. *43*, 9645–9662.

Song, S.J., Lauber, C., Costello, E.K., Lozupone, C.A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Knights, D., Clemente, J.C., Nakielny, S., et al. (2013). Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. eLife *2*, e00458.

Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V., and Marahiel, M.A. (1998). Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. J. Biol. Chem. *273*, 22773–22781.

Stackebrandt, E., Schumann, P., Schaal, K.P., and Weiss, N. (2002). Propionimicrobium gen. nov., a new genus to accommodate Propionibacterium lymphophilum (Torrey 1916) Johnson and Cummins 1972, 1057AL as Propionimicrobium lymphophilum comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. *52*, 1925–1927.

Starcevic, A., Zucko, J., Simunkovic, J., Long, P.F., Cullum, J., and Hranueli, D. (2008). ClustScan: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and in silico prediction of novel chemical structures. Nucleic Acids Res. *36*, 6882–6892.

Staunton, J., and Weissman, K.J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. Nat. Prod. Rep. *18*, 380–416.

Strieker, M., Tanović, A., and Marahiel, M.A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. Curr. Opin. Struct. Biol. *20*, 234–240.

Sumida, T., Dubiley, S., Wilcox, B., Severinov, K., and Tagami, S. (2019). Structural Basis of Leader Peptide Recognition in Lasso Peptide Biosynthesis Pathway. ACS Chem. Biol. *14*, 1619–1627.

Susanne Miescher (1999). Antimicrobial and Autolytic Systems of Dairy Propionibacteria.

Tagg, J.R. (2004). Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-Streptococcus pyogenes bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by Streptococcus salivarius. Indian J. Med. Res. *119 Suppl*, 13–16.

Taylor, P.J. (1988). The construction and turnover of complex community models having Generalized Lotka-Volterra dynamics. J. Theor. Biol. *135*, 569–588.

Thierry, A., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Dalmasso, M., Cousin, F.J., and Jan, G. (2011). New insights into physiology and metabolism of Propionibacterium freudenreichii. Int. J. Food Microbiol. *149*, 19–27.

Tietz, J.I., Schwalen, C.J., Patel, P.S., Maxson, T., Blair, P.M., Tai, H.-C., Zakai, U.I., and Mitchell, D.A. (2017). A new genome-mining tool redefines the lasso peptide biosynthetic landscape. Nat. Chem. Biol.

Tokeshi, M. (1999). Species coexistence: ecological and evolutionary perspectives (England: Cambridge University Press).

Tomic-Canic, M., Perez-Perez, G.I., and Blumenberg, M. (2014). Cutaneous microbiome studies in the times of affordable sequencing. J. Dermatol. Sci. *75*, 82–87.

Tomida, S., Nguyen, L., Chiu, B.-H., Liu, J., Sodergren, E., Weinstock, G.M., and Li, H. (2013). Pan-Genome and Comparative Genome Analyses of Propionibacterium acnes Reveal Its Genomic Diversity in the Healthy and Diseased Human Skin Microbiome. mBio *4*.

Valdés-Stauber, N., and Scherer, S. (1994). Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by Brevibacterium linens. Appl. Environ. Microbiol. *60*, 3809–3814.

Vallenet, D., Calteau, A., Cruveiller, S., Gachet, M., Lajus, A., Josso, A., Mercier, J., Renaux, A., Rollin, J., Rouy, Z., et al. (2017). MicroScope in 2017: an expanding and evolving integrated resource for community expertise of microbial genomes. Nucleic Acids Res. *45*, D517–D528.

Van der Merwe, I.R., Bauer, R., Britz, T.J., and Dicks, L.M.T. (2004). Characterization of thoeniicin 447, a bacteriocin isolated from Propionibacterium thoenii strain 447. Int. J. Food Microbiol. *92*, 153–160.

Vanberg, C., Lutnaes, B.F., Langsrud, T., Nes, I.F., and Holo, H. (2007). Propionibacterium jensenii Produces the Polyene Pigment Granadaene and Has Hemolytic Properties Similar to Those of Streptococcus agalactiae. Appl. Environ. Microbiol. *73*, 5501–5506.

Vetsigian, K., Jajoo, R., and Kishony, R. (2011). Structure and Evolution of Streptomyces Interaction Networks in Soil and In Silico. PLoS Biol. *9*, e1001184.

Vornhagen, J., Adams Waldorf, K.M., and Rajagopal, L. (2017). Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies. Trends Microbiol. *25*, 919–931.

Warren, D.K., Quadir, W.W., Hollenbeak, C.S., Elward, A.M., Cox, M.J., and Fraser, V.J. (2006). Attributable cost of catheter-associated bloodstream infections among intensive care patients in a nonteaching hospital. Crit. Care Med. *34*, 2084–2089.

Weber, T., and Kim, H.U. (2016). The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate synthetic biology of secondary metabolite production. Synth. Syst. Biotechnol. *1*, 69–79.

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H.U., Bruccoleri, R., Lee, S.Y., Fischbach, M.A., Müller, R., Wohlleben, W., et al. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. Nucleic Acids Res. *43*, W237–W243.

West, S.A., and Gardner, A. (2010). Altruism, spite, and greenbeards. Science *327*, 1341–1344.

West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A., and Diggle, S.P. (2006). Social evolution theory for microorganisms. Nat. Rev. Microbiol. *4*, 597–607.

West, S.A., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A., and Griffin, A.S. (2007). The Social Lives of Microbes. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. *38*, 53–77.

Whittaker, R.H., Levin, S.A., and Root, R.B. (1973). Niche, Habitat, and Ecotope. Am. Nat. *107*, 321–338.

Williams, H.C., Dellavalle, R.P., and Garner, S. (2012). Acne vulgaris. The Lancet *379*, 361–372.

Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., and Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from Bacillus amyloliquefaciens FZB42 have antibacterial activity against Xanthomonas oryzae rice pathogens. Sci. Rep. *5*.

Wylie, K.M., Mihindukulasuriya, K.A., Zhou, Y., Sodergren, E., Storch, G.A., and Weinstock, G.M. (2014). Metagenomic analysis of double-stranded DNA viruses in healthy adults. BMC Biol. *12*, 71.

Xu, L., Farthing, A.K., Dropinski, J.F., Meinke, P.T., McCallum, C., Leavitt, P.S., Hickey, E.J., Colwell, L., Barrett, J., and Liu, K. (2009). Nocathiacin analogs: Synthesis and antibacterial activity of novel water-soluble amides. Bioorg. Med. Chem. Lett. *19*, 3531–3535.

Yu JL, Mansson R, Flock JI, and Ljungh A (1997). Fibronectin binding by Propionibacterium acnes. FEMS Immunol Med Microbiol *19*, 247–253.

Zhang, Q., Yu, Y., Vélasquez, J.E., and van der Donk, W.A. (2012). Evolution of lanthipeptide synthetases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 18361–18366.

Ziemert, N., Podell, S., Penn, K., Badger, J.H., Allen, E., and Jensen, P.R. (2012). The Natural Product Domain Seeker NaPDoS: A Phylogeny Based Bioinformatic Tool to Classify Secondary Metabolite Gene Diversity. PLoS ONE *7*.

Zimmermann, P., and Curtis, N. (2019). The role of Cutibacterium acnes in auto-inflammatory bone disorders. Eur. J. Pediatr. *178*, 89–95.

Annexes

Annexe 1.1 – 1 Souches de propionibactéries laitières utilisées pour le criblage

Code	N° CIRM-BIA	Genre	Espece	Biotope d'isolement	Pays d'origine	Date d'isolement
dPAB A1	**1384**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	NR	NR	NR
dPAB A2	**64**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	NR	USA	1932
dPAB A3	**609**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	Emmental	USA	<1993
dPAB A4	**1762**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	NR	NR	NR
dPAB A5	**1763**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	Foin Le Rheu	France	1995
dPAB A6	**1764**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	Litiere fond etable, Le Rheu	France	1995
dPAB A7	**1765**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	Eau Station epuration Cesson	France	1996
dPAB A8	**1766**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	Eau Station epuration Cesson	France	1996
dPAB A9	**1767**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	Eau station lagunage Anjou	France	1996
dPAB A10	**1664**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	NR	NR	NR
dPAB A11	**1427**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	Fromage Tilsitt	Suisse	1992
dPAB A12	**1768**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	Eau station lagunage Anjou	France	1996
dPAB B1	**1424**	***Propionibacterium***	**acidipropionici**	gruyère	France	1973
dPAB B2	**698**	***Propionibacterium***	**cyclohexanicum**	Jus d'orange de flaveur defectueuse	Japan	1997
dPAB B3	**121**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Fromage Suisse	USA	1993
dPAB B4	**1346**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Fromage Suisse	USA	1943
dPAB B5	**117**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	NR	France	1973
dPAB B6	**1771**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	NR	NR	NR
dPAB B7	**1865**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Selles humaines	France	1999
dPAB B8	**1470**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Fromage breton petits trous pate pressee	France	1992
dPAB B9	**1471**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Minifromage lait microfiltre	France	1993
dPAB B10	**1472**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Lait cru	France	1994
dPAB B11	**1473**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Lait cru	France	1994
dPAB B12	**1477**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Fromage Cantal	France	1994
dPAB C1	**1**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	NR	Pays-Bas	1993
dPAB C2	**6**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Beaufort 18 mois	France	1992
dPAB C3	**7**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Lait cru Poligny	France	1994
dPAB C4	**41**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Comte Poligny	France	1973
dPAB C5	**118**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Gruyère	France	1992
dPAB C6	**141**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Ble	France	1996
dPAB C7	**514**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Foin	France	1994
dPAB C8	**515**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Paille coupee	France	1996
dPAB C9	**510**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Beaufort 18 mois	France	1992
dPAB C10	**527**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Fromage Fribourg	Suisse	1992
dPAB C11	**688**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Lait cru	France	1973
dPAB C12	**509**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Gruyere	France	1994
dPAB D1	**1412**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Tomme Agen	France	1994
dPAB D2	**692**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Morbier lait cru	France	1994
dPAB D3	**132**	***Propionibacterium***	***freudenreichii***	Fromage americain MG churny lite	USA	1973
dPAB D4	**39**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Babeurre	Pays-Bas	NR
dPAB D5	**1773**	***Propionibacterium***	**jensenii**	NR	Pologne	1957
dPAB D6	**1774**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru (Poligny)	France	1994
dPAB D7	**1775**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru	France	1994
dPAB D8	**1776**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru (Beaufort)	France	1994

dPAB D9	**1777**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru Aurillac	France	1994
dPAB D10	**1778**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Appenzell cheese	Suisse	1992
dPAB D11	**1779**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru	France	1993
dPAB D12	**1781**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Raclette lait cru	France	1994
dPAB E1	**1782**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru	France	1993
dPAB E2	**1783**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru	France	1993
dPAB E3	**1784**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru Mayenne	France	1993
dPAB E4	**1785**	***Propionibacterium***	**jensenii**	Lait cru Bretagne	France	1994
dPAB E5	**677**	***Propionibacterium***	**microaerophilum**	Réservoir eaux usees moulin a huile	France	2002
dPAB E6	**1329**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Emmental	USA	1940
dPAB E7	**1787**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Emmental	USA	1940
dPAB E8	**1788**	***Propionibacterium***	**thoenii**	NR	Pologne	1957
dPAB E9	**1789**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Gruyère	France	1973
dPAB E10	**1502**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Eau station lagunage Anjou	France	1996
dPAB E11	**1504**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Eau station lagunage Anjou	France	1996
dPAB E12	**1790**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Crottin cheval	France	1996
dPAB F1	**1791**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Eau station lagunage Anjou	France	1996
dPAB F2	**1792**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Appenzell cheese	Suisse	1992
dPAB F3	**1433**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Gruyère cheese	France	1973
dPAB F4	**1793**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Gruyère crèmerie	Suisse	1992
dPAB F5	**1500**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Eau station lagunage Anjou	France	1996
dPAB F6	**1503**	***Propionibacterium***	**thoenii**	Eau station lagunage Anjou	France	1996

Annexe 1.1 – 2 Souches de propionibactéries cutanées utilisées pour le criblage

Code	N° LBN	Espèce	Prélèvement d'origine	N° de dossier
cPAB A1	658	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1320175461
cPAB A2	659	*Propionibacterium acnes*	Liquide péricardique	1320016867
cPAB A3	660	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1320240801
cPAB A4	661	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1320241219
cPAB A5	662	*Propionibacterium acnes*	pancréas receveur d'organes	1320245933
cPAB A6	663	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1318268844
cPAB A7	664	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422802453
cPAB A8	665	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422610001
cPAB A9	666	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1422712506
cPAB A10	667	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo-rachidien	1422507372
cPAB A11	668	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422610467
cPAB A12	669	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422507412
cPAB B1	670	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1422789356
cPAB B2	671	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422611409
cPAB B3	672	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422507534
cPAB B4	673	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1422717075
cPAB B5	674	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422611721
cPAB B6	675	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1423018137
cPAB B7	676	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1423018225
cPAB B8	677	*Propionibacterium acnes*	Cardio-vasculaire	1423018261
cPAB B9	678	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1423017969
cPAB B10	679	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement intra pleural	1422799754
cPAB B11	680	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1423024045
cPAB B12	681	*Propionibacterium acnes*	sang placentaire	1422729131
cPAB C1	682	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1424110882
cPAB C2	683	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1423024735
cPAB C4	685	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1423024613
cPAB C5	686	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement peau, tissus, muscles	1423024401
cPAB C6	687	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1423024797
cPAB C7	688	*Propionibacterium acnes*	Collection	1423024531
cPAB C8	689	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1424101451
cPAB C9	690	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo-rachidien	1424101679
cPAB C10	691	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1422738456
cPAB C11	692	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1424102179
cPAB C12	693	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1424306267
cPAB D1	694	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1424230475
cPAB D2	695	*Propionibacterium acnes*	Abcès cerveau	1424102095
cPAB D3	696	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1320354965
cPAB D4	697	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture périphérique	1318272130
cPAB D5	698	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo rachidien	1320418849
cPAB D6	699	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1320355823
cPAB D7	700	*Propionibacterium acnes*	Liquide pleural	1422853381
cPAB D8	701	*Propionibacterium acnes*	Empyème	1424228747
cPAB D9	702	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1424312560
cPAB D10	703	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1524314072
cPAB D11	704	*Propionibacterium acnes*	Dérivation externe	1524240536
cPAB D12	705	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524251379
cPAB E1	706	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1424408043
cPAB E2	707	*Propionibacterium acnes*	Liquide pleural	1524231551

cPAB E3	708	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524231697
cPAB E5	710	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1524235269
cPAB E6	711	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524231929
cPAB E7	712	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1524231963
cPAB E8	713	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement peau, tissus, muscles	1524235425
cPAB E9	714	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524231917
cPAB E10	715	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524235565
cPAB E11	716	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo-rachidien	1524252761
cPAB E12	717	*Propionibacterium acnes*	Cellules Souches	1524318870
cPAB F1	718	*Propionibacterium acnes*	Cellules Souches	1524319393
cPAB F2	719	*Propionibacterium acnes*	Liquide d'ascite	1524319724
cPAB F3	720	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524236309
cPAB F4	721	*Propionibacterium acnes*	Empyème cérébral	1524236685
cPAB F5	722	*Propionibacterium acnes*	biopsie système nerveux	1524547443
cPAB F6	723	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement cardio vasculaire	1524410125
cPAB F7	724	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1524452772
cPAB F9	726	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement peau, tissus, muscles	1524548321
cPAB F11	728	*Propionibacterium acnes*	liquide conservation	1524410548
cPAB F12	729	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524548383
cPAB G1	730	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement peau, tissus, muscles	1524548369
cPAB G3	732	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524548515
cPAB G4	733	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524548681
cPAB G5	734	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo-rachidien	1524555403
cPAB G6	735	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture périphérique	1320029658
cPAB G7	736	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1320496851
cPAB G8	737	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1320497743
cPAB G9	738	*Propionibacterium acnes*	Hématome	1320497421
cPAB G10	739	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1320490401
cPAB G11	740	*Propionibacterium acnes*	Cellules souches, au prélèvement	1320034334
cPAB G12	741	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1320490489
cPAB H1	742	*Propionibacterium acnes*	Liquide articulaire/synovial	1320498345
cPAB H2	743	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1320490961
cPAB H3	744	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1320568227
cPAB H4	745	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1320491907
cPAB H5	746	*Propionibacterium acnes*	Biopsie	1320489393
cPAB H6	747	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1320636003
cPAB H7	748	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1320045238
cPAB H8	749	*Propionibacterium acnes*	Collection	1320489569
cPAB H9	750	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1320637103
cPAB H10	751	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture périphérique	1320048628
cPAB H11	752	*Propionibacterium acnes*	Liquide articulaire/synovial	1320637419
cPAB H12	753	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1320833263
cPAB 1-A1	754	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1320052613
cPAB 1-A2	755	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1320834075
cPAB 1-A3	756	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture périphérique	1320828306
cPAB 1-A4	757	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture sur KT	1320055236
cPAB 1-A5	758	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1420923016
cPAB 1-A6	759	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1420926347
cPAB 1-A7	760	*Propionibacterium acnes*	Sternum	1420923543
cPAB 1-A8	761	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1420928683
cPAB 1-A9	762	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1420927077
cPAB 1-A10	763	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture périphérique	1420479559

cPAB 1-A11	764	*Propionibacterium acnes*	Biopsie ostéo-articulaire	1422313845
cPAB 1-A12	765	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture périphérique	1420480420
cPAB 1-B1	766	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1420633711
cPAB 1-B2	767	*Propionibacterium acnes*	Empyème	1422313861
cPAB 1-B4	769	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1422387221
cPAB 1-B5	770	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo rachidien	1422468807
cPAB 1-B6	771	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1422255109
cPAB 1-B7	772	*Propionibacterium acnes*	Cellules souches	1422644959
cPAB 1-B8	773	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture sur cathéter	1422645743
cPAB 1-B9	774	*Propionibacterium acnes*	Liquide articulaire	1422469019
cPAB 1-B10	775	*Propionibacterium acnes*	Liquide articulaire	1422469436
cPAB 1-B11	776	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo rachidien	1422477763
cPAB 1-B12	777	*Propionibacterium acnes*	Liquide péritonéal	1422478113
cPAB 1-C1	778	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de pus	1422478899
cPAB 1-C2	779	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422475523
cPAB 1-C3	780	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo rachidien	1422478889
cPAB 1-C4	781	*Propionibacterium acnes*	Biopsie système nerveux	1422479079
cPAB 1-C5	782	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo rachidien	1422512927
cPAB 1-C6	783	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422479159
cPAB 1-C7	784	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422513029
cPAB 1-C8	785	*Propionibacterium acnes*	Liquide collection	1422512973
cPAB 1-C9	786	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422513425
cPAB 1-C10	787	*Propionibacterium acnes*	Spondylodiscite	1422596691
cPAB 1-C11	788	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1422514039
cPAB 1-C12	789	*Propionibacterium acnes*	Liquide céphalo rachidien	1422608984
cPAB 1-D1	790	*Propionibacterium acnes*	Liquide de conservation rein	1420634399
cPAB 1-D2	791	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422609421
cPAB 1-D3	792	*Propionibacterium acnes*	Sternum	1422597007
cPAB 1-D4	793	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422609425
cPAB 1-D5	794	*Propionibacterium acnes*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1422609665
cPAB 1-D6	795	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture sur KT	1319932501
cPAB 1-D7	796	*Propionibacterium acnes*	Hémoculture	1318252595
cPAB 1-D8	797	*Propionibacterium avidum*	Prélèvement ostéo-articulaire	1423018189
cPAB 1-D9	798	*Propionibacterium avidum*	Prélèvement ostéo-articulaire	1423016827
cPAB 1-D10	799	*Propionibacterium avidum*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1424227707
cPAB 1-D11	800	*Propionibacterium avidum*	Hémoculture	1420474554
cPAB 1-D12	801	*Propionibacterium granulosum*	liquide conservation rein	1423020473
cPAB 1-E1	802	*Propionibacterium granulosum*	Liquide péritonéal	1422506840
cPAB 1-E2	803	*Propionibacterium propionicum*	Prélèvement ostéo-articulaire	1422611467
cPAB 1-E3	804	*Propionibacterium propionicum*	Produit d'amputation	1423017219
cPAB 1-E4	805	*Propionibacterium propionicum*	Prélèvement de peau, tissus mous, muscle	1524231569
cPAB 1-E5	806	*Propionibacterium propionicum*	Prélèvement ostéo-articulaire	1524547247

Annexe 1.1 – 3 Souches cibles laitières utilisées dans le criblage et conditions de culture

Code	N° collection	Genre	espèce	sousespèce	Milieu *	T° de croissance	Atmosphère
11	CIP76116	*Enterococcus*	*faecalis*		Elliker	37 °C	Air ambiant
13	LMA63	*Enterococcus*	*faecium*		Elliker	37 °C	Air ambiant
43	CIP55.125T	*Enterococcus*	*durans*		Elliker	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 860	CIRM-BIA 860	*Lactobacillus*	*delbrueckii*	*bulagaricus*	MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 879	CIRM-BIA 879	*Lactobacillus*	*delbrueckii*	*bulagaricus*	MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 1381	CIRM-BIA 1381	*Lactobacillus*	*delbrueckii*	*bulagaricus*	MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 1588	CIRM-BIA 1588	*Lactobacillus*	*delbrueckii*	*bulagaricus*	MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 1872	CIRM-BIA 1872	*Lactobacillus*	*delbrueckii*	*bulagaricus*	MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 103	CIRM-BIA 103	*Lactobacillus*	*helveticus*		MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 108	CIRM-BIA 108	*Lactobacillus*	*helveticus*		MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 109	CIRM-BIA 109	*Lactobacillus*	*helveticus*		MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 110	CIRM-BIA 110	*Lactobacillus*	*helveticus*		MRS	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 112	CIRM-BIA 112	*Lactobacillus*	*helveticus*		MRS	37 °C	Air ambiant
5	DSM20011T	*Lactobacillus*	*casei*	*casei*	MRS	30 °C	Air ambiant
7	DSM20074T	*Lactobacillus*	*delbrueckii*	*delbrueckii*	MRS	37 °C	Air ambiant
1	DSM20073T	*Lactobacillus*	*delbrueckii*		MRS	37 °C	Air ambiant
21	DSM20052T	*Lactobacillus*	*fermentum*		MRS	30 °C	Air ambiant
35	DSM20075T	*Lactobacillus*	*helveticus*		MRS	37 °C	Air ambiant
85	DSM20081	*Lactobacillus*	*delbrueckii bulgaricus*	*bulgaricus*	MRS	37 °C	Air ambiant
163		*Lactobacillus*	*rhamnosus*		MRS	44 °C	Air ambiant
1	DSM20017T	*Lactobacillus*	*sakei*	*sakei*	MRS	30 °C	Air ambiant
3	DSM20079T	*Lactobacillus*	*acidophilus*		MRS	37 °C	Air ambiant
29	DSM20174	*Lactobacillus*	*plantarum*		MRS	37 °C	Air ambiant
37	DSM20019T	*Lactobacillus*	*curvatus*	*curvatus*	MRS	37 °C	Air ambiant
89	HOLDBAC	*Lactobacillus*	*plantarum*		MRS	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 88	CIRM-BIA 88	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 241	CIRM-BIA 241	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 639	CIRM-BIA 639	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 644	CIRM-BIA 644	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 646	CIRM-BIA 646	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 47	CIRM-BIA 47	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis biovar diacetylactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 635	CIRM-BIA 635	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis biovar diacetylactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 862	CIRM-BIA 862	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis biovar diacetylactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 1204	CIRM-BIA 1204	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis biovar diacetylactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 1569	CIRM-BIA 1569	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis biovar diacetylactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
73	CIP7056T	*Lactococcus*	*lactis*	*lactis*	Elliker	30 °C	Air ambiant
83	MG1363	*Lactococcus*	*lactis*	*cremoris*	Elliker	30 °C	Air ambiant
241	NZ9000	*Lactococcus*	*lactis*		Elliker	30 °C	Air ambiant
81	DSM20483	*Leuconostoc*	*mesenteroides*	*dextranicum*	MRS	30 °C	Air ambiant
64	CIP12510	*Listeria*	*ivanovii*		TSB/YE	30 °C	Air ambiant
57	CIP12511	*Listeria*	*innocua*		TSB/YE	30 °C	Air ambiant

17	CIP7831	*Listeria*	*monocytogenes*		TSB/YE	37 °C	Air ambiant
251		*Micrococcus*	*flavus*		TSB/YE	37 °C	Air ambiant
173	CIP677	*Staphylococcus*	*aureus*		TSB/YE	37 °C	Air ambiant
39	INRA302	*Streptococcus*	*thermophilus*		Elliker	37 °C	Air ambiant
41	DSM20617	*Streptococcus*	*thermophilus*		Elliker	37 °C	Air ambiant
364	LMG18311	*Streptococcus*	*thermophilus*		Elliker	37 °C	Air ambiant
87	CNRZ368	*Streptococcus*	*thermophilus*		Elliker	42 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 1035	CIRM-BIA 1035	*Streptococcus*	*thermophilus*		Elliker	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 26	CIRM-BIA 26	*Streptococcus*	*thermophilus*		Elliker	37 °C	Air ambiant
CIRM-BIA 1860	CIRM-BIA 1860	*Streptococcus*	*thermophilus*		Elliker	37 °C	Air ambiant

Annexe 1.1 – 4 Souches cibles cliniques utilisées dans le criblage et conditions de culture

N° LBN	Espèce*	Prélèvement	N° dossier	Milieu**	Température	Atmosphère
600	*Acinetobacter baumanii*	pulpe 2ème orteil pied D	1525008379	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
612	*Bacillus du groupe cereus*	hémoculture périphérique		TSB/YE	37 °C	Air ambiant
636	*Bacteroides caccae*	plaie jambe	1525023878	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
633	*Bacteroides fragilis*	drain pleural	1527433631	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
637	*Bacteroides ovatus*	abcès abdominal	1525009743	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
634	*Bacteroides thetaiotaomicron*	abcès Douglas	1525009291	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
635	*Bacteroides vulgatus*	os 4ème orteil pied G	1525009335	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
632	*Clostridium perfringens*	fausse membrane	1528008619	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
641	*Clostridium ramosum*	abcès abdominal	1527432883	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
626	*Corynebacterium amycolatum*	os ischion	1527433959	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
625	*Corynebacterium tuberculostearicum*	KT ECMO	1525126263	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
627	*Dermabacter hominis*	os	1525009549	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
645	*Enterococcus faecalis*	cholecystite	1525098899	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
604	*Enterococcus faecium*	abcès pelvien	1525008621	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
608	*Escherichia coli*	selles quantitatives	1525022903	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
628	*Finegoldia magna*	os escarre	1525023301	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
639	*Fusobacterium nucleatum*	vésicule biliaire	1525023399	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
602	*Klebsiella pneumoniae*	selles quantitatives	1525008585	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
642	*Mycobacterium abscessus*			TSB/YE	37 °C	Air ambiant
643	*Mycobacterium chelonae*			TSB/YE	37 °C	Air ambiant
644	*Mycobacterium fortuitum*			TSB/YE	37 °C	Air ambiant
638	*Parvimonas micra*	abcès	1525009375	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
631	*Peptoniphilus asaccharolyticus*	os hallux	1525008693	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
630	*Prevotella denticola*	abcès cervical	1525097407	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
629	*Prevotella intermedia*	os hanche	1525008551	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose
613	*Proteus mirabilis*	escarre		TSB/YE	37 °C	Air ambiant
601	*Pseudomonas aeruginosa*	crachat	1525008483	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
605	*Staphylococcus aureus*	liquide articulaire	1525008733	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
621	*Staphylococcus auricularis*	hémoculture	1524449202	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
617	*Staphylococcus capitis MS*	hémoculture endocardite	1524497549	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
619	*Staphylococcus caprae MS*	os (phalange)	1525125517	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
623	*Staphylococcus cohnii MS*	hémoculture	1524319160	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
607	*Staphylococcus epidermidis*	abcès de cornée	1525022859	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
618	*Staphylococcus equorum MS*	KT ECMO	1525124935	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
611	*Staphylococcus haemolyticus*	escarre	1525100075	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
615	*Staphylococcus hominis MR*	hémoculture périphérique	1525100081	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
609	*Staphylococcus lugdunensis*	os pied	1525022927	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
616	*Staphylococcus pasteuri MS*	hémoculture endocardite	1524478618	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
620	*Staphylococcus pseudintermedius MS*	KT artériel	1524408559	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
622	*Staphylococcus saprophyticus*	arthrite	1524410463	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
606	*Staphylococcus schleiferi*	plaie sternum	1525008951	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
624	*Staphylococcus warneri*	os fémur	1527433009	TSB/YE	37 °C	Air ambiant
614	*Streptococcus pyogenes*	hémoculture	1524496722	M17	37 °C	Anaérobiose
640	*Veilonella parvula*	abcès fosse iliaque	1525000925	TSB/YE	37 °C	Anaérobiose

*MS pour méticillino-sensible et MR pour méticillino-résistant

** Milieux préparés selon les recommandations des fabricants : TSB/YE (Biokar), M17 (Biokar)

Annexe 1.2 – 1 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de *C. acnes*

Souche	SLST	Clade	CC	PKS	NRPS	Terpene/ arylpolyene	Lanthipeptide class II	LAP	Thiopeptide	Bactériocine non modifiée	Nombre total de clusters	N° d'accession	N° d'acession de séquence supplémentaire	Taille (Mb)	GC %	Scaffolds	Niveau d'assemblage
Cutibacterium acnes 266	A1	IA1	CC18		1					1	2	CP002409.1		2.49	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes ATCC 11828	K9	II	CC53		1					1	2	CP003084.1		2.49	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes 6609	H1	IB	CC36		1				1	1	3	CP002815.1		2.56	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes C1	A5	IA1	Singleton		1					1	2	CP003877.1		2.52	60.1	1	Génome complet
Cutibacterium acnes FZ1/2/0	B1	IA1	Singleton		1			1		1	3	AOGR00000000.1		2.48	60.0	25	Contig
Cutibacterium acnes HL001PA1	K1	II	CC53		1					1	2	ADZV00000000.1		2.47	60.1	16	Scaffold
Cutibacterium acnes HL002PA1	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADXW00000000.1		2.48	60.1	14	Scaffold
Cutibacterium acnes HL002PA2	A2	IA1	CC18		1					1	2	ADZS00000000.1		2.48	60.1	15	Scaffold
Cutibacterium acnes HL002PA3	A2	IA1	CC18		1					1	2	ADYR00000000.1		2.48	60.1	13	Scaffold
Cutibacterium acnes HL005PA1	C2	IA1	CC3					1		1	2	ADZP00000000.1		2.52	60.2	49	Scaffold
Cutibacterium acnes HL005PA2	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADZN00000000.1		2.47	60.0	19	Scaffold
Cutibacterium acnes HL005PA3	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADZM00000000.1		2.47	60.1	17	Scaffold
Cutibacterium acnes HL005PA4	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADZW00000000.1		2.47	60.0	16	Scaffold
Cutibacterium acnes HL007PA1	C1	IA1	CC3					1		1	2	ADYJ00000000.1		2.53	60.2	25	Scaffold
Cutibacterium acnes HL013PA1	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADZH00000000.1		2.48	60.0	12	Scaffold
Cutibacterium acnes HL013PA2	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADYN00000000.1		2.48	60.1	18	Scaffold
Cutibacterium acnes HL020PA1	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADYO00000000.1		2.48	60.0	14	Scaffold
Cutibacterium acnes HL025PA1	D1	IA1	CC28		1					1	2	ADYQ00000000.1		2.54	60.0	12	Scaffold
Cutibacterium acnes HL025PA2	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADZO00000000.1		2.48	60.0	21	Scaffold
Cutibacterium acnes HL027PA1	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADXX00000000.1		2.52	60.1	55	Scaffold
Cutibacterium acnes HL027PA2	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADYT00000000.1		2.47	60.1	16	Scaffold
Cutibacterium acnes HL030PA1	H1	IB	CC36		1				1	1	3	ADYB00000000.1		2.54	60.1	18	Scaffold
Cutibacterium acnes HL030PA2	F4	IA2	CC28		1		1			1	3	ADXZ00000000.1		2.51	60.1	22	Scaffold
Cutibacterium acnes HL036PA1	A2	IA1	CC18		1					1	2	ADYL00000000.1		2.48	60.0	13	Scaffold

Cutibacterium acnes HL036PA2	A2	IA1	CC18		1					1	2	ADYU00000000.1		2.48	60.1	13	Scaffold
Cutibacterium acnes HL036PA3	A2	IA1	CC18		1					1	2	ADXY00000000.1		2.48	60.0	13	Scaffold
Cutibacterium acnes HL037PA1	F6	IA2	CC28		1					1	2	ADZI00000000.1		2.48	60.1	16	Scaffold
Cutibacterium acnes HL038PA1	C1	IA1	CC3					1		1	2	ADYD00000000.1		2.54	60.2	24	Scaffold
Cutibacterium acnes HL042PA3	K2	II	CC53		1					1	2	AXZT00000000.1		2.53	60.1	12	Contig
Cutibacterium acnes HL043PA1	C1	IA1	CC3					1		1	2	ADXP00000000.1		2.53	60.2	28	Scaffold
Cutibacterium acnes HL043PA2	C1	IA1	CC3					1		1	2	ADYM00000000.1		2.53	60.2	39	Scaffold
Cutibacterium acnes HL045PA1	C2	IA1	CC3					1		1	2	ADZA00000000.1		2.53	60.2	19	Scaffold
Cutibacterium acnes HL046PA1	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADZQ00000000.1		2.48	60.0	15	Scaffold
Cutibacterium acnes HL046PA2	A2	IA1	CC18		1					1	2	ADYV00000000.1		2.51	60.1	59	Scaffold
Cutibacterium acnes HL050PA1	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADZL00000000.1		2.47	60.1	17	Scaffold
Cutibacterium acnes HL050PA2	K4	II	CC53		1					1	2	ADYC00000000.1		2.46	60.1	13	Scaffold
Cutibacterium acnes HL050PA3	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADZK00000000.1		2.48	60.1	14	Scaffold
Cutibacterium acnes HL053PA1	C2	IA1	CC3					1		1	2	ADZD00000000.1		2.53	60.2	25	Scaffold
Cutibacterium acnes HL053PA2	E1	IA1	CC31		1		1			1	3	ADZB00000000.1		2.5	60.1	17	Scaffold
Cutibacterium acnes HL056PA1	C2	IA1	CC3							1	1	ADYI00000000.1		2.47	60.1	32	Scaffold
Cutibacterium acnes HL059PA1	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADYW00000000.1		2.48	60.0	20	Scaffold
Cutibacterium acnes HL059PA2	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADXS00000000.1		2.48	60.0	13	Scaffold
Cutibacterium acnes HL060PA1	K1	II	CC53		1					1	2	ADYE00000000.1		2.48	60.1	14	Scaffold
Cutibacterium acnes HL063PA1	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADYK00000000.1		2.48	60.1	14	Scaffold
Cutibacterium acnes HL063PA2	F4	IA2	CC28		1		1			1	3	ADYS00000000.1		2.5	60.1	16	Scaffold
Cutibacterium acnes HL067PA1	F2	IA2	CC28		1					1	2	ADZT00000000.1		2.53	60.1	35	Scaffold
Cutibacterium acnes HL072PA1	A6	IA1	CC18		1					1	2	ADZF00000000.1		2.52	60.1	22	Scaffold
Cutibacterium acnes HL072PA2	A6	IA1	CC18		1					1	2	ADXR00000000.1		2.52	60.1	31	Scaffold
Cutibacterium acnes HL074PA1	C2	IA1	CC3					1		1	2	ADYZ00000000.1		2.51	60.2	58	Scaffold
Cutibacterium acnes HL078PA1	B1	IA1	Singleton		1		1	1		1	4	ADZG00000000.1		2.57	60.1	44	Scaffold
Cutibacterium acnes HL082PA1	E5	IA1	CC31		1		1			1	3	ADZJ00000000.1		2.5	60.1	17	Scaffold
Cutibacterium acnes HL082PA2	K6	II	Singleton		1					1	2	ADZR00000000.1		2.49	60.0	37	Scaffold
Cutibacterium acnes HL083PA1	C1	IA1	CC3					1		1	2	ADZC00000000.1		2.48	60.2	18	Scaffold

Cutibacterium acnes HL083PA2	F3	IA2	CC28		1					1	2	ADXT00000000.1		2.48	60.1	14	Scaffold
Cutibacterium acnes HL086PA1	E4	IA1	CC31		1		1	1		1	4	ADYP00000000.1		2.52	60.1	16	Scaffold
Cutibacterium acnes HL087PA1	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADXQ00000000.1		2.47	60.1	13	Scaffold
Cutibacterium acnes HL087PA2	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADYX00000000.1		2.47	60.1	16	Scaffold
Cutibacterium acnes HL087PA3	F1	IA2	CC28		1					1	2	ADYA00000000.1		2.52	60.1	20	Scaffold
Cutibacterium acnes HL092PA1	E1	IA1	CC31		1		1			1	3	ADXU00000000.1		2.5	60.1	14	Scaffold
Cutibacterium acnes HL096PA1	C1	IA1	CC3					1		1	2	CP003293.1	CP003294.1	2.49	60.1	2	Génome complet
Cutibacterium acnes HL096PA2	C1	IA1	CC3					1		1	2	ADWC00000000.1		2.56	60.1	19	Scaffold
Cutibacterium acnes HL096PA3	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADWB00000000.1		2.56	60.0	24	Scaffold
Cutibacterium acnes HL097PA1	G1	IC	Singleton				1			1	2	ADWI00000000.1		2.52	60.2	11	Scaffold
Cutibacterium acnes HL099PA1	C1	IA1	CC3		1			1		1	3	ADWH00000000.1		2.58	60.1	45	Scaffold
Cutibacterium acnes HL103PA1	K1	II	CC53		1					1	2	ADWF00000000.1		2.48	60.1	9	Scaffold
Cutibacterium acnes HL0110PA1	E1	IA1	CC31		1		1			1	3	ADZE00000000.1		2.5	60.1	16	Scaffold
Cutibacterium acnes HL110PA2	E3	IA1	CC31		1		1			1	3	ADYY00000000.1		2.5	60.1	14	Scaffold
Cutibacterium acnes HL110PA3	K2	II	CC53		1					1	2	ADYG00000000.1		2.49	60.1	29	Scaffold
Cutibacterium acnes HL110PA4	K2	II	CC53		1					1	2	ADYF00000000.1		2.51	60.1	56	Scaffold
Cutibacterium acnes HL202PA1	K13	II	NT		1						1	AODB00000000.1		2.48	60.1	44	Contig
Cutibacterium acnes J139	K8	II	CC53		1					1	2	ADFS00000000.1		2.48	60.0	7	Contig
Cutibacterium acnes J165	A1	IA1	CC18		1					1	2	ADJL00000000.1		2.5	60.0	62	Contig
Cutibacterium acnes SK137	C1	IA1	CC3					1		1	2	CP001977.1		2.5	60.1	1	Génome complet
Cutibacterium acnes SK182	C1	IA1	CC3					1		1	2	AFUM00000000.1		2.48	60.1	14	Contig
Cutibacterium acnes SK187	E2	IA1	CC28		1				1	1	3	ADJM00000000.1		2.51	59.9	37	Contig
Cutibacterium acnes TypeIA2 P.acn17	F5	IA2	CC28		1		1			1	3	CP003196.1		2.52	60.1	1	Génome complet
Cutibacterium acnes TypeIA2 P.acn31	F4	IA2	Singleton		1					1	2	CP003197.1		2.5	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes TypeIA2 P.acn33	F1	IA2	CC28		1					1	2	CP003195.1		2.49	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes KPA171202	H2	IB	CC36		1				1	1	3	AE017283.1		2.56	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes P6	H1	IB			1				1	1	3	ARZZ00000000.1		2.54	60.0	32	Contig
Cutibacterium acnes PA2	NT	IB			1				1	1	3	APCV00000000.1		2.53	60.0	138	Contig

Cutibacterium acnes PRP-38	G1	IC	Singleton				1			1	2	AIJP00000000.1		2.51	60.2	12	Contig
Cutibacterium acnes hdn-1	A1	IA1	CC18		1					1	2	CP006032.1		2.49	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes PA_15_1_R1	C1	IA1	CC3					1		1	2	CP012355.1	CP012356.1 (no clusters)	2.49	60.1	2	Génome complet
Cutibacterium acnes PA_21_1_L1	H1	IB	CC36		1				1	1	3	CP012351.1		2.56	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes PA_15_2_L1	A1	IA1	CC18		1		1			1	3	CP012352.1		2.54	60.1	1	Génome complet
Cutibacterium acnes PA_12_1_L1	A1	IA1	CC18		1					1	2	CP012354.1		2.49	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes PA_30_2_L1	D1	IA1	CC28		1					1	2	CP012350.1		2.53	60.0	1	Génome complet
Cutibacterium acnes PA_12_1_R1	A1	IA1	CC18		1					1	2	CP012353.1		2.47	60.1	1	Génome complet
Cutibacterium acnes PMH5	L1	III	Singleton		1				1		2	LJAS00000000.1		2.57	59.9	15	Scaffold
Cutibacterium acnes PMH7	L1	III	Singleton		1				1		2	LJAT00000000.1		2.57	59.9	13	Scaffold
Cutibacterium acnes 5_U_42AFAA	A1	IA1	CC18		1		1			1	3	ACUE00000000.1		2.53	60.1	9	Scaffold
Cutibacterium acnes KPL2009	C1	IA1						1		1	2	AXMD00000000.1		2.49	60.1	4	Scaffold
Cutibacterium acnes KPL1854	C3							1		1	2	AXMI00000000.1		2.55	60.1	8	Scaffold

Annexe 1.2 – 2 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de *Cutibacterium* sp. (autres que C. *acnes*)

Souche	PKS	NRPS	Terpene/ arylpolyene	Head-to-tail cyclized peptide	Bactériocine non modifiée	Nombre total de clusters	N° d'accession	Taille (Mb)	GC %	Scaffolds	Niveau d'assemblage
Cutibacterium avidum 44067						0	CP005287.1	2.53	63.5	1	Génome complet
Cutibacterium avidum DPC 6544						0	CP016954.1	2.73	63.4	1	Génome complet
Cutibacterium avidum ATCC 25577				1		1	AGBA00000000.1	2.55	63.4	7	Scaffold
Cutibacterium avidum MJR7694						0	LRVD00000000.1	2.47	63.5	16	Scaffold
Cutibacterium avidum TM16				1		1	AOUA00000000.1	2.54	63.3	420	Contig
Cutibacterium avidum UCD-PD2						0	LYSN00000000.1	2.67	63.4	51	Contig
Cutibacterium avidum T13						0	LLJH00000000.1	2.46	63.4	15	Contig
Cutibacterium avidum T15						0	LLJJ00000000.1	2.46	63.4	14	Contig
Cutibacterium avidum T14					1	1	LLJI00000000.1	2.52	63.4	9	Contig
Cutibacterium avidum CI855						0	NBIR00000000.1	2.54	63.5	51	Contig
Cutibacterium avidum CI878						0	NBIO00000000.1	2.54	63.4	73	Contig
Cutibacterium avidum CI853						0	NBIS00000000.1	2.53	63.5	41	Contig
Cutibacterium avidum CI882						0	NBIP00000000.1	2.5	63.4	66	Contig
Cutibacterium avidum CI828						0	NBIQ00000000.1	2.48	63.4	30	Contig
'Cutibacterium humerusii' HL037PA2		1			1	2	ADYH00000000.1	2.61	59.9	43	Scaffold
'Cutibacterium humerusii' HL037PA3		1			1	2	ADXV00000000.1	2.62	59.9	24	Scaffold
'Cutibacterium humerusii' HL044PA1		1			1	2	ADZU00000000.1	2.64	60.0	27	Scaffold
'Cutibacterium humerusii' P08		1			1	2	AFAM00000000.1	2.62	59.9	22	Contig
Cutibacterium granulosum DSM 20700					1	1	AOSS00000000.1	2.13	64.1	372	Contig
Cutibacterium granulosum NCTC11865					1	1	LT906441.1	2.18	64.2	1	Génome complet
Cutibacterium granulosum TM11					1	1	AOST00000000.1	2.14	64.2	98	Contig

Annexe 1.2 – 3 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de propionibactéries cutanées non classifiées

Souche	Genome le plus proche	PKS	NRPS	Terpene/ arylpolyene	Lanthipeptide class II	LAP	Thiopeptide	Head-to-tail cyclized peptide	Bactériocine non modifiée	Nombre total de clusters	N° d'accession	N° d'acession de séquence supplémentaire	Taille (Mb)	GC %	Scaffolds	Niveau d'assemblage
Propionibacterium sp. 409-HC1	*C. acnes*		1						1	2	AFIK00000000.1		2.53	60.1	111	Contig
Propionibacterium sp. 434-HC2	*C. acnes*		1				1		1	3	AFIL00000000.1		2.57	60	81	Contig
Propionibacterium sp. CC003-HC2	*C. acnes*		1						1	2	AFUK00000000.1		2.55	60	1	Contig
Propionibacterium sp. KPL1847	*C. acnes*		1						1	2	AXML00000000.1		2.48	60.0	4	Contig
Propionibacterium sp. KPL1849	*C. acnes*		1						1	2	AXMK00000000.1		2.47	60.0	2	Contig
Propionibacterium sp. KPL2003	*C. acnes*		1						1	2	AXMG00000000.1		2.49	60.0	2	Contig
Propionibacterium sp. KPL2008	*C. acnes*		1				1		1	3	AXME00000000.1		2.56	60.0	2	Contig
Propionibacterium sp. HGH0353	*C. avidum*				1			1		2	ATFM00000000.1		2.74	63.4	2	Scaffold
Propionibacterium sp. KPL1838	*C. avidum*							1		1	AXMN00000000.1		2.53	63.3	3	Scaffold
Propionibacterium sp. KPL1852	*C. avidum*							1		1	AXMJ00000000.1		2.53	63.3	4	Scaffold
Propionibacterium sp. KPL2000	*C. avidum*							1		1	AXMH00000000.1		2.56	63.3	3	Contig
Propionibacterium sp. KPL2005	*C. avidum*							1		1	AXMF00000000.1		2.57	63.3	6	Scaffold
Propionibacterium sp. KPL1844	*C. granulosum*								1	1	AXMM00000000.1		2.13	64.2	4	Scaffold
Propionibacterium sp. oral taxon 193	*C. humerusii*		1						1	2	CP017040.1	CP017041.1	2.57 (0.08)	60.0 (60.8)	2	*Génome complet*

Annexe 1.2 – 4 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de *Propionibacterium* sp.

Souche	PKS	NRPS	NRPS components	Terpene	Thiopeptide	Sactipeptide	Lasso peptide	RIPP non classifié	Nombre total de clusters	N° d'accession	N° d'acession de séquence supplémentaire	Taille (Mb)	GC %	Scaffolds	Niveau d'assemblage
Propionibacterium acidifaciens DSM 21887									0	AUFR00000000.1		3.04	70.6	85	Scaffold
Propionibacterium acidifaciens F0233	3	2	4		1	1	1	1	13	ACVN00000000.2		3.02	70.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii DSM 20271									0	CP010341.1		2.65	67.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA1									0	FN806773.1		2.62	67.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii P.UF1									0	CP018002.1		2.63	67.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFREUDJS1									0	LN997841.1		2.68	67.2	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS18									0	LT576034.1		2.66	67.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS4									0	LT576033.1		2.65	67.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS2									0	LT576032.1		2.66	67.2	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS8									0	LT576042.1		2.66	67.2	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS11									0	LT576038.1		2.54	67.4	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS12									0	LT576787.1		2.61	67.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS12-1									0	LT604998.1		2.62	67.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS14									0	LT593929.1		2.51	67.4	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS22									0	LT599498.1		2.63	67.3	1	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii PFRJS25									0	LT618783.1	LT618784.1	2.67 (0.04)	67.3 (64.4)	2	Génome complet
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 118									0	CCYN00000000.1		2.58	67.4	41	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 119									0	CCYS00000000.1		2.64	67.2	46	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 121									0	CCYR00000000.1		2.56	67.3	59	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 122									0	CCYP00000000.1		2.61	67.2	78	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 123									0	CCYQ00000000.1		2.6	67.2	47	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 134									0	CCYY00000000.1		2.64	67.0	47	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 135									0	CCYZ00000000.1		2.62	67.1	47	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 456									0	CDAG00000000.1		2.5	67.3	38	Scaffold

Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 508									0	CDAF00000000.1		2.58	67.3	47	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 512									0	CDAH00000000.1		2.58	67.3	45	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 513									0	CDAE00000000.1		2.66	67.1	48	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 514									0	CDAD00000000.1		2.52	67.3	51	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 516									0	CDAB00000000.1		2.63	66.9	62	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 527									0	CDAC00000000.1		2.58	67.3	63	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii ITG P1									0	CCYV00000000.1		2.7	67.0	104	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii ITG P14									0	CCYW00000000.1		2.51	67.2	43	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii ITG P18									0	CCYU00000000.1		2.57	67.4	57	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii ITG P23									0	CCYX00000000.1		2.59	67.2	45	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii ITG P20									0	CCBE000000000.1		2.59	67.3	59	Scaffold
Propionibacterium freudenreichii SURFING-batch1									0	LM676427.1		2.57	67.3	72	Scaffold

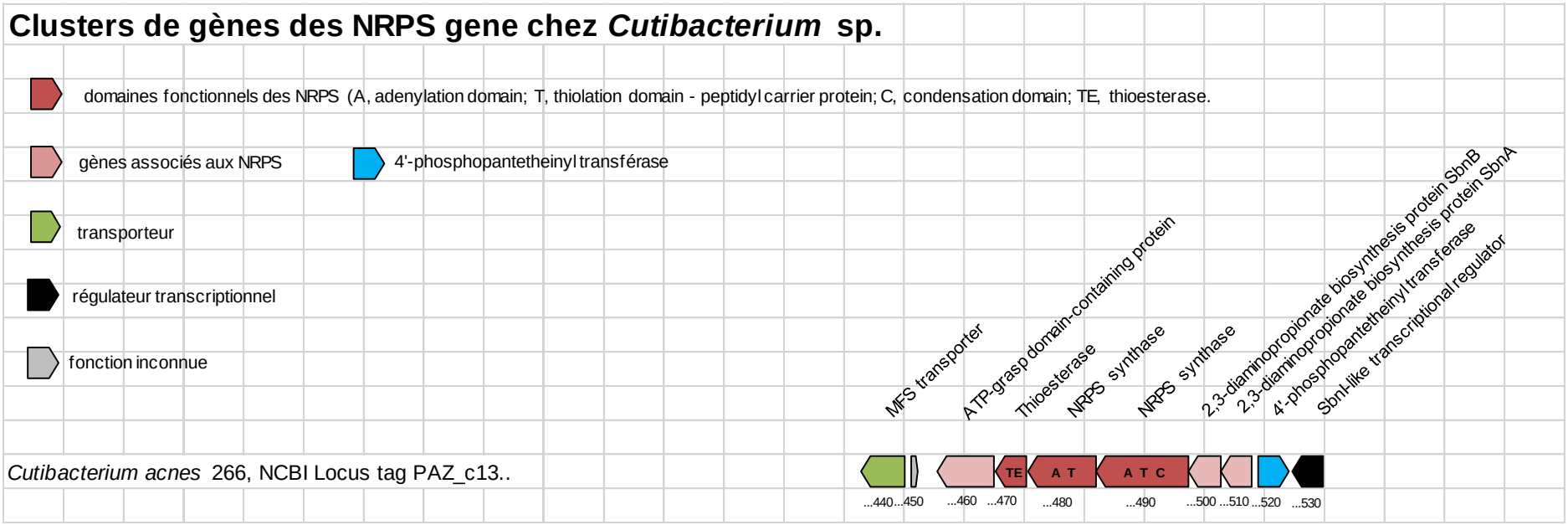
Annexe 1.2 – 5 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein de Pseudo*Propionibacterium* sp.

Organism/Strain name	**PKS**	**NRPS**	**Terpene/ arylpolyene**	**Lanthipeptide class III**	**LAP**	**Nombre total de clusters**	**N° d'accession**	**Taille (Mb)**	**GC %**	**Scaffolds**	**Niveau d'assemblage**
PseudoPropionibacterium propionicum F0230a	1	2		1	1	5	CP002734.1	3.45	66.1	1	Génome complet
Propionibacterium propionicum NBRC 14587	3	2		1		6	BCWS00000000.1	3.39	66.1	26	Contig

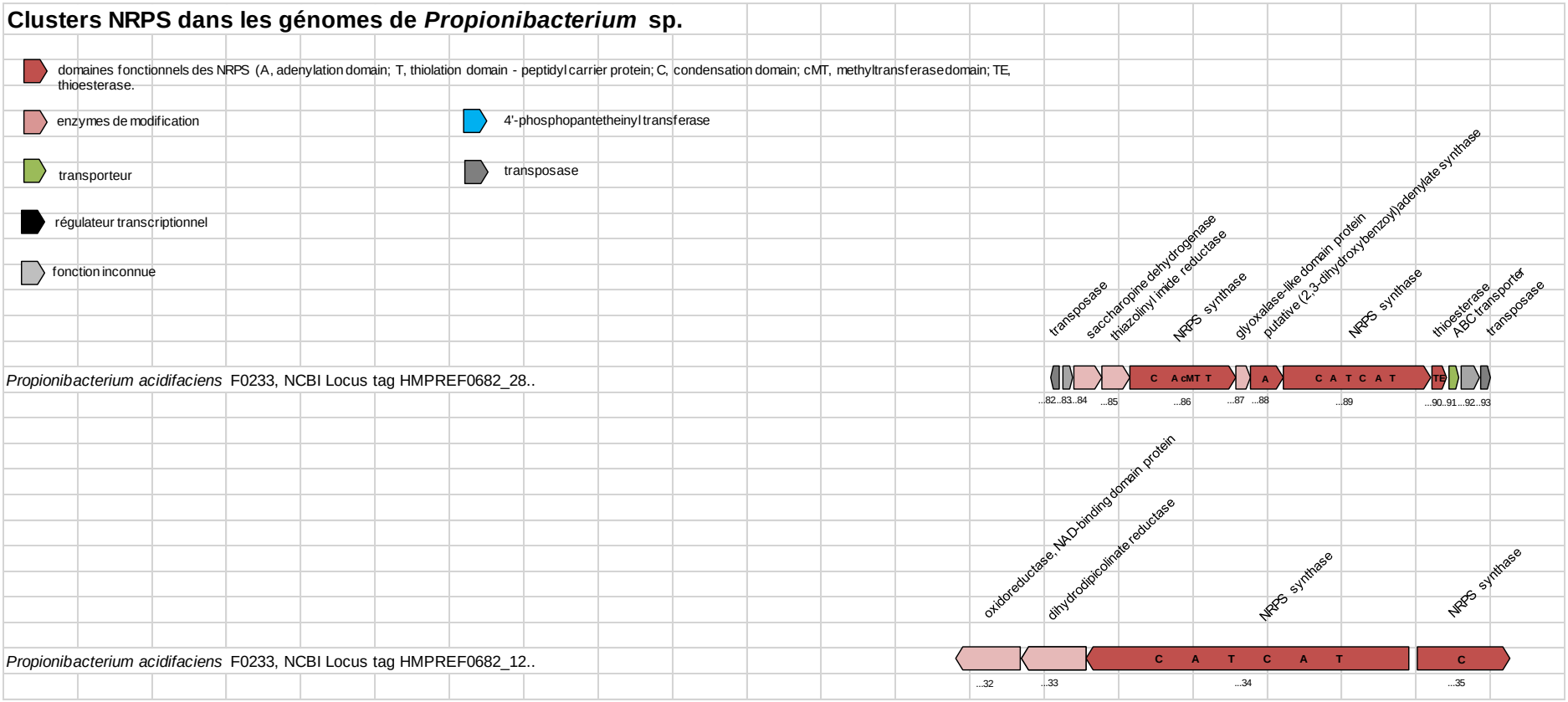
Annexe 1.2 – 6 Liste détaillée de clusters de gènes de métabolites spécialisés au sein d' *Acidipropionibacterium* sp.

Souche	PKS	NRPS	Terpene	Type III >10kD bacteriocin	Nombre total de clusters	N° d'accession	N° d'acession de séquence supplémentaire	Taille (Mb)	GC %	Scaffolds	Niveau d'assemblage
Acidipropionibacterium acidipropionici ATCC 4875				1	1	CP003493.1		3.66	68.8	1	Génome complet
Acidipropionibacterium acidipropionici ATCC 55737			2	1	3	CP014352.1	CP014353.1 (pas de clusters)	3.7 (0)	68.7 (67.8)	2	Génome complet
Acidipropionibacterium acidipropionici CGMCC 1.2230				1	1	CP013126.1		3.65	68.8	1	Génome complet
Acidipropionibacterium acidipropionici DSM 4900					0	ATYU00000000.1		3.59	68.8	52	Scaffold
Acidipropionibacterium acidipropionici F3E8			2	1	3	CP015970.1		3.63	68.7	1	Génome complet
Acidipropionibacterium acidipropionici WSH1105				1	1	CP019400.1		3.65	68.8	1	Génome complet
Acidipropionibacterium jensenii DSM 20535					0	AUDD00000000.1		3.03	68.7	56	Scaffold
Acidipropionibacterium thoenii DSM 20276					0	AUHZ00000000.1		2.94	68	45	Scaffold

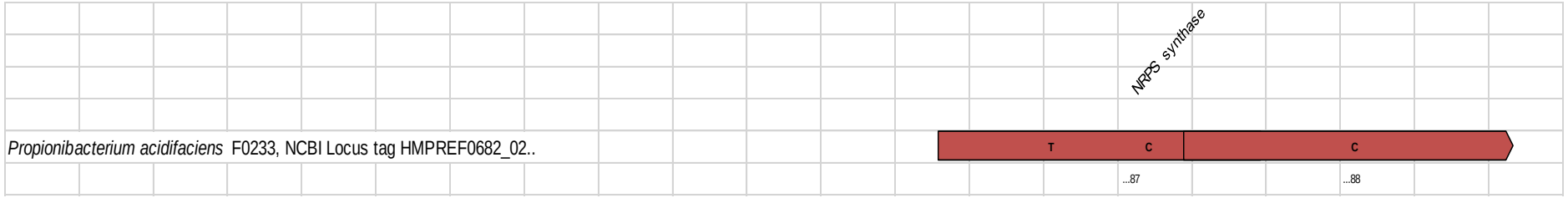
Annexe 1.2 – 7 Représentation détaillée du cluster de gènes de NRPS au sein de *Cutibacterium* sp.



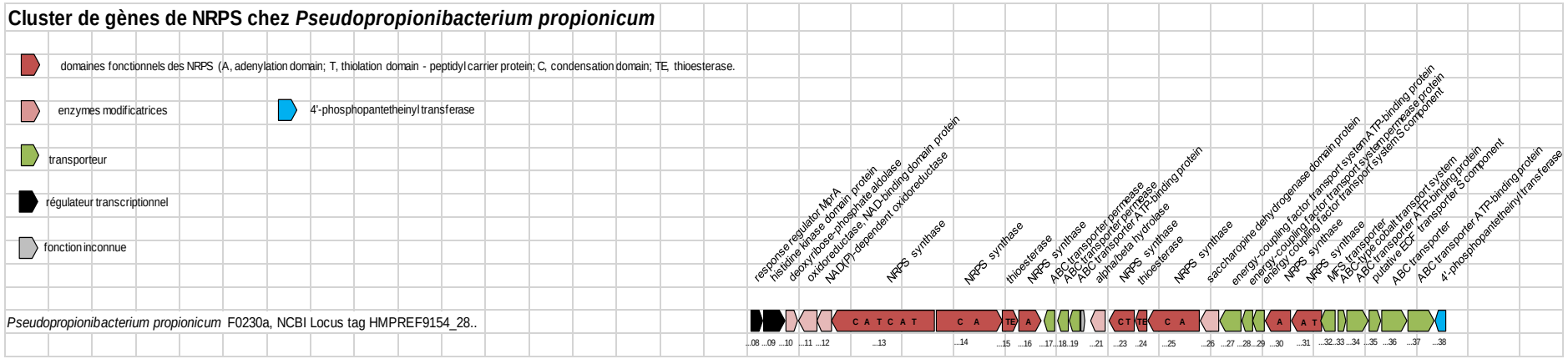
Annexe 1.2 – 8 Représentation détaillée des clusters de gènes de NRPS au sein de *Propionibacterium* sp.

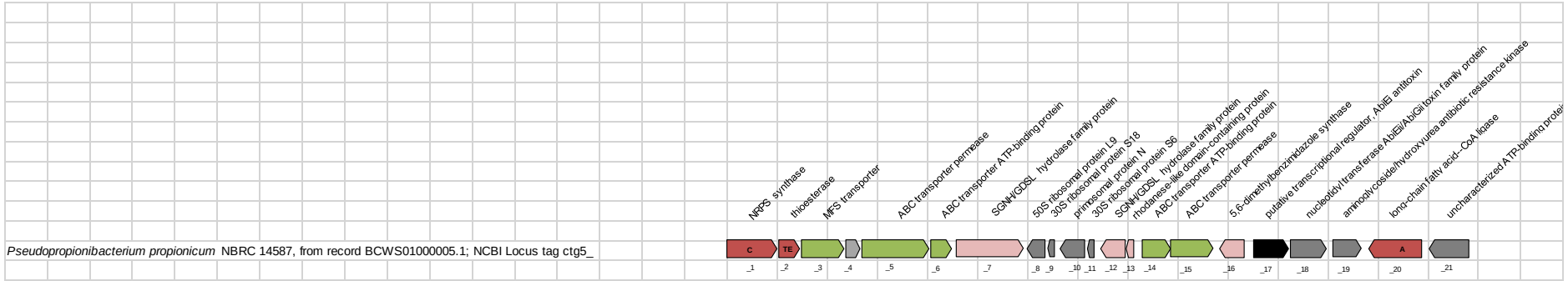


Annexe 1.2 – 9 Représentation détaillée d'un fragment de cluster de gènes de NRPS au sein du génome de *Propionibacterium acidifaciens*

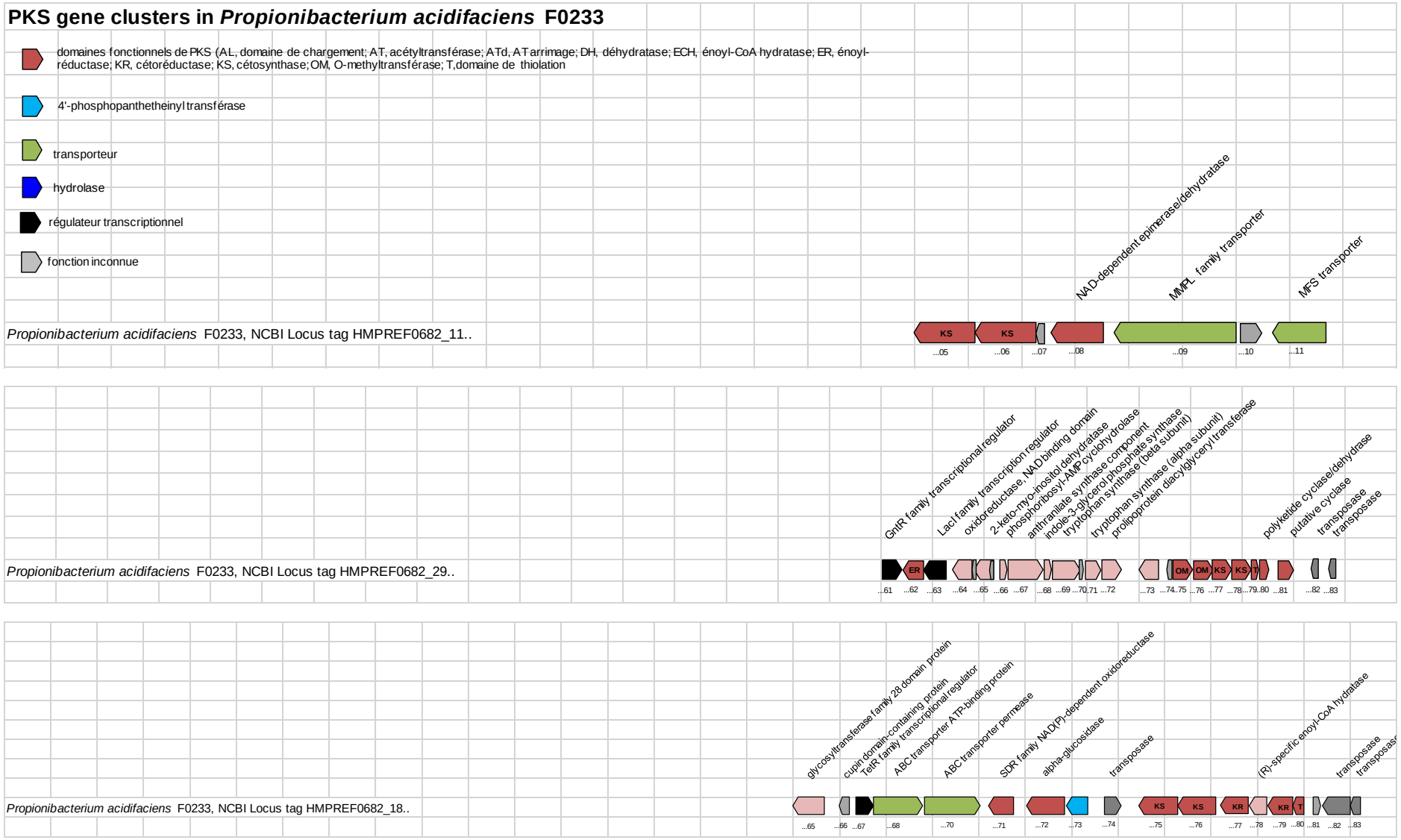


Annexe 1.2 – 10 Représentation détaillée de clusters de gènes de NRPS au sein de *PseudoPropionibacterium* sp.





Annexe 1.2 – 11 Représentation détaillée des clusters de gènes de PKS au sein de *Propionibacterium* sp.



Annexe 1.2 – 12 Représentation détaillée des clusters de gènes de PKS au sein de *PseudoPropionibacterium* sp.

Annexe 1.2 – 13 Représentation détaillée des clusters de gènes de bactériocine non modifiée au sein de *Cutibacterium* sp.

Cluster de gènes de bactériocine non modifiée (lactococcin 972-like)

Peptide précuseur

ABC transport system component

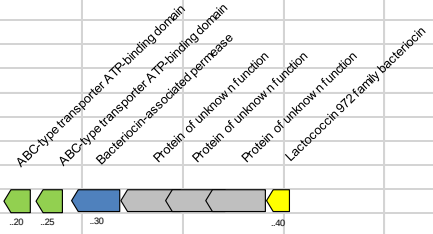
Putative immunity protein

Protein of unknown function

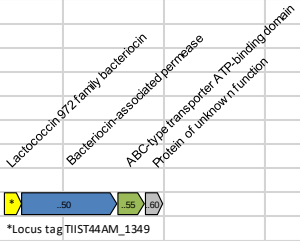
Gene not detected in the MicroscopeMage analysis pipeline

Cutibacterium acnes IA2 P.acn17, NCBI Locus tag TIA2EST22_040..
(clade I strain)

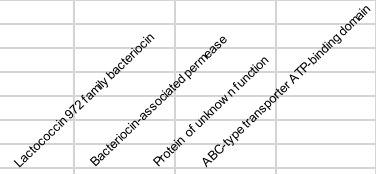
Cutibacterium acnes ATCC 11828, NCBI Locus tag TIIST44AM_22..
(clade II strain)



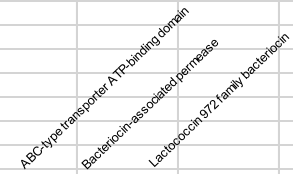
Cutibacterium acnes ATCC 11828, NCBI Locus tag TIIST44_063..
(clade II strain)



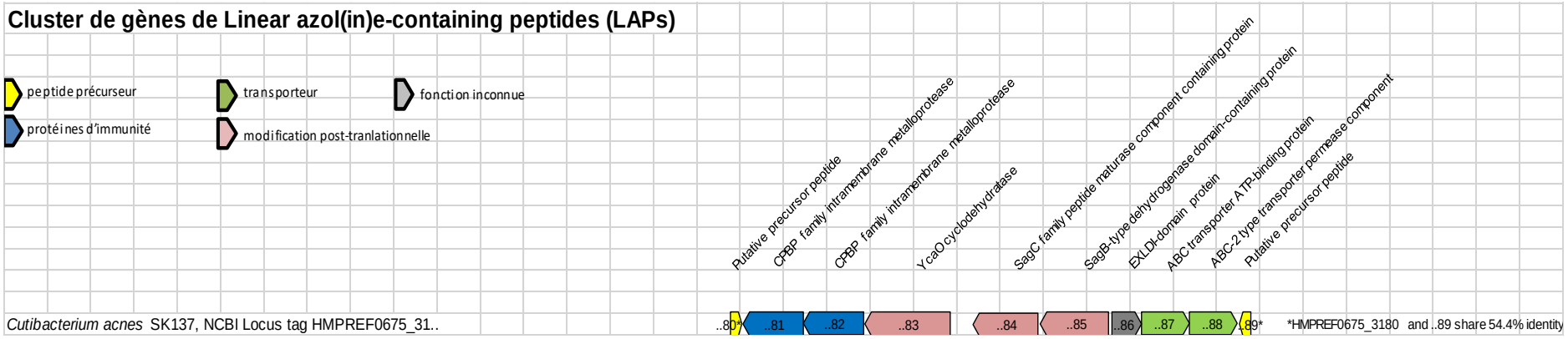
'*Cutibacterium humerusii*' , MicroscopeMAGE Locus tag ADYH01_v1_3601..



Cutibacterium granulosum DSM 20700, NCBI Locus tag H641_06..



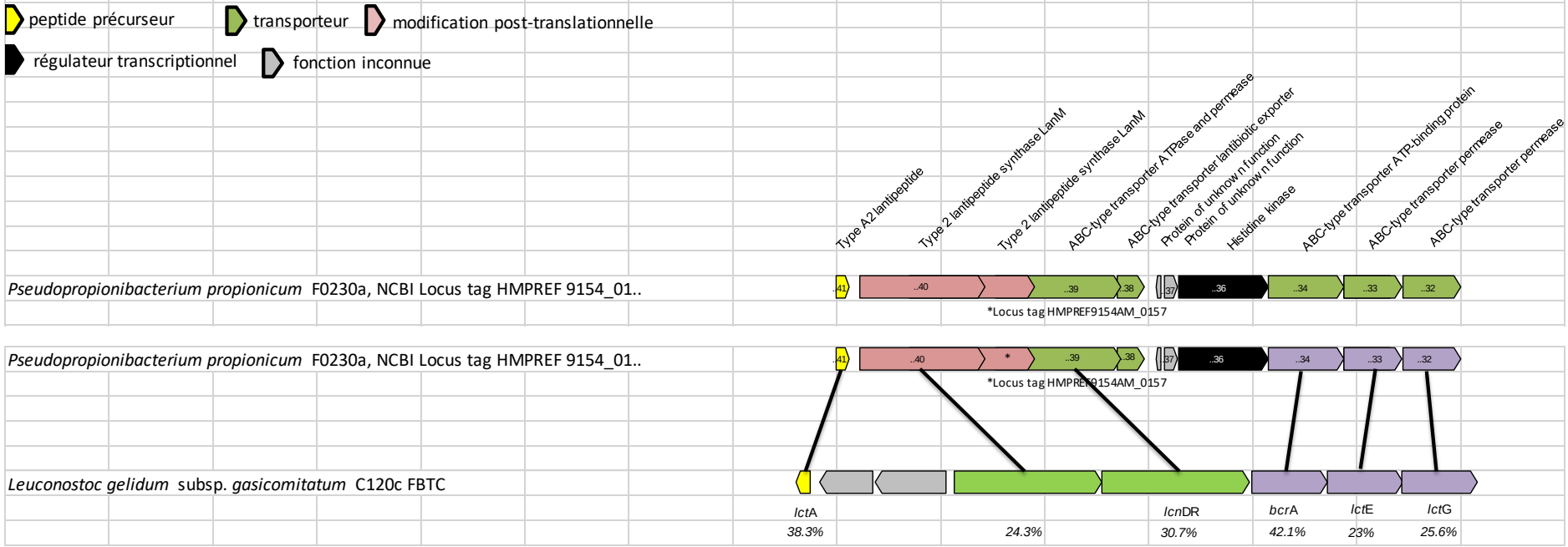
Annexe 1.2 – 14 Représentation détaillée du cluster de gènes de LAP au sein de *Cutibacterium* sp.



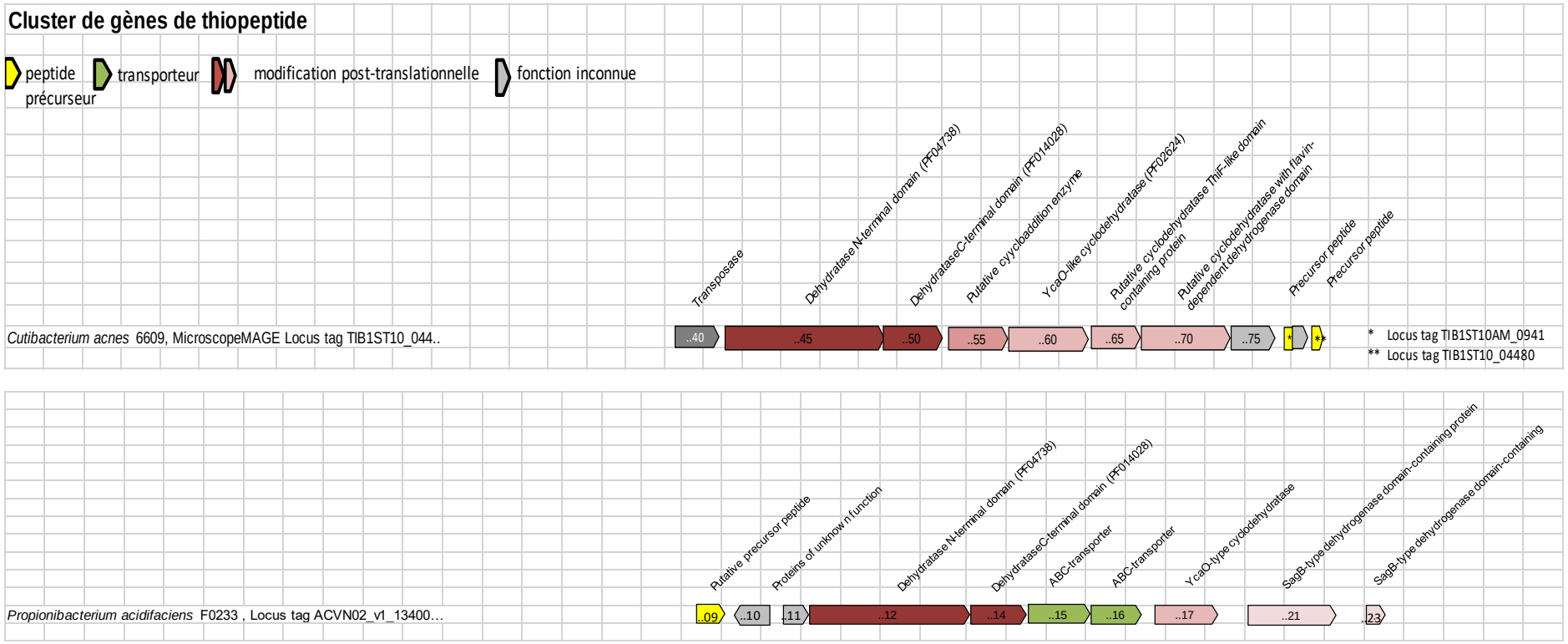
Annexe 1.2 – 15 Représentation détaillée des clusters de gènes de lanthipeptide au sein de *Cutibacterium* sp.

Cluster de gènes de lanthipeptide

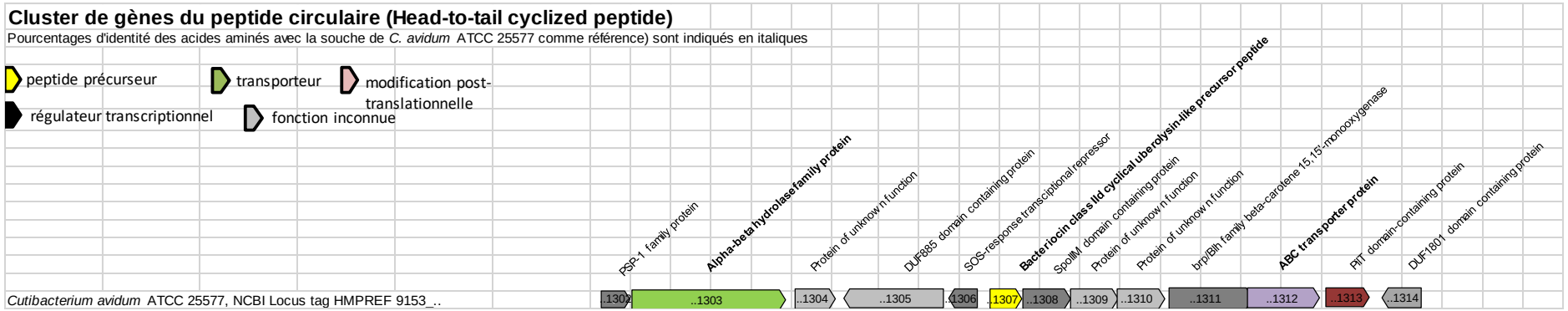
Les pourcentages d'identité avec la souche de *Propionibacterium propionicum F02* 30a comme référence sont indiqués en italiques



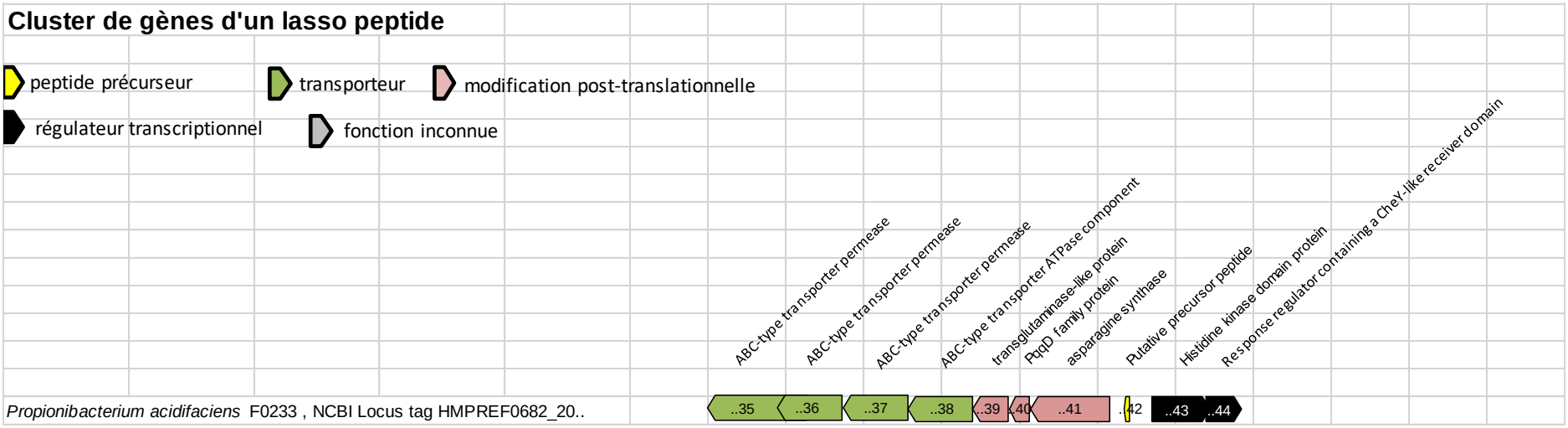
Annexe 1.2 – 16 Représentation détaillée des clusters de gènes de thiopeptides au sein de propionibactéries



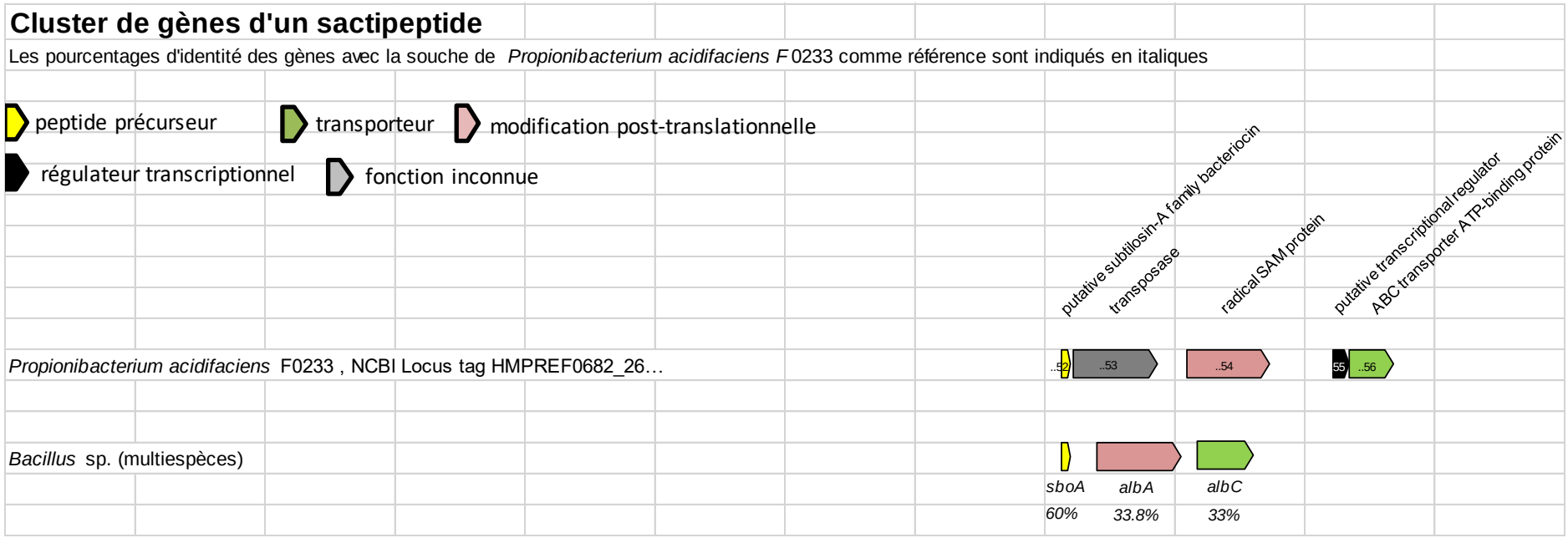
Annexe 1.2 – 17 Représentation détaillée du cluster de gènes de peptide circulaire tête-queue au sein de propionibactéries cutanées



Annexe 1.2 – 18 Représentation détaillée du cluster de gènes d'un lasso peptide



Annexe 1.2 – 19 Représentation détaillée du cluster de gènes d'un sactipeptide



Rôle de l'activité inhibitrice des propionibactéries dans la structuration des populations microbiennes

Résumé

En prenant comme modèle d'étude les espèces de propionibactéries laitières (*Propionibacterium* spp., *Acidipropionibacterium* spp.) et cutanées (*Cutibacterium* spp.), proches phylogénétiquement mais présentes dans des habitats très différents, nous avons étudié l'influence du type d'habitat sur la fréquence et la spécificité des comportements de type compétitif, par deux approches complémentaires, phénotypique et génomique. La fréquence des interactions de compétition, l'intensité et le spectre des activités inhibitrices des propionibactéries était significativement différente selon le type d'habitat et était directement liée au genre bactérien considéré : 25 % des souches de *Cutibacterium* et 22,5 % des souches d'*Acidipropionibacterium* sp. inhibaient au moins une souche cible, alors que les souches de *Propionibacterium* sp. ne présentaient aucune activité inhibitrice. L'activité inhibitrice était non spécifique pour les souches de *C. acnes* et spécifique pour les souches d'*Acidipropionibacterium* sp. En accord avec les données phénotypiques, aucun cluster de gènes de métabolites spécialisés n'a été détecté dans les 34 génomes de *Propionibacterium freudenreichii*, alors qu'ils étaitent présents dans la majorité de souches de *Cutibacterium* sp. et dans quelques souches d'*Acidipropionibacterium* sp. L'exemple de *P. freudenreichii* suggère que les habitats très sélectifs, avec un stress abiotique important tel que celui des fromages à pâte pressée cuite, privilégient les espèces très résistantes mais non antagonistes, puisque le nombre de concurrents potentiels dans ces conditions est très limité. *Acidipropionibacterium* sp. et *a fortiori Cutibacterium* sp., sont caractéristiques d'habitats mois sélectifs, avec une grande diversité bactérienne, et présentent une forte proportion de souches à activité inhibitrice. Au sein des génomes de *Cutibacterium* sp., une grande diversité de clusters codant des composés antimicrobiens (NRPS, bactériocines) est détectée, ce qui donne un avantage compétitif face à un panel de concurrents diversifié.

Lors du criblage phénotypique, une activité inhibitrice importante d'une souche laitière d'*Acidipropionibacterium* vis-à-vis d'une souche de *Streptococcus pyogenes* a été détectée. La substance antibactérienne détectée dans le surnageant de culture d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785 présente une masse moléculaire apparente de moins de 3,5 kDa. Elle est résistante à la protéolyse, à la température et aux variations de pH. Plusieurs clusters de gènes d'antimicrobiens, dont un lasso peptide qui pourrait être responsable de l'activité anti-streptococcique, sont présents dans le génome d'*A. jensenii* CIRM-BIA 1785, Les propriétés de la substance pourraient être intéressantes pour son utilisation dans l'éradication de portage de *S. pyogenes* diminuant ainsi son réservoir et la probabilité d'infections récurrentes.

Mots-clés : propionibactéries, *Cutibacterium acnes*, habitat, antagonisme, bactériocines, *Streptococcus pyogenes*

The inhibitory activity of propionibacteria and its influence on structuring of microbial populations

Summary

To study the influence of habitat on the frequency and the specificity of bacterial competition, we examined a model of phylogenetically close species of propionibacteria living in two very different habitats: dairy propionibacteria (*Propionibacterium* spp., *Acidipropionibacterium* spp.) and cutaneous propionibacteria (*Cutibacterium* spp.). The frequency of competition was studied by complementary, phenotypic and genotypic approaches. The frequency of antagonisms was significantly different depending on the type of habitat and was directly influenced by bacterial genus. Indeed, 25 % of *Cutibacterium* strains and 22.5 % of *Acidipropionibacterium* strains inhibited at least one target strain, whereas *Propionibacterium* sp. were completely devoid of inhibitory activity. In accordance with phenotypic findings, no antagonistic metabolite biosynthetic gene cluster were found in 34 genomes of *Propionibacterium freudenreichii,* whereas the majority of *Cutibacterium* sp. and some *Acidipropionibacterium* sp. genomes contained at least one antagonistic gene cluster. The exemple of *P. freudenreichii* suggests that very selective habitats, with a high number of abiotic stress, like swiss-type cheeses, favours very resistant but not antagonistic species, as the number of potential concurrents is very limited in these conditions. On the contrary, *Acidipropionibacterium* sp. and *a fortiori Cutibacterium* sp. are characteristic of less selective habitats, with high bacterial diversity, and they present a high proportion of antagonistic strains. *Cutibacterium* sp. genomes contain a high diversity of antimicrobial components gene clusters (NRPS, bacteriocins) which may give them a competitive advantage to face a diversified panel of concurrents.

During phenotypic screenging, we detected an important inhibitory activity of one strain of dairy *Acidipropionibacterium* against a pathogenic strain of *Streptococcus pyogenes.* The antibacterial substance detected in *Acidipropionibacterium jensenii* CIRM-BIA 1785 culture supernatant had an apparent molecular weight of less than 3.5 kDa. It was resistant to proteolysis, to temperature and to pH variations. In the genome of *A. jensenii* CIRM-BIA 1785, we detected several clusters of antimicrobial metabolite genes, including a lasso peptide which could potentially be responsible for anti-streptococcal activity. The characteristics of the substance make it a good candidate for therapeutic use in eradication of *S. pyogenes* carriage with the aim of reducing its reservoir and the probability of recurrent infections.

Keywords : propionibacteria, *Cutibacterium acnes*, habitat, antagonism, bacteriocins, *Streptococcus pyogenes*