Normandie Université

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Préparée au sein de l'**Université de Rouen Normandie**

Impact du Calcitonine Gene Related Peptide (CGRP) sur le potentiel inflammatoire des microorganismes associés aux épithéliums de surface.

Présentée et soutenue par

HADJIEV EMILIE

Thèse soutenue le 17/10/2025

devant le jury composé de :

M. FEUILLOLEY MARC GEORGES	Professeur des Universités - URN - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
MME DUCLAIROIR-POC CECILE	Professeur des Universités - URN - Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME GUYARD-NICODÈME MURIEL	Chargé de Recherche - ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, Unité HQPAP	Membre du jury
MME HAJEM NEÏLA	Autre membre de rang B - Sisley, Laboratoire de Biologie Cutanée	Membre du jury
MME ISMAIL RACHED	Maître de Conférences - URN - Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. BERJEAUD JEAN-MARC	Professeur des Universités - Université Poitiers	Rapporteur du jury
M. MENSAH-NYAGAN GUY	Professeur des Universités - UNIVERSITE STRASBOURG 1 LOUIS PASTEUR	Rapporteur du jury

Thèse dirigée par **FEUILLOLEY MARC GEORGES** (COMMUNICATION BACTERIENNE ET STRATEGIES ANTI-INFECTIEUSES)

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

COMMUNICATION BACTÉRIENNE ET STRATÉGIES ANTI-INFECTIEUSES CBSA

« *Je n'ai pas échoué. J'ai simplement trouvé 10 000 solutions qui ne fonctionnent pas.* »

Thomas Edison

Remerciements

Ça y est, cette thèse est terminée. Quand je me suis engagée dans cette aventure, je n'aurais jamais pu imaginer tout ce qui s'est produit pendant les 5 années qui viennent de s'écouler. Je suis arrivée avec le rêve de devenir chercheur et la promesse que je me suis fait d'un jour exercer un métier qui me donne envie de me lever le matin. Bien entendu, rien ne s'est déroulé comme je l'imaginais. Cette thèse a été l'une des épreuves les plus difficiles que j'ai eu à surmonter jusqu'à présent. Elle m'a énormément appris sur moi-même, sur qui je suis et qui je veux devenir. Sur ce que j'attends réellement de cette carrière que je suis en train de me construire. Comme je le dis souvent, ce que je retiendrai de mon passage au CBSA, ce sont les gens que j'y ai rencontré. Alors ces quelques lignes sont pour vous.

Pour commencer, j'aimerais remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse, le **Pr. Jean-Marc Berjeaud** et le **Pr. Guy Mensah-Nyagan**, mes rapporteurs, ainsi que le **Pr. Cécile Duclairoir-Poc**, le **Dr. Muriel Guyard-Nicodème**, le **Dr. Rached Ismail** et **Mme Neïla Hajem**, les examinateurs, d'avoir accepté de consacrer du temps à évaluer mes travaux. Je suis honorée de vous compter parmi les membres de mon jury.

En deuxième lieu, je souhaiterais remercier tout spécialement **Michaël Aubert**, de la direction de l'ED nBISE, ainsi que les membres de mon CSI, **Valérie Besson**, **Alexandre Crépin**, **Marie-Pascale Prud'homme** et **Jonathane Furon**. Merci d'avoir toujours fait en sorte que je me sente en sécurité et entendue pendant nos échanges annuels par visioconférence. Votre soutien dans cette situation difficile qu'a été la mienne fut précieux et je vous serai éternellement reconnaissante de ce que vous avez fait pour moi.

Vient maintenant le tour des membres du laboratoire CBSA et je ne peux que commencer par toi **Sylvie** ! Notre directrice et celle qui passe toujours faire un coucou aux doctorants avec un grand sourire. Merci pour ta bonne humeur, pour tes petits « ça va ? » à chaque fois que tu croises l'un d'entre nous et pour toutes les fois où tu t'es souciée de l'avancée de nos travaux et de notre bien-être. Dans une thèse, ce genre de choses comptent énormément. Merci du fond du cœur pour ton soutien, je ne l'oublierai jamais.

Bien entendu, quelques mots pour mon chef ! **Marc**, je pense que cette thèse aura été une sacrée épreuve pour moi, comme pour toi. Merci d'avoir fait en sorte que je puisse la

terminer dans les meilleures conditions possibles. Merci également pour ton soutien et tes conseils tout au long de cette aventure. Malgré toutes les difficultés, j'ai beaucoup appris et je suis contente qu'on soit arrivés au bout ensemble. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir épaulée dans cette aventure.

J'ai évidemment une pensée pour chacun des membres du laboratoire CBSA. Merci à **Amandine**, **Magalie**, **Olivier M.**, et **Florian**, sans qui ce laboratoire ne pourrait pas tourner. **Mag**, merci pour tes conseils en manips et pour toutes les fois où tu m'as aidée quand je suis venue te voir avec une « petite question ». **Amine**, merci pour ton aide pour la partie bioinformatique de cette thèse. Merci également à **Ali**, **Annabelle**, **Coco**, **Anne**, **Olivier L.**, **Emeline**, **Andréa**, **Xavier**, et **Nathalie**. Vous avez tous contribué à rendre cette expérience plus belle et enrichissante pour moi, que cela soit grâce à quelques mots au détour d'un couloir, à des moments de détente pendant la pause du midi, à une conversation autour d'un café ou bien à de précieux conseils pour m'aider à naviguer dans les eaux troubles de la thèse !

Rached, un petit mot pour toi qui est arrivée en tant que post-doc et qui est maintenant MCF et membre de mon jury de thèse ! Je t'imagine déjà froncer les sourcils en me voyant t'appeler tatie ici mais le terme n'est pas vraiment juste. Je te vois plutôt comme une grande sœur. Celle qui donne des conseils parce qu'elle est déjà passée par là. Qui parle avec tout le monde et qu'on perd (souvent) dans les couloirs. Mais aussi celle avec qui j'ai pu rire et parler de tout et de rien. Merci d'avoir été là. Merci de m'avoir encouragée à tenir bon et de m'avoir poussée à voir le meilleur dans cette thèse. J'en avais besoin.

Vient maintenant le tour des doctorants. Merci tout d'abord aux anciens docs, qui ont déjà soutenu et qui écrivent maintenant un nouveau chapitre de leur vie. Je n'oublie pas **Mathilde**, **Xavier**, **Max**, **Djouhar**, **Mélissande** ou encore **Yvann**. **Audrey**, tu es dans cette espèce d'entre-deux où je ne peux pas encore te mettre avec les chefs malgré le fait que tu sois docteur ! Merci pour les pauses du midi à rigoler de tes aventures. **Charly**, mon ex-colloque, je ne t'oublie pas ! Du M2 et jusqu'à la fin de ta thèse, ça aura été un plaisir de partager cette aventure ensemble. **Jospin**, tu es arrivé au labo pour faire ton stage de M2 et il se trouve que tu m'as eu comme encadrante ! Depuis, tu as fait un sacré chemin et tu as aussi compris qu'il ne fallait jamais me sous-estimer ! Je pense fort à toi pour cette dernière année qui t'attend et pour l'ATER. **Victoire**, celle qui partage mon bureau

mais la malchance d'Audrey ! Merci pour ta bonne humeur, pour tous les moments où on a pu rire ensemble et pour ton soutien dans toutes mes galères de voiture !! On aura été des habituées de Midas toutes les deux. **Salomé**, j'espère que ta deuxième année en Irlande se passera pour le mieux et que tu en profiteras à fond ! Je n'oublie pas la bouteille de calva maison que tu m'as promise un jour ! Merci également à **Madalina**, **Héloïse**, **Mathieu** et **Nathan**. Je souhaite le meilleur à chacun et chacune d'entre vous pour vos thèses respectives. Je n'oublie pas **Julie**, **Nicola**, **Thalisson**, ainsi que tous les autres stagiaires et doctorants qui ont été de passage au laboratoire. Certains d'entre vous sont devenus des amis, parfois à l'autre bout du monde, mais à qui je pense très fort. Merci à tous ceux que j'ai rencontré ici et dont je n'ai peut-être pas mentionné le nom. Enfin, merci à toi **Manon**, d'avoir été une amie précieuse pour moi, de m'avoir soutenue et encouragée et de faire partie de certains de mes plus beaux moments ici.

Adrien, Adriboî- non j'ai dit que je ne mettrai pas ce surnom ici alors je m'arrête là. Je sais que tu n'oublieras jamais notre rencontre et je crois bien que moi non plus. Ce jour où je suis rentrée dans ton bureau en criant « Sushiiii » avec enthousiasme, avant de me rendre compte que tu étais là, a été le début d'une belle amitié. Je ne savais pas encore à ce moment-là à quel point on allait rire et passer de bons moments ensemble. Merci à toi de faire partie de mes plus belles rencontres du CBSA. Les soirées films d'horreur, le temps passé à s'embêter pendant les pauses mais aussi les câlins quand ça n'allait pas font partie de ces choses dont je me souviendrai toujours lorsque je penserai à cette thèse. Courage pour la fin de ta propre aventure, tu y es presque !

Chloé, je ne saurais dire quand notre amitié a commencé à se forger mais ce que je sais, c'est qu'elle a été la plus belle des surprises. C'est avec toi que j'ai partagé ce voyage à Edimbourg, lors de mon premier congrès international, et qui a été un moment inoubliable. Des discussions légères en buvant notre café, à celles plus sérieuses sur des sujets que je ne peux partager qu'avec toi, merci d'avoir été là pour moi. Merci pour les conseils de manips et les moments où je ne savais plus comment gérer le stress et où tu étais là pour me faire prendre du recul. C'est maintenant à ton tour de te donner à fond pour obtenir ta thèse et je suis de tout cœur avec toi. Tu as déjà tout ce qu'il faut pour être Docteur.

Clara, bébou, the bitchiest of the cuties. Notre amitié s'est forgée au milieu d'un chaos absolu mais représente une des choses que je chéris le plus dans cette thèse. Je n'oublierai jamais les pauses thés (avec ou sans sucre, on ne juge pas…), les après-midi crochets, les parties sur Monster Prom pour débloquer toutes les fins possibles, les soirées BK où on finit toujours par parler de sujets beaucoup trop sérieux et tous ces moments où on s'est soutenue mutuellement pour aller de l'avant. On l'a fait et on peut être fière de nous. J'ai hâte de voir ce que l'avenir nous réserve et je suis certaine que de belles aventures nous attendent.

Meryem, mémé, bébouj, mon petit soleil, celle qui apporte toujours de la joie et de la positivité partout où elle passe. Celle qui arrive dans les bureaux le matin avec sa tasse à café et sa démarche guillerette en nous sortant un « Bonzouuuuuuur » plein d'énergie. Celle qui prend des photos plus vite que son ombre et qui a tant de dossiers sur chacun d'entre nous. Ton téléphone est une mine d'or de fous rires et de bons moments. Depuis ton stage de Master 1 et jusqu'à maintenant, merci d'avoir été là pour me soutenir, rire, chanter dans ma voiture pendant que j'essaye de rester concentrée sur la route, mais aussi pour être devenue celle que je considère maintenant comme une amie précieuse. Tu es forte, pleine de ressource et indépendante, tu as tout donné pendant ta thèse et j'ai hâte de te voir la soutenir.

Anne-Sophie, la chanteuse du laboratoire, celle qui m'a (plus ou moins) appris à tchiper. Grâce à toi je sais maintenant prononcer le mot goyave correctement. Je sais aussi ce qu'est un couteau chien, à quel point le piment végétarien est sacré et je répète « Aye mon Dieu » tellement souvent que ça fait partie de mon vocabulaire maintenant. Je connais aussi beaucoup trop bien les paroles d'une certaine chanson dont je ne prononcerai pas le nom… ! On a vécu la thèse et l'expérience de l'ATER ensemble. Merci d'avoir toujours été là pour moi, pour les soirées films d'horreur qui font pas peur mais qu'on regarde quand même en se cachant derrière un coussin et pour m'avoir laissée t'appeler « Sushi » et contaminer tout le laboratoire au passage. Merci d'être une amie si incroyable pour moi. J'ai hâte de te voir soutenir cette thèse pour laquelle tu as tout donné et dont tu peux être fière.

Clarisse et **Thibault**, ceux que j'ai rencontré au labo, qui l'ont quitté mais qui font toujours partie de ma vie et ce, je l'espère, pour encore très longtemps. Clarisse, on a

partagé un bureau ensemble, c'est ce qui nous a permis de commencer à discuter puis, petit à petit, de développer une amitié qui m'est aujourd'hui très chère. Tu sais déjà à quel point tu comptes à mes yeux. C'est aussi notre amitié qui m'a permis d'en construire une autre, qui est tout aussi importante, avec Thibault. Tibobaldo, grâce à toi, j'ai une répartie bien plus piquante qu'en début de thèse et une adoration totale pour les chips (de lentilles surtout, on s'en souvient !). Merci à vous deux pour votre soutien peu importe les circonstances ou la distance qui nous sépare. J'ai hâte de partager les prochaines aventures que me réserve la vie avec vous.

Clémentine, celle qui passe sa thèse pile une semaine avant moi. Depuis notre première rencontre en L1 lorsque tu as remarqué le logo sur ma trousse et qu'on a ensuite discuté à l'arrêt de bus, et jusqu'à maintenant, tu as toujours été la plus merveilleuse des amies. On a passé nos études ensemble, on est partis en voyage à l'autre bout du monde, on a grandi et expérimenté plein de choses et pendant tout ce temps, on a toujours été là l'une pour l'autre. Félicitations pour ta propre thèse amplement méritée et merci, tout simplement, de faire partie de ma vie.

Maintenant vient le tour de celle à qui je dois tout, celle qui est mon point d'ancrage dans la vie : ma **Maman**. Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Merci de m'avoir répétée encore et encore à quel point tu es fière de moi. Merci de m'avoir toujours dit que j'étais capable d'y arriver, surtout quand je ne croyais plus en moi. Peu importe mes choix ou mes décisions, tu as toujours été derrière moi. Tu m'as écoutée, rassurée et fait relativiser quand c'était nécessaire. Les quelques mots que j'écris ici ne suffisent pas à tout exprimer mais du fond du cœur et depuis toujours, merci et je t'aime plus que tout.

Enfin, j'ai une dernière pensée pour quelqu'un qui n'est malheureusement plus là pour me voir soutenir cette thèse : mon **Papa**. Je me suis souvent imaginée comment ça aurait été de se rendre ensemble à l'Université, toi pour le travail et moi pour un cours, ou bien ce que tu aurais dit lorsque j'ai réussi mes concours de thèse. Quels conseils tu aurais pu me donner pendant celle-ci, lorsque tout est devenu difficile et que j'étais perdue. Personne n'aurait pu mieux me comprendre que quelqu'un qui faisait le même métier que moi. La vie a fait que je n'aurai jamais de réponses à ces questions mais j'espère de tout cœur que si tu avais été là, tu aurais été fier de moi.

Table des matières

Index des figures et tableaux 5
Liste des abréviations 7
INTRODUCTION 11
Chapitre 1 – La peau et le microbiote cutané 13
I- Structure de la peau 13
1- L'épiderme 14
2- Le derme 18
3- L'hypoderme 19
4- Les annexes cutanées 19
II- Fonctions de la peau 21
1- Barrière physique et chimique 21
2- Barrière immunologique 23
1. Système immunitaire inné 24
2. Système immunitaire adaptatif 28
III- Le microbiote cutané 29
1- Composition du microbiote cutané 30
1. Communautés bactériennes 32
a. *Cutibacterium acnes* 35
b. *Staphylococcus* spp. 36
c. *Corynebacterium* spp. 37
2. Les eucaryotes 38
a. Les levures/moisissures 38
b. Les acariens 39
c. Les virus 40
3. Les archées 40
2- Mise en place du microbiote cutané 41
3- Variabilité du microbiote cutané 43
1. Variabilités intrapersonnelles 44
2. Variations interpersonnelles 45
3. Facteurs extrinsèques 46
4- Pathologies de la peau 48
1. L'acné 48
2. Dermatite atopique 50
3. Le psoriasis 52

IV- Rôles du microbiote cutané....53
1- Inhibition de la colonisation des pathogènes....53
2- Stimulation du système immunitaire....55
1. Système immunitaire inné....55
2. Système immunitaire adaptatif....57
3- Intégrité de la peau et réparation tissulaire....59
V- Bacillus licheniformis....60
1- Présentation générale....60
2- Intérêt biotechnologique....61
3- Sporulation....63
4- Production de lichenysine....64
Chapitre 2 – Endocrinologie Microbienne....67
I- La peau en tant qu'organe neuro-immuno-endocrinien....67
1- Le système nerveux cutané....67
1. Anatomie et physiologie....68
a. Nerfs autonomes....68
b. Nerfs sensoriels....69
2. Connexions avec le système nerveux central....69
2- Hormones libérées au niveau cutané....71
II- Endocrinologie microbienne....74
1- Les catécholamines....76
1. Généralités....76
2. Structure et biosynthèse....77
3. Récepteurs eucaryotes....78
4. Action sur les bactéries....79
5. Mécanismes de réponse....83
2- Les peptides natriurétiques....85
1. Généralités....85
2. Structure et biosynthèse....86
3. Récepteurs eucaryotes....87
4. Action sur les bactéries et mécanisme de réponse....88
3- La Substance P....93
1. Généralités....93
2. Structure et biosynthèse....93
3. Récepteurs eucaryotes....95
4. Activités biologiques cutanées....96

5. Action sur les bactéries et mécanisme de réponse 97
4- Le CGRP 101
5- Autres facteurs eucaryotes et bactériens 102
Chapitre 3 – Calcitonin Gene-Related Peptide 107
I- Généralités sur le CGRP 107
II- Structure et biosynthèse 108
III- Régulation 111
1- Régulation transcriptionnelle 112
2- Clairance 113
IV- Fonctions physiologiques 114
1- Au niveau cutané 114
2- Autres niveaux 117
V- Récepteurs 121
1- Récepteurs eucaryotes 121
1. CLR/RAMP1 121
2. CTR/RAMP1 124
3. Voies de transduction du signal 124
4. Régulation post-stimulation 126
5. Localisation 127
2- Récepteur bactérien 127
Revue : Interaction of skin-born mediators with the cutaneous microbiota and beyond 131
OBJECTIF DE LA THÈSE 135
MATÉRIELS & MÉTHODES 137
I- Souches bactériennes, milieux et conditions de culture 139
II- Peptide 140
III- Séquençage et analyses bioinformatiques de *B. licheniformis* MIC004 140
IV- Physiologie bactérienne 142
1- Suivi de croissance 142
2- Formation de biofilm en condition statique 142
1. Par la technique de coloration au Cristal Violet 142
2. Par la technique de microscopie confocale à balayage laser 143
3- Test de susceptibilité aux antibiotiques 144
V- Étude de la virulence sur la lignée cellulaire HaCaT 145
1- Culture des kératinocytes HaCaT 145
2- Numération des cellules HaCaT 145
3- Etude de cytotoxicité 146

4- Dosage de l'interleukine 8 (IL-8) 147
VI- Analyses statistiques 147
VII- Etude transcriptomique 147
1- Analyse des transcriptomes bactériens 147
2- Analyse du transcriptome des cellules HaCaT 149
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 151
Contexte de l'Article 1 153
Article 1 : Identification of a scalp associated *Bacillus licheniformis* strain with unexpected Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sensitivity 155
Contexte de l'Article 2 199
Article 2 : Re-evaluating the sensitivity of cutaneous bacteria to Calcitonin Gene-Related Peptide 201
Résultats complémentaires 221
I- Effet du CGRP sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* MFP05 223
II- Effet du CGRP sur la formation de biofilm de *Pseudomonas fluorescens* MFP05 224
III- Effet du CGRP sur la virulence de *Pseudomonas fluorescens* MFP05 226
1- Evaluation de la cytotoxicité sur la lignée cellulaire HaCaT 226
2- Evaluation du potentiel inflammatoire par dosage de l'IL-8 227
DISCUSSION 229
CONCLUSION & PERSPECTIVES 245
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 251
ANNEXE : CURRICULUM VITAE 293

Index des figures et tableaux

Les Figures et Tableaux des articles 1 et 2 ne figurent pas dans cette liste.

Figure 1 : Représentation schématique de la peau et des annexes cutanées.....13

Figure 2 : Représentation schématique des différentes couches de l'épiderme (adapté de Twarog, 2017) 16

Figure 3 : Schéma des différents facteurs faisant de la peau une barrière physique et chimique robuste (adapté de Eyerich *et al.*, 2018).....21

Figure 4 : Schéma représentant les différents effecteurs immunitaires cutanés (Nestle *et al.*, 2009).....24

Figure 5 : Composition des communautés microbiennes cutanées d'un individu sain (Byrd *et al.*, 2018).....32

Figure 6 : Principaux organismes commensaux et facteurs influençant la composition du microbiote cutané (adapté de Harris-Tryon and Grice, 2022).....44

Figure 7 : Mécanismes de « colonization resistance » permettant au microbiote cutané d'assurer une protection contre les agents pathogènes (adapté de Flowers and Grice, 2020).....54

Figure 8 : Modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives par *Staphylococcus epidermidis* (Nakamizo *et al.*, 2014).....57

Figure 9 : Mise en place de la tolérance immunitaire vis-à-vis de la flore commensale chez les nouveau-nés (Scharschmidt *et al.*, 2017).....58

Figure 10 : Principales applications biotechnologiques de *Bacillus licheniformis* (Muras *et al.*, 2021).....62

Figure 11 : Comparaison des structures de la C15-Lichenysine (A) et de la C15-Surfactine (B) (Yeak *et al.*, 2022).....65

Figure 12 : La peau en tant qu'organe neuro-immuno-endocrinien (Roosterman *et al.*, 2006).....72

Figure 13 : Voie de biosynthèse des catécholamines.....77

Figure 14 : Représentation schématique du fonctionnement des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPGs).....79

Figure 15 : Représentation schématique des récepteurs bactériens de l'Epinéphrine (Epi) et de la Norépinephrine (NE) (adapté de Boukerb *et al.*, 2021).....84

Figure 16 : Structure des peptides natriurétiques (ANP, BNP et CNP) (Goetze *et al.*, 2020).....87

Figure 17 : Récepteurs des peptides natriurétiques (NPR-A, NPR-B et NPR-C) (Goetze *et al.*, 2020).....88

Figure 18 : **Modèle des voies de régulations impliquées dans les effets des NPs sur (A) *P. aeruginosa* et (B) les staphylocoques (adapté de Lesouhaitier *et al.*, 2019)**.....90

Figure 19 : **Structure chimique de la SP (Majkowska-Pilip *et al.*, 2019)**.....94

Figure 20 : **Représentation schématique du récepteur NK1 de la SP (Garcia-Recio and Gascón, 2015)**.....95

Figure 21 : **Modèle du mécanisme d'action proposé de la Substance P (SP) et du CGRP (Racine *et al.*, 2020)**.....101

Figure 22 : Epissage alternatif des gènes CALCA et CALCB (Sánchez *et al.*, 2023).....109

Figure 23 : **Séquences en acides aminés de l'α- et du β-CGRP humain (adapté de Russell *et al.*, 2014)**.....110

Figure 24 : **Régulation de l'expression du gène CALCA (Russo and Hay, 2023)**.....112

Figure 25 : **Effets du CGRP sur la peau et les vaisseaux sanguins (adapté de Kim and Granstein, 2021)**.....116

Figure 26 : **Schéma récapitulatif des effets du CGRP (réalisé à partir de la revue de Russo and Hay, 2023)**.....121

Figure 27 : **Modèle structural du récepteur CLR/RAMP1 lié au CGRP (Russo and Hay, 2023)**.....122

Figure 28 : **Voies de signalisation du CGRP (adapté de Russo and Hay, 2023)**.....125

Figure 29 : Schéma de la réaction obtenue lors de l'utilisation du kit de cytotoxicité CyQUANT™.....146

Figure 30 : **Courbe de croissance (n=3) de *Pseudomonas fluorescens* MFP05 en absence (bleu) et en présence (violet) de CGRP à 10^{-6} M**.....223

Figure 31 : **Formation de biofilm (n=3) de *Pseudomonas fluorescens* MFP05, en présence (bleu) et en absence (violet) de CGRP à 10^{-6} M**.....224

Figure 32 : **Effet du CGRP à 10^{-6} M sur l'adhésion initiale et la formation de biofilm de *Pseudomonas fluorescens* MFP05 par visualisation en microscopie confocale à balayage laser**.....225

Figure 33 : **Evaluation de la cytotoxicité de *Pseudomonas fluorescens* MFP05 (n=2, à compléter), traitée ou non avec le CGRP à 10^{-6} M**.....226

Figure 34 : **Evaluation du potentiel inflammatoire de *Pseudomonas fluorescens* MFP05, traitée ou non avec le CGRP à 10^{-6} M**.....227

Tableau 1 : **Caractéristiques neurophysiologiques des fibres nerveuses sensitives cutanées (adapté de Shastri *et al.*, 2024 avec des données de Roosterman *et al.*, 2006 et Tachdjian, 2016)**.....70

Tableau 2 : **Souches bactériennes utilisées dans cette étude**.....139

Liste des abréviations

ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone) : Adrénocorticotrophine

AD (Atopic Dermatitis) : Dermatite Atopique

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

alpha-MSH (alpha-Melanocyte Stimulating Hormone) : Mélanotropine

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AMPs (AntiMicrobial Peptides) : Peptides antimicrobiens

$AMY_{1/2/3}$: Amylin subtype 1/2/3 receptor

ANP : Atrial Natriuretic Peptide

ARN : Acide RiboNucléique

BNP : Brain Natriuretic Peptide

CAMP : facteur Christie–Atkins–Munch-Petersen

CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) : Peptide relié au gène de la calcitonine

CLR : Calcitonin receptor-Like Receptor

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNP : C-type Natriuretic Peptid

CoNS (Coagulase-Negative Staphylococci) : Staphylocoques à coagulase négative

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CRH (Corticotropin Releasing Hormone) : Corticolibérine

CTR : Calcitonin Receptor

DAG : Diacylglycérol

DCs : Cellules Dendritiques

DO : Densité Optique

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

Ef-Tu (Elongation factor Thermo unstable) : Facteur d'élongation thermosensible

Epi : Epinéphrine

EPS : Eau Physiologique

FC : Fold Change

FGF (Fibroblast Growth Factor) : Facteur de croissance des fibroblastes

G-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes

GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages

GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

GTP : Guanosine TriPhosphate

hBD (human β -defensin) : β-défensine humaine

HHS : axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien

HHT : axe Hypothalamo-Hypophyso-Thyroïdien

IFN : Interféron

IgE : Immunoglobuline E

IL : Interleukine

IP_3 : Inositol triphosphate

LB : Lymphocyte B

LDH : Lactate DésHydrogénase

LPS : LipoPolySaccharides

LT : Lymphocyte T

LTA : Acide lipotéichoïque

MAITs : Mucosal-Associated Invariant T cells

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MLST : MultiLocus Sequence Typing

MMP : Métalloprotéinase matricielle

MOI : Multiplicity Of Infection

MscL : Canaux mécanosensibles de large conductance

NE : Norépinéphrine

NF-kB : Nuclear Factor-kappa B

NGF : Nerve Growth Factor

NK cells : Cellules natural killer

NKA : Neurokinine A

NKB : Neurokinine B

NMFs (Natural Moisturizing Factors) : Facteurs naturels d'hydratation

NPs (Natriuretic Peptides) : Peptides natriurétiques

NPY : Neuropeptide Y

NRPS : NonRibosomal Peptide Synthetase

PACAP : Polypeptide activateur de l'adénylate cyclase hypophysaire

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBS : Phosphate Buffer Saline

PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKA : Protéine Kinase A

POMC : Proopiomélanocortine

PRRs : Pattern Recognition Receptors

PSMs : Phenol-Soluble Modulins

qRT-PCR : quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

QS : Quorum Sensing

RAMPs : Receptor Activity-Modifying Proteins

RCM : Reinforced Clostridial Medium

RCP : CGRP-Receptor Component Protein

RCPGs : Récepteurs Couplés aux Protéines G

RHE (Reconstructed Human Epidermis) : Epiderme humain reconstruit

RiPPs : Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SN : Système Nerveux

SNC : Système Nerveux Central

SNE : Système Nerveux Entérique

SNP : Système Nerveux Périphérique

SP : Substance P

ST : Sequence Type

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TGF : Transforming Growth Factor

TLRs : Toll-Like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) : Thyréolibérine

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

TSH (Thyroid Stimulating Hormone) **:** Thyréostimuline

UFC/mL : Unité Formant Colonie/millilitres

UV : Ultraviolet

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VIP : Peptide Vasoactif Intestinal

INTRODUCTION

Chapitre 1 – La peau et le microbiote cutané

I- Structure de la peau

La peau est le plus grand organe du corps humain, représentant environ 15% du poids corporel, et fait office de barrière entre l'intérieur du corps et l'environnement extérieur (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**). Elle est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est un épithélium stratifié squameux et kératinisé constitué lui-même de 4 sous-couches. Le derme est le tissu conjonctif sous-jacent, très vascularisé et innervé, et situé juste au-dessus d'une couche de lipides appelée hypoderme. Par sa structure, ainsi que la présence de nombreux types cellulaires et annexes cutanées (glandes sébacées, sudoripares et follicule pileux) (**Figure 1**), la peau est un organe sensoriel possédant de multiples fonctions allant de la protection contre les agressions extérieures, à la sécrétion d'hormones et de neuropeptides, en passant par la défense immunitaire ou encore la thermorégulation de l'organisme (**Gilaberte *et al.*, 2016 ; Tachdjian *et al.*, 2016**).

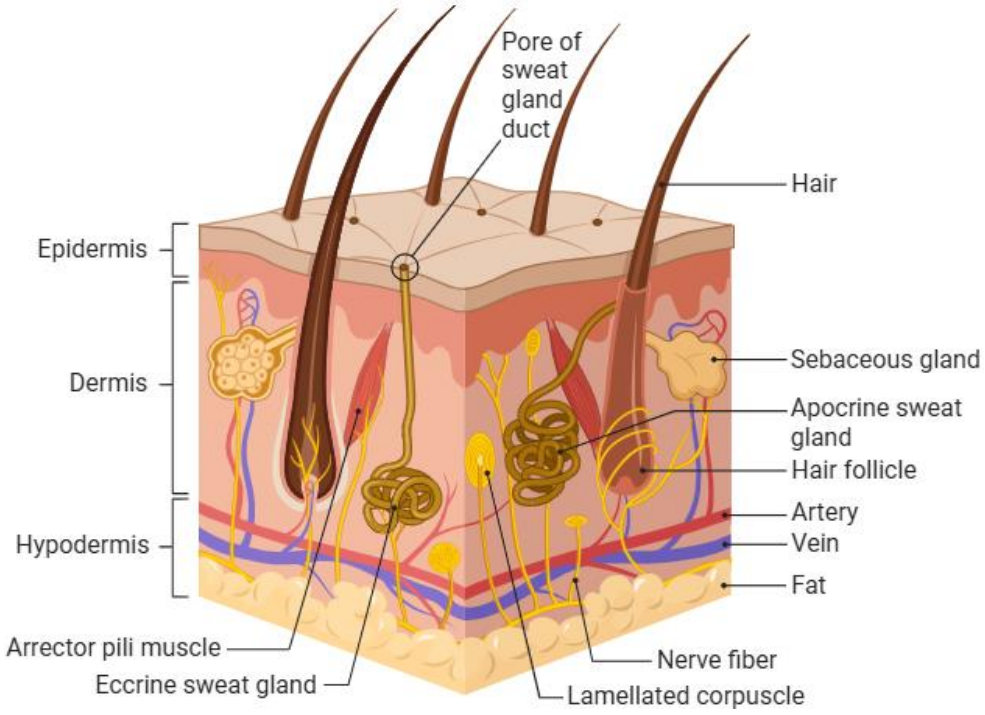


Figure 1 : Représentation schématique de la peau et des annexes cutanées *(https://BioRender.com).*

La première partie de ce Chapitre 1 s'intéresse à la structure et aux rôles des différentes couches et annexes cutanées, ainsi qu'aux fonctions de la peau en tant que barrière physique, chimique et immunologique.

1- L'épiderme

L'épiderme, la couche la plus externe de la peau, est un épithélium de revêtement d'une épaisseur allant de 0.5 mm (paupières) à 1.5 mm (paumes et plantes des pieds) (**Gilaberte *et al.*, 2016**). Il est constitué à 95% de kératinocytes mais contient également des mélanocytes, ainsi que des cellules de Langerhans et de Merkel (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**). C'est un tissu qui se régénère en permanence et dont les cellules sont reliées les unes aux autres par des systèmes de jonctions intercellulaires nommés desmosomes. Les couches de kératinocytes reposent également sur une membrane basale, servant d'ancrage au derme sous-jacent, au niveau d'une zone que l'on nomme la jonction dermo-épidermique. Un point important à mentionner concernant l'épiderme est son absence de vascularisation. Les nutriments et l'oxygène proviennent donc du derme et pénètrent par diffusion dans les couches de kératinocytes (**Nafisi and Maibach, 2018**).

L'épiderme est lui-même divisé en 4 sous-couches qui diffèrent au niveau de la morphologie et du stade de différenciation des kératinocytes. On retrouve ainsi, de la couche la plus interne à la plus externe : le *stratum basale*, le *stratum spinosum*, le *stratum granulosum* et le *stratum corneum*.

- Le *stratum basale*

Également nommé couche germinative, le *stratum basale* est constitué d'une seule couche de kératinocytes qui se divisent activement par mitose (**Barbieri *et al.*, 2014**). Ce processus donne lieu à des cellules filles dont une partie va aider à maintenir la capacité de régénération de la couche basale, tandis que l'autre va migrer vers le haut en entamant un processus de différenciation et de kératinisation. Au terme de celui-ci, les kératinocytes vont progressivement s'aplatir et perdre leurs organites pour donner les cornéocytes du *stratum corneum*, la couche la plus externe et la plus protectrice de l'épiderme. Les kératinocytes de la couche basale sont reliés entre eux grâce à des desmosomes mais également à la membrane basale de la jonction dermo-épidermique

par des hémidesmosomes (**Barbieri *et al.*, 2014**). On retrouve également deux autres types cellulaires dans cette couche, décrits plus loin dans le texte : les mélanocytes et les cellules de Merkel (**Tachdjian *et al.*, 2016**).

- Le *stratum spinosum*

Le *stratum spinosum* est constitué de 5 à 6 couches de cellules (**Tachdjian *et al.*, 2016**). Les kératinocytes qui y sont présents sont volumineux et fortement reliés les uns aux autres par de nombreuses molécules d'adhésion présentes dans les desmosomes, notamment des protéines transmembranaires telles que la desmogléine et la desmocolline (**Barbieri *et al.*, 2014**). Ils vont commencer à synthétiser des granules nommés kératinosomes, ou corps lamellaires, qui seront excrétés dans l'espace intercellulaire une fois que les cellules auront atteint le *stratum granulosum* (**Tachdjian *et al.*, 2016**). Des filaments intermédiaires de kératine se forment également, permettant de donner une certaine résistance et rigidité aux cellules (**Gilaberte *et al.*, 2016**). Enfin, entre les kératinocytes de la couche épineuse se trouvent les prolongements cytoplasmiques des mélanocytes ainsi que les cellules de Langerhans (**Tachdjian *et al.*, 2016**).

- Le *stratum granulosum*

Au fur et à mesure de leur différenciation, les kératinocytes atteignent la couche granuleuse, où ils prennent une forme plus aplatie et irrégulière (**Barbieri *et al.*, 2014**). On y retrouve 1 à 5 couches de cellules possédant des grains de kératohyaline qui contiennent notamment la profilaggrine, le précurseur de la filaggrine, une protéine jouant un rôle essentiel dans l'agrégation des filaments de kératine au niveau du *stratum corneum*. Les corps lamellaires, riches en polysaccharides, glycoprotéines et lipides, sont excrétés dans les espaces intercellulaires, formant ainsi le ciment hydrophobe de la couche cornée. Ils ont un rôle imperméabilisant et protecteur (**Tachdjian *et al.*, 2016 ; Marks and Miller, 2019**). Des enzymes exprimées dans les cellules granulaires seraient responsables de la dégradation des noyaux et organites intracytoplasmiques en fin de maturation des kératinocytes, permettant ainsi la formation de la couche cornée (**Marks and Miller, 2019**).

- Le *stratum corneum*

Le couche cornée forme une barrière semi-perméable composée de 15 à 20 assises de cornéocytes, des kératinocytes morts aplatis et énucléés qui ne contiennent plus que des fibres de kératine (**Marks and Miller, 2019**). Une structure insoluble composée de protéines et de lipides, appelée enveloppe cornée, remplace la membrane plasmique et recouvre les cornéocytes (**Gilaberte *et al.*, 2016**). On y retrouve un réseau interconnecté de protéines telles que l'involucrine et la loricrine qui donnent au *stratum corneum* son rôle très important de barrière protégeant l'organisme (**Gilaberte *et al.*, 2016**). Peu à peu, les cornéocytes perdent leurs attaches intercellulaires et se détachent de l'épiderme par un processus appelé desquamation (**Tachdjian *et al.*, 2016**).

Le processus entier, de la prolifération des cellules de la couche basale à leur différenciation progressive pour former le *stratum corneum*, dure 40 jours (**Figure 2**) (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**).

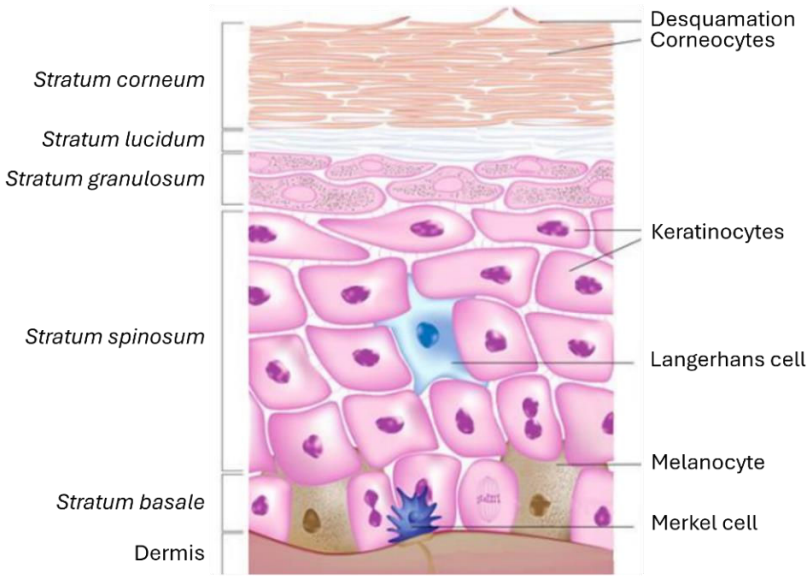


Figure 2* : *Représentation schématique des différentes couches de l'épiderme *(adapté de **Twarog, 2017**). Le stratum lucidum est une couche de transition entre le stratum granulosum et le stratum corneum. Elle n'est présente que dans les zones où la peau est épaisse (paume des mains par exemple).*

- Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dérivées de la crête neurale et localisées dans la couche basale de l'épiderme (**Figure 2**) (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**) ainsi que dans le bulge pileux et la gaine externe du follicule pileux (**Barbieri *et al.*, 2014**). Elles

synthétisent la mélanine, un pigment dérivé de la tyrosine et stocké dans des organites appelés mélanosomes (**Marks and Miller, 2019**). Grâce à leurs prolongements cytoplasmiques sous forme de dendrites, la mélanine est transférée aux kératinocytes adjacents (**Barbieri *et al.*, 2014**). Il est estimé que chaque mélanocyte peut fournir de la mélanine à environ 30 à 40 kératinocytes environnants afin de venir protéger l'ADN contenu dans le noyau de ces cellules contre les dommages causés par le rayonnement ultraviolet (UV) (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**). La différence de pigmentation de la peau dépend du nombre et de la taille des mélanosomes, ainsi que de leur dispersion dans la peau (**Marks and Miller, 2019**).

- Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans forment un groupe de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), majoritairement situées dans le *stratum spinosum* (**Figure 2**) et qui migrent vers les ganglions lymphatiques après stimulation dans l'épiderme (**Tachdjian *et al.*, 2016**). Le rôle des CPA est de faire le lien entre immunité innée et immunité adaptative en présentant des fragments d'antigènes aux lymphocytes T, permettant ainsi leur expansion clonale après reconnaissance spécifique via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II dans ce cas précis (**Barbieri *et al.*, 2014**). Souvent considérées comme des cellules dendritiques (DCs), des études suggèrent que les cellules de Langerhans proviennent de macrophages résidants dans la peau, qui vont acquérir un phénotype et des fonctions semblables à ceux des DCs (**Kabashima *et al.*, 2019**). Ces cellules se trouvent réparties uniformément dans l'épiderme supra-basal où elles représentent jusqu'à 5% des cellules de l'épiderme (**Marks and Miller, 2019**). Elles vont être capables de phagocyter les antigènes qu'elles rencontrent avant de réguler à la baisse le taux de cadhérine E, la protéine leur servant de point d'ancrage aux kératinocytes, afin de s'en détacher et de migrer vers les ganglions lymphatiques (**Barbieri *et al.*, 2014**).

- Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont des cellules neuroendocrines épithéliales situées dans la couche basale de l'épiderme (**Figure 2**) (**Marks and Miller, 2019**) et autour de la région renflée des follicules pileux (**Barbieri *et al.*, 2014**). Elles sont reliées aux kératinocytes via des desmosomes (**Marks and Miller, 2019**) mais peuvent aussi être associées à un axone

nerveux, formant une zone de contact de type synaptique (**Barbieri *et al.*, 2014**). Présentes sous forme isolée comme en amas nommés « corpuscules tactiles », les cellules de Merkel ont donc une grande sensibilité tactile au toucher léger et assure un rôle important dans la sensation tactile fine (**Arda *et al.*, 2014 ; Tachdjian *et al.*, 2016**). Elles sont également capables de sécréter des marqueurs neuroendocriniens comme la chromogranine A (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**) et des neuropeptides tels que le peptide intestinal vasoactif (VIP), le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP), la Substance P (SP), la met-enképhaline, la somatostatine ou encore l'octapeptide cholécystokinine (CCK8) (**Maksimovic *et al.*, 2013**). Ceci suggère que les cellules de Merkel pourraient avoir des fonctions endocrines et paracrines (**Barbieri *et al.*, 2014**).

La jonction dermo-épidermique constitue une interface permettant de relier l'épiderme et le derme. Elle comprend des hémidesmosomes qui attachent, via des intégrines, les cellules de la couche germinative à la membrane basale, qui va à son tour mettre en relation le cytosquelette de ces cellules avec le réseau fibreux du derme. Cette membrane basale est elle-même divisée en deux parties : la lame basale en contact avec les cellules de l'épiderme via des fibres de collagène de type IV ainsi que des glycoprotéines ; et la lame réticulée qui est élaborée par les cellules du derme et constituée de fibres de collagène de type III et d'une matrice amorphe. Des fibres de collagène de type VII du derme traversent la membrane basale et se lient à la membrane plasmique des cellules de l'épiderme au niveau des hémidesmosomes (**Tachdjian *et al.*, 2016**).

2- Le derme

Le derme est un tissu conjonctif d'une épaisseur de 2 à 4 mm contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et de nombreuses annexes cutanées (follicules pileux, glandes sudoripares et sébacées) qui seront détaillées plus loin (**Wong *et al.*, 2016 ; Marks and Miller, 2019**). Il est composé d'un gel de mucopolysaccharides maintenu par des fibres de collagène et des fibres élastiques produites en majorité par les fibroblastes. Le collagène représente jusqu'à 70% du derme et est responsable de sa force et de sa solidité tandis que la présence d'élastine permet de maintenir une certaine souplesse. Des protéoglycanes sont également présents et participent à la viscosité et à l'hydratation du derme. Cette matrice extracellulaire est constamment dégradée par des

enzymes protéolytiques appelées métalloprotéinases matricielles (MMP) avant d'être renouvelée (**Gilaberte *et al.*, 2016**). D'une épaisseur de 0.5 à 5 mm, on peut diviser ce derme en deux couches : le derme papillaire, fin et constitué d'un réseau lâche de fibres de collagène ; et le derme réticulaire, épais et en contact avec l'hypoderme (**Barbieri *et al.*, 2014**). On y retrouve également de nombreuses cellules de l'immunité (fibroblastes, lymphocytes, mastocytes, cellules dendritiques et histiocytes) ainsi que les corpuscules sensoriels de Pacini et de Meissner (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**) qui seront abordés dans le Chapitre 2.

3- L'hypoderme

La couche lipidique située sous le derme assure un soutien mécanique, tout en jouant un rôle dans l'isolation et la thermorégulation et en servant de réserve d'énergie pour alimenter les couches supérieures de la peau (**Barbieri *et al.*, 2014**). Elle peut atteindre jusqu'à 3 cm dans la région abdominale et est composée de lobules d'adipocytes séparés par des cloisons fibreuses, traversées par des artères, des veines et des nerfs (**Wong et al., 2016 ; Nafisi and Maibach, 2018**). La production d'hormones, telles que la leptine, confère un rôle endocrine à l'hypoderme, qui contribuerait ainsi à la régulation de l'appétit et à l'équilibre énergétique (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**). D'après **Marks and Miller (2019)**, les cellules souches adipeuses auraient un rôle dans la cicatrisation des plaies, le soutien et la croissance des follicules pileux ainsi que dans la protection contre le photo-vieillissement.

4- Les annexes cutanées

Les annexes cutanées comprennent les poils et follicules pileux associés, les glandes sébacées, les glandes sudoripares eccrines et apocrines (**Figure 2**), ainsi que les ongles (**Tachdjian *et al.*, 2016**). Elles sont dérivées de l'épiderme mais sont, à l'exception des ongles, toutes situées dans le derme (**Marks and Miller, 2019**).

Le follicule pileux comprend le poil, une structure kératinisée qui dérivent d'invaginations des couches de l'épiderme, de même que ses gaines interne et externe, un muscle érecteur du poil et une glande sébacée (**Tachdjian *et al.*, 2016**). La base du follicule pileux est constituée par la papille dermique, riche en vaisseaux sanguins et en nerfs sensoriels, de même que par le bulge pileux qui contient des cellules à prolifération rapide. Celles-ci produisent la tige du poil et sont accompagnées de mélanocytes qui

fournissent la pigmentation (**Barbieri *et al.*, 2014**). La contraction des cellules musculaires lisses suite à différents stimuli provoque un redressement du poil, une action qui est sous le contrôle du système nerveux autonome (**Barbieri *et al.*, 2014 ; Tachdjian *et al.*, 2016**). On retrouve les poils sur l'ensemble du corps, excepté la paume des mains, la plante des pieds, les lèvres ainsi que certaines parties de l'appareil génital (**Tachdjian *et al.*, 2016**).

Comme mentionné ci-dessus, les glandes sébacées sont généralement associées au follicule pileux et se forment à partir d'un bourgeon de la gaine épithéliale externe du follicule. Celui-ci s'enfonce et se ramifie ensuite dans le derme (**Tachdjian *et al.*, 2016**). Chez le fœtus, ces glandes permettent la sécrétion du *vernix caseosa*, une substance blanche graisseuse qui protège la peau des nouveau-nés. Elles s'inactivent ensuite jusqu'à la puberté, moment où la production d'androgènes stimule à nouveau leur activité et entraine la sécrétion de sébum (**Tachdjian *et al.*, 2016**). Cette substance composée d'acides gras, de triglycérides, de phospholipides, de cholestérol et de débris cellulaires se dépose à la surface de l'épiderme afin de le protéger des frottements et de la déshydratation. Le sébum possède également des propriétés bactéricides et antifongiques. Tout comme les poils, on trouve ces glandes de façon hétérogène sur la surface du corps, avec une absence totale au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds mais une forte abondance sur la face et le cuir chevelu (**Tachdjian *et al.*, 2016 ; Marks and Miller, 2019**).

Les glandes sudoripares sont des glandes exocrines dont les canaux excréteurs s'ouvrent à la surface de l'épiderme ou au niveau d'un follicule pileux. Il en existe deux types : les glandes eccrines et les glandes apocrines (**Tachdjian *et al.*, 2016**). Les premières produisent la sueur qui est libérée à la surface de la peau pour la régulation de la température corporelle. Cette substance composée d'eau, de chlorure de sodium, de potassium, d'acide urique et d'ammoniaque contient également des cytokines et des enzymes protéolytiques qui suggèrent un rôle des glandes eccrines dans l'immunité de la peau (**Barbieri *et al.*, 2014 ; Tachdjian *et al.*, 2016**). Les glandes apocrines, quant à elles, restent inactives jusqu'à la puberté et possèdent un canal qui s'ouvre généralement dans la gaine d'un poil (**Barbieri *et al.*, 2014 ; Tachdjian *et al.*, 2016**). On les retrouve dans des zones spécialisées, telles que les creux axillaires et les régions

génitales, et leur développement dépend des hormones sexuelles. Elles produisent un mélange de lipides et de protéines initialement inodore mais qui acquiert une odeur après dégradation par le microbiote bactérien et sous l'effet de ses métabolites (**Tachdjian *et al.*, 2016**).

Les ongles sont des plaques de kératines dures et plates retrouvées à l'extrémité des doigts et des orteils et facilitant les mouvements de saisie fin ainsi que les pincements (**Tachdjian *et al.*, 2016 ; Marks and Miller, 2019**).

II- Fonctions de la peau

1- Barrière physique et chimique

La fonction primaire de la peau est de servir de barrière physique entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme (**Marks and Miller, 2019**). Cette barrière fonctionne de manière bidirectionnelle en évitant les pertes de liquides et d'électrolytes, tout en protégeant contre les infections, la pénétration de substances toxiques et les agressions externes telles que les rayons UV (**Figure 3**) (**Arda *et al.*, 2014 ; Nafisi and Maibach, 2018**). Ce rôle de protection est majoritairement endossé par le *stratum corneum* qui possède un réseau interconnecté de protéines dans l'enveloppe cornée et une matrice riche en lipides lui donnant une structure robuste et étanche. En complément, l'hypoderme assure quant à lui des fonctions d'isolation et d'amortissement des chocs, également primordiales pour la protection de l'organisme (**Lai-Cheong and McGrath, 2021**).

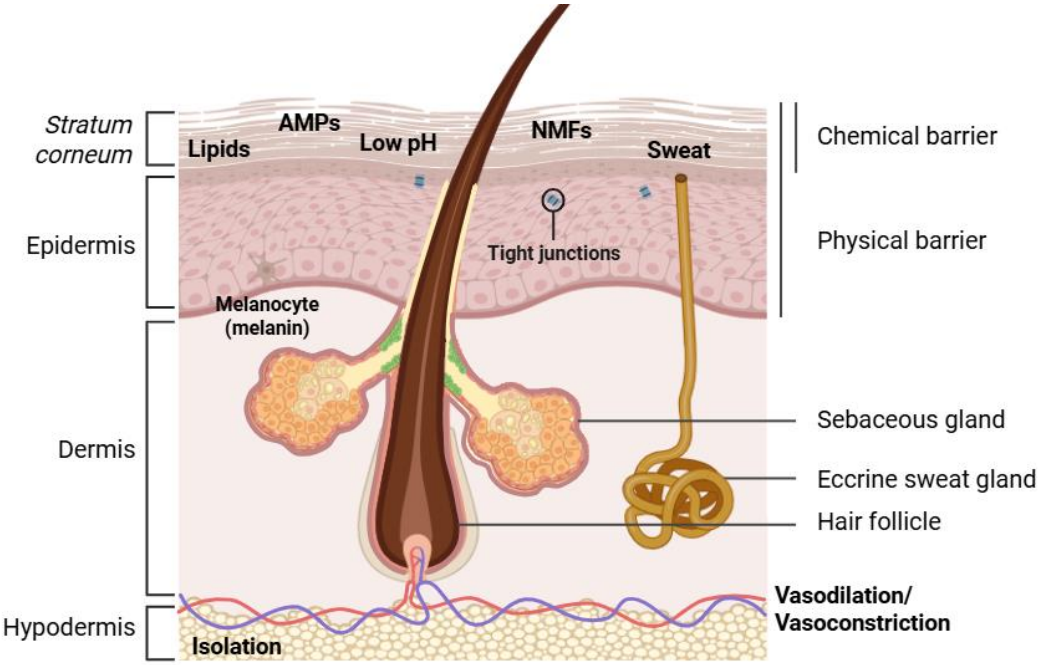


***Figure 3** : **Schéma des différents facteurs faisant de la peau une barrière physique et chimique robuste. AMPs** : peptides antimicrobiens ; **NMFs** : facteurs naturels d'hydratation (adapté de **Eyerich et al., 2018**).*

Le rayonnement ultraviolet (UV) est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde comprise entre 200 et 400 nm. On distingue les UVA (320-400 nm), les UVB (290-320 nm) et les UVC (200-290 nm). La majorité des UVA et une petite partie des UVB sont capables de traverser la couche d'ozone et vont être responsable du vieillissement prématuré de la peau ainsi que de l'apparition de certains cancers cutanés (**Venus *et al.*, 2010**). Les UVB, en particulier, vont pouvoir activer une cascade de cytokines et de médiateurs vasoactifs et neuroactifs qui vont induire une réponse inflammatoire de la peau et provoquer les « coups de soleil » (**D'Orazio *et al.*, 2013**). Les UVC sont hautement carcinogènes mais sont normalement absorbés au niveau de la couche d'ozone et n'atteignent pas la terre. Ces UV vont causer des dommages photochimiques à l'ADN en provoquant la dimérisation des bases pyrimidiques ainsi que des mutations par génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les UVA (**D'Orazio *et al.*, 2013 ; Cadet and Douki, 2018**). Ils vont également pouvoir impacter les mécanismes de réparation de l'ADN et entraîner une suppression de l'immunité à médiation cellulaire (**Venus *et al.*, 2010**). L'augmentation de l'activité des mélanocytes, et donc de la production de mélanosomes et de mélanine après exposition au soleil, est un autre exemple d'une fonction essentielle de la peau permettant de protéger l'ADN et les constituants cellulaires des dommages causés par les UV (**Venus *et al.*, 2010**).

La peau est également impliquée dans la régulation de la température corporelle, un paramètre essentiel de l'homéostasie. Outre la présence de thermorécepteurs au froid et à la chaleur qui entraînent des adaptations comportementales, la thermorégulation passe également par des phénomènes de vasodilatation ou vasoconstriction des vaisseaux sanguins présents dans la peau (**Venus et al., 2010 ; Gilaberte et al., 2016**). La production de sueur par les grandes sudoripares eccrines et l'érection des poils dans les follicules pileux participent également à la régulation de la température corporelle (**Gilaberte *et al.*, 2016 ; Lai-Cheong and McGrath, 2021**).

Le rôle de barrière chimique se réfère aux facteurs capables de contribuer à l'acidité de la surface de la peau, de même qu'à un groupe de composés que l'on nomme les

« facteurs naturels d'hydratation » (NMFs). Ces facteurs hygroscopiques, retrouvés au niveau des cornéocytes, désignent notamment les acides aminés et leurs dérivés, le lactate, l'urée et les électrolytes. Les NMFs vont affecter aussi bien le pH, que les propriétés physiques ou encore l'hydratation de la couche cornée (**Eyerich *et al.*, 2018**). Un autre élément important est la sécrétion par les kératinocytes et les glandes sébacées de triglycérides, de cholestérol, d'esters cireux et de squalène. Le contact de ces composés avec les microorganismes présents à la surface de la peau entraîne leur hydrolyse en acides gras libres et contribue à l'acidification de la peau (**Eyerich *et al.*, 2018**). Ce pH acide est essentiel pour le fonctionnement des enzymes impliquées dans la génération des lipides de la couche cornée. De même, combiné à la sueur, il est également requis pour l'efficacité de certains peptides antimicrobiens (AMPs) ainsi que pour favoriser la colonisation par des espèces bactériennes commensales par rapport aux espèces pathogènes (**Eyerich *et al.*, 2018**).

La peau est également un organe senseur important comportant de nombreuses structures nerveuses associées à la douleur, au toucher ou encore à la pression. Ces structures, de même que la fonction endocrine de la peau feront l'objet d'une explication plus détaillée dans le Chapitre 2 et ne sont donc pas abordées ici.

Ces fonctions de barrière physique et chimique interagissent étroitement ensemble ainsi qu'avec le système immunitaire de la peau et les microorganismes constitutifs du microbiote cutané. Bien que ces différents éléments soient abordés séparément dans ce manuscrit, il est important de noter qu'ils sont en interaction constante et vont mutuellement s'influencer pour maintenir au mieux l'homéostasie de la peau.

2- Barrière immunologique

Comme dans tout organe du corps humain, les différents compartiments de la peau hébergent de nombreuses cellules de l'immunité innée et acquise permettant ainsi d'assurer une protection contre les organismes pathogènes et les substances irritantes (**Figure 4**).

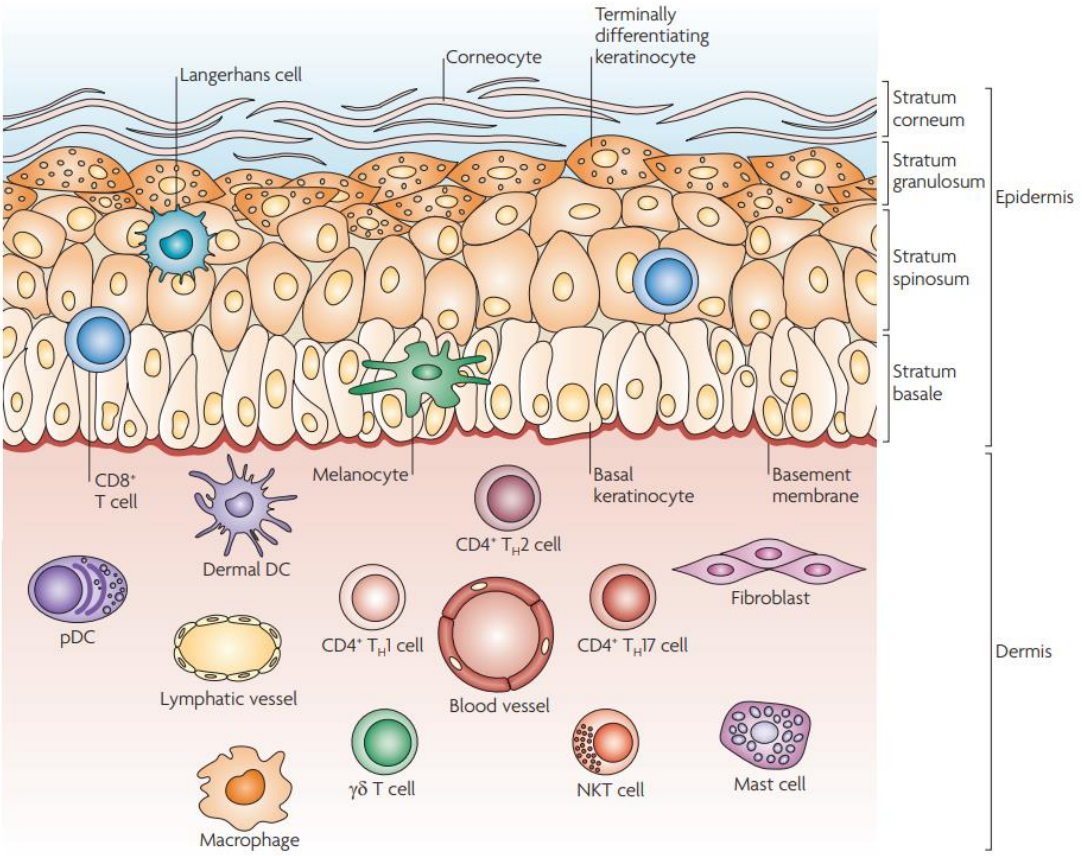


Figure 4 *:* ***Schéma représentant les différents effecteurs immunitaires cutanés.*** *On retrouve ainsi deux types de cellules spécialisées dans l'épiderme, les cellules de Langerhans et les mélanocytes producteurs de mélanine, ainsi que des lymphocytes T CD8⁺. Dans le derme se trouvent les différents types cellulaires impliquées dans les réponses immunitaires innées et adaptatives : les cellules dendritiques (pDC, Dermal DC), les macrophages, les lymphocytes T (LT) (CD4⁺T_H1, LT γδ, CD4⁺T_H2, CD4⁺T_H17), les cellules « Natural Killer » (NKT) et les mastocytes (Mast cells). Sont également représentés les vaisseaux correspondant aux circulations sanguines et lymphatiques, ainsi que les fibroblastes (****Nestle et al., 2009****).*

Ce système immunitaire cutané dépend des cellules résidentes de la peau, telles que les kératinocytes, cellules de Langerhans, mastocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages et lymphocytes ; ainsi que de médiateurs solubles sécrétés par ces cellules, comme les AMPs, les cytokines et les chimiokines (**Abdallah *et al.*, 2017**).

1. Système immunitaire inné

Lorsqu'il y a rupture de l'intégrité de la barrière cutanée, la réponse immunitaire innée est la première à se mettre en place. Elle est non spécifique et va répondre de la même manière à tout organisme, matériel ou substance considéré comme étranger. Sa mise en place est rapide et va dépendre de tout un panel de cellules immunitaires qui vont

pouvoir détruire l'agent pathogène par phagocytose, et recruter d'autres cellules de l'immunité en sécrétant des cytokines. Les acteurs majeurs de cette réponse sont les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules Natural Killer (NK) qui vont pouvoir détecter la présence d'un danger microbien par la reconnaissance de ce l'on nomme des Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Les PAMPs correspondent à de véritables signatures microbiennes conservées durant l'évolution, absentes chez l'hôte, et nécessaires à la survie des microorganismes. On y retrouve donc les constituants des membranes ou parois bactériennes (lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycane) mais également la flagelline, protéine majoritaire du flagelle bactérien, et les acides nucléiques. Ces composants vont être détectés par les Pattern recognition receptors (PRRs) des cellules immunitaires. Ils sont constitués de deux catégories de protéines transmembranaires : les Toll-Like Receptors (TLRs) et les C-Type Lectin Receptors (CLRs) ; ainsi que de deux types de récepteurs cytosoliques : les Retinoic acid-inducible gene I like receptors (RLRs) et les NOD-like receptors (NLRs) (**Abdallah *et al.*, 2017**). Les TLRs restent à ce jour la famille de PRRs la mieux caractérisée et compte 10 membres chez l'humain, chacun étant spécialisé dans la détection d'un des PAMPs mentionné ci-dessus. Le déclenchement de la réponse immunitaire par ces TLRs passe par l'activation des voies NF-kB et MAPK et par des protéines adaptatrices telles que MyD88, TIRAP/Mal, TRIF et TRAM (**Abdallah *et al.*, 2017**). Des conséquences importantes de l'activation de l'immunité innée sont la mise en place d'une réponse inflammatoire, que l'on retrouve en général sur le lieu de rupture de la barrière cutanée, et le recrutement des leucocytes circulants. Les cellules immunitaires résidentes vont également jouer un rôle important dans la réparation de la barrière cutanée après élimination du corps étranger (**Eyerich *et al.*, 2018**).

Il a été démontré que les kératinocytes eux-mêmes expriment une diversité de TLRs, capables de reconnaitre les PAMPs des microorganismes, et peuvent également répondre à d'autres stimuli (UV, substances chimiques) en induisant une réponse immunitaire innée (**Abdallah *et al.*, 2017 ; Kabashima *et al.*, 2019**). Cette induction passe par la production d'une grande variété de molécules de communication du système immunitaire, à savoir des cytokines (IL-1, TNF-α, IL-6, G-CSF, TGF-β, IL-10, IL-33) des chimiokines (CXCL-8, IP-10) ainsi que des facteurs de croissance (IL-6, GM-CSF,

TGF-α) et des AMPs (β-défensines, cathélicidines, protéines de la famille S100). Ces molécules servent aussi bien à la neutralisation des agents pathogènes qu'au recrutement d'autres cellules de l'immunité (**Abdallah *et al.*, 2017 ; Kabashima *et al.*, 2019**). Bien que les kératinocytes soient considérés comme de véritables sentinelles immunitaire, d'autres types cellulaires vont également intervenir dans la réponse innée. C'est le cas des cellules de Langerhans, décrites précédemment dans ce chapitre, qui sont étroitement associées aux kératinocytes et qui vont d'ailleurs participer à faire le lien entre immunité innée et adaptative en allant activer les lymphocytes T naïfs dans les ganglions lymphatiques.

Il semblerait que la production de lipides par les kératinocytes et sébocytes contribue également au bon fonctionnement du système immunitaire cutané. Ainsi l'acide oléique et l'acide linoléique produits par les sébocytes provoquent la différenciation des monocytes en macrophages actifs et contribuent à la survie des lymphocytes T (LT) mémoires (**Lovászi *et al.*, 2017**). De même, l'utilisation des acides gras libres par les LT mémoires résidents de la peau, grâce aux protéines FABP4 et FABP5 notamment, contribue à leur survie et longévité dans les tissus (**Pan *et al.*, 2017**).

Les mastocytes, retrouvés près des capillaires sanguins du derme, sont un autre type cellulaire important du système immunitaire cutané. Ils expriment à leur surface un récepteur de haute affinité pour le fragment constant des immunoglobulines E (IgE), leur permettant ainsi de lier l'anticorps pendant de longues périodes. Cette liaison provoque la dégranulation des mastocytes et la libération de prostanoïdes, de cytokines pro-inflammatoires et d'histamine, cette dernière étant impliquée dans les réactions allergiques (**Xu *et al.*, 2019**). Les mastocytes vont ainsi favoriser la vasodilatation et le recrutement des neutrophiles dans le cadre de la réponse immunitaire innée (**Barbieri *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2019**).

La production d'AMPs est un autre élément important de la réponse immunitaire cutanée. Les AMPs sont une classe de petits peptides faisant partie de la réponse immunitaire innée de différents organismes et possédant des effets inhibiteurs contre les bactéries, les champignons, les parasites et les virus (**Huan *et al.*, 2020**). Ils présentent une activité chimiotactique qui leur est propre, tout en renforçant celle des cellules immunitaires, et déclenchent la différenciation de ces dernières. En outre, les AMPs

favorisent la libération de cytokines pro- et anti-inflammatoires et de ROS, peuvent lier et inactiver les endotoxines bactériennes, stimuler l'angiogenèse et améliorer la cicatrisation des plaies (**Rademacher *et al.*, 2021**). Les AMPs présents sur la peau appartiennent majoritairement aux deux grandes familles que sont les cathélicidines et les β-défensines (**Gallo and Hooper, 2012**) qui sont synthétisées par les kératinocytes, les glandes sébacées, les glandes sudoripares eccrines ainsi que les mastocytes présents dans le derme (**Xu *et al.*, 2019**). Les cathélicidines sont caractérisées par un domaine N-terminal conservé et un domaine C-terminal antimicrobien variable qui peut être libéré après clivage par des protéases. LL-37 est la partie C-terminale de la seule cathélicidine (hCAP-18) identifiée chez l'humain et est principalement exprimée par les neutrophiles et les cellules épithéliales (**Tjabringa *et al.*, 2005**). Les cathélicidines peuvent interagir avec les TLRs et vont favoriser la migration des leucocytes et l'angiogenèse, ainsi que la sécrétion de cytokines et chimiokines (**Xu *et al.*, 2019**). Le peptide LL-37, en particulier, possède une large activité antimicrobienne, que cela soit contre les bactéries à Gram positif comme négatif, les champignons et les levures (**Rademacher *et al.*, 2021**). Les défensines sont constituées de feuillets bêta et de 6 résidus cystéine connectés par des ponts disulfures. La position de ces ponts fait la distinction entre deux familles, les α- et les β-défensines (hBD) (**Rademacher *et al.*, 2021**). Les hBD sont retrouvées dans les couches supérieures de l'épiderme et comptent quatre membres chez l'humain. Ainsi, l'hBD-1 est exprimée de manière constitutive dans les tissus épithéliaux et peut être induite par le LPS et le peptidoglycane. Le hBD-2 est induit dans les lésions cutanées inflammées par le LPS, le TNF-α, l'IL-1β et la présence de bactéries (**Niyonsaba *et al.*, 2007**). C'est un AMP particulièrement efficace contre les bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et les levures comme *Candida albicans* (**Rademacher *et al.*, 2021**). Au contraire, le hBD-3 n'est pas spécifique des tissus épithéliaux mais son expression dans les kératinocytes est également stimulée par les cytokines et la présence de bactéries. L'expression de hBD-4 est induite en cas d'infection bactérienne ainsi que par le phorbol 12-myristate 13-acétate dans les cellules épithéliales (**Niyonsaba *et al.*, 2007**). A noter qu'en l'absence d'infection, les AMPs sont exprimés dans la peau à un niveau sub-létal pour les bactéries et compatible avec l'établissement d'un microbiote diversifié (**Lai and Gallo, 2008**).

2. Système immunitaire adaptatif

La réponse immunitaire adaptative va prendre le relais de la réponse innée et permet une reconnaissance spécifique d'un antigène donné. Elle est plus longue à se mettre en place et va reposer sur l'intervention des lymphocytes B (LB) et T. Ces cellules initialement naïves vont pouvoir se diviser, par un processus nommé expansion clonale, après exposition à l'antigène approprié. Leur différenciation donnera lieu à des cellules effectrices, qui vont agir immédiatement contre le corps étranger, et des cellules mémoire qui permettront une réponse plus rapide en cas de deuxième rencontre avec le même antigène. Ce sont les IgE, liées aux mastocytes, ainsi que les LT qui vont jouer un rôle majeur dans la réponse immunitaire adaptative au niveau cutané. On retrouve les LT à côté des veinules papillaires et annexes cutanées, ainsi que sous la jonction dermo-épidermique (**Abdallah *et al.*, 2017 ; Xu *et al.*, 2019**). Les cellules endothéliales de la paroi des artérioles, capillaires et veinules de la peau expriment les sélectines E et P qui permettent notamment aux LT circulants de se lier par l'intermédiaire de leurs récepteurs : le Cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) et le P-selectin glycoprotein ligand (PSGL) respectivement (**Xu *et al.*, 2019**). L'activation de l'immunité adaptative est médiée par des CPA telles que les DCs, dont font partie les cellules de Langerhans. Après migration dans les ganglions lymphatiques, elles vont pouvoir activer les LT CD8, de même que favoriser le développement des LT CD4 régulateurs (Tregs), des LT auxiliaires Th17 et des LT folliculaires helper (Tfh) qui interagissent avec les LB et aident donc à la production d'anticorps (**Xu *et al.*, 2019**).

La peau contient aux alentours de 20 milliards de LT mémoires retrouvés aussi bien dans l'épiderme que le derme (**Watanabe *et al.*, 2015 ; Eyerich *et al.*, 2018**). Les travaux de **Watanabe *et al.* (2015)** sur un modèle xénogreffe de peau réalisé chez la souris ont permis l'identification de quatre populations de LT mémoires, dont deux résidentes (TEM et TRM) et deux circulantes (TMM et TCM), ayant des localisations et des fonctions différentes. Il semblerait que les TEM soit les premiers à entrer en jeu dans la réponse immunitaire et qu'ils possèdent une action immédiate par sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN-γ avant de disparaitre une fois l'infection terminée. Ils vont alors laisser leur place aux TCM qui résident dans les ganglions lymphatiques et vont plutôt être impliqués dans le maintien d'une mémoire immunologique sur le long terme. Une

fois activés par une deuxième présentation du même antigène, ils vont exprimer des récepteurs qui vont entraîner leur relocalisation au niveau cutané. Les TRM vont avoir tendance à rester dans les tissus après infection afin de pouvoir agir en cas de nouvelle rencontre avec l'antigène alors que le rôle des TMM est encore en cours d'investigation, bien qu'il semblerait qu'ils résident dans la peau après résolution de l'infection (**Abdallah *et al.*, 2017 ; Xu *et al.*, 2019**).

Les éléments cités ci-dessus ne sont qu'un aperçu du fonctionnement du système immunitaire cutané. Celui-ci repose aussi bien sur des cellules immunitaires que sur l'interaction de celles-ci avec les autres constituants de la peau et avec le microbiote. Le rôle de ce dernier dans la régulation des réponses immunitaires sera abordé plus loin dans ce Chapitre.

III- Le microbiote cutané

La peau abrite la deuxième plus large population microbienne du corps humain appelée microbiote cutané. Elle est en effet colonisée par une grande diversité de bactéries, champignons, levures, archées et virus et constitue un écosystème complexe comprenant divers habitats qui se distinguent selon les caractéristiques physiques, l'épaisseur de la peau, la présence de plis, la densité des follicules pileux et des glandes sébacées et sudoripares (**Grice and Segre, 2011**). En prenant en compte l'ensemble des annexes cutanées, cela représente une surface d'environ 25 m^2 (**Gallo, 2017**), propice à la colonisation et aux échanges avec les microorganismes. La présence de ce microbiote est d'autant plus importante qu'il participe grandement à l'éducation du système immunitaire, à la différenciation des kératinocytes et à la régénération cutanée, et qu'il fournit même une défense directe contre les microorganismes pathogènes (**Harris-Tryon and Grice, 2022**).

Dans la partie suivante, la composition du microbiote cutané, ainsi que sa mise en place et les différents facteurs influençant sa composition seront discutés. De même, les multiples rôles de ces communautés de microorganismes, ainsi que les maladies pouvant découler d'une dysbiose seront abordés.

1- Composition du microbiote cutané

Le microbiote cutané est généralement divisé en flore permanente et en flore transitoire. La flore permanente correspond à un ensemble de microorganismes présent de manière prolongée sur la peau et est souvent considérée comme commensale. A l'inverse, la flore transitoire provient généralement de l'environnement et ne va persister que pendant quelques jours, sans s'établir de façon pérenne.

Tandis que la surface de l'épiderme constitue un milieu aérobie acide, fortement salé et déshydraté, les invaginations provoquées par la présence des follicules donnent lieu à un environnement anaérobie et très riche en lipides (**Chen *et al.*, 2018**). Malgré une structure très conservée, les différents sites corporels offrent une variété de microenvironnements qui se différencient en termes d'exposition aux rayons UV, de pH (4,2 à 7,9), de température (30°C à 37°C), d'humidité, de teneur en sébum et de topographie, permettant ainsi de les classer selon leurs caractéristiques physiologiques en trois grandes catégories : sébacés, humides ou secs (**Schmid-Wendtner and Korting, 2006 ; Byrd *et al.*, 2018 ; Boxberger *et al.*, 2021**). Au vu de ces différences entre les couches supérieures de la peau et les compartiments plus profonds des annexes cutanées, la composition des communautés microbiennes présente donc des variations liées à cette localisation. Ainsi, les méthodes d'échantillonnage (écouvillonnage, grattage de surface, biopsie, *etc.*) vont avoir une importance toute particulière dans les études sur les communautés microbiennes de la peau (**Byrd *et al.*, 2018**). La plupart des études réalisées à grande échelle se basent sur des méthodes rapides et non invasives telles que l'écouvillonnage ou le grattage de surface (**Grice *et al.*, 2008**). Dans ce cas, les prélèvements ne concernent que l'épiderme, et plus particulièrement la couche la plus externe de celui-ci qui est le *stratum corneum*. Dans d'autres cas, lorsque les prélèvements ne se concentrent pas sur une partie trop visible du corps comme le visage, la biopsie au trépan est envisageable (**Grice *et al.*, 2008**). Cette technique, utilisée sur les modèles animaux aussi bien que chez l'Homme, permet de récupérer une carotte de peau et rend mieux compte de la diversité du microbiote cutané. Il est cependant important de noter que tout prélèvement cutané chez l'Homme (y compris écouvillonnage et *a fortiori* biopsie) entre dans le champ des investigations cliniques et

doit être réalisé par un clinicien après acceptation par les autorités compétentes selon sa catégorie (Centre d'Investigation Clinique, ANSM).

Un autre paramètre important à prendre en compte est la méthode d'analyse de ces communautés microbiennes. Initialement, la plupart des études sur le microbiote cutané reposaient sur une approche culturale. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle tend à sélectionner des microorganismes capables de croître en milieu artificiel. Elle va favoriser ceux qui sont plus facilement cultivables tels que les *Staphylococcus* spp., au détriment d'autres genres bactériens dont les conditions de culture sont plus particulières tels que les *Cutibacterium* et *Corynebacterium* (**Byrd *et al.*, 2018**). De même, cette méthode de culture omet la fraction de microorganismes viables mais non cultivables, dont la présence est non négligeable dans tout type d'échantillon, ainsi que les microorganismes que nous ne savons pas ou peu cultiver (archées en particulier). Grâce au développement des méthodes de séquençage, de nouveaux outils ont été mis à disposition pour l'étude du microbiote cutané. Ces approches se sont initialement basées sur des variations de séquence entre différents marqueurs phylogénétiques propres à chaque type de microorganismes. On retrouve ainsi l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) pour les bactéries ou l'Internal transcribed spacer 1 (ITS1) pour les eucaryotes tels que les levures (**Byrd *et al.*, 2018**). Par la suite a émergé l'utilisation des méthodes de métagénomique permettant de séquencer l'ensemble du matériel génétique présent dans un échantillon, donnant ainsi des informations sur l'abondance relative de chaque microorganisme avec une résolution pouvant aller jusqu'à l'espèce voire la souche (**Byrd *et al.*, 2018**).

La composition du microbiote cutané, en fonction des différentes zones corporelles (sébacées, humides ou sèches) est présentée sur la **Figure 5** et détaillée dans les points suivants.

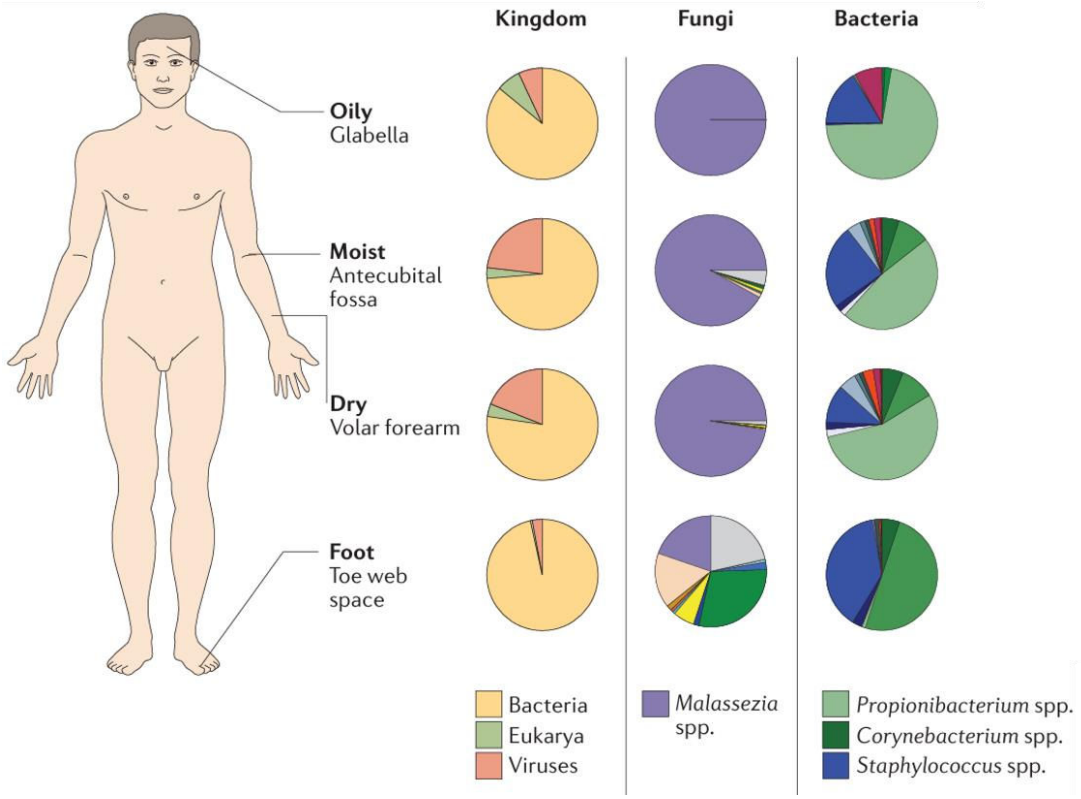


Figure 5 *:* ***Composition des communautés microbiennes cutanées d'un individu sain*** *suite à la sélection de quatre sites permettent de représenter les principaux microenvironnements de la peau : le front (sébacé) ; la fosse antécubitale (humide) ; la face palmaire de l'avant-bras (sèche) ; et l'espace interdigital (pied). Les diagrammes circulaires représentent les abondances relatives par règne puis genre pour les champignons et les bactéries. Les couleurs des principaux taxa sont identifiées dans la légende tandis que les couleurs non indiquées correspondent à la catégorie « Autres » (****Byrd et al., 2018****). Propionibacterium acnes est l'ancien nom donné à la bactérie Cutibacterium acnes (****Scholz and Kilian, 2016****).*

1. Communautés bactériennes

De manière générale, la flore commensale bactérienne du microbiote cutané appartient aux quatre phyla suivants : Actinobactéries, Firmicutes, Protéobactéries et Bacteroidetes (**Baldwin *et al.*, 2017**). Elle est ainsi composée en majorité de *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Cutibacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Enhydrobacter* spp. et *Veillonella* spp.. Les sites sébacés (tels que le visage et le torse) sont dominés par la présence d'espèces du genre *Cutibacterium* (anciennement *Propionibacterium* ; **Scholz and Kilian, 2016**) et *Staphylococcus*, tandis que les environnements humides (aisselles, coudes ou encore intérieur des genoux) abritent des espèces des genres *Staphylococcus* ou *Corynebacterium*, ainsi que des *β*-

Proteobacteria (**Byrd *et al.*, 2018 ; Chen *et al.*, 2018**). Ces dernières, accompagnées des *Flavobacteriales*, sont prévalentes dans les zones sèches telles que l'avant-bras et la paume des mains (**Grice *et al.*, 2009**). Malgré cette apparente dominance des bactéries à Gram positif, dans des zones humides (plis du coude), les germes à Gram négatif dont les *Pseudomonas*, peuvent représenter 90% de la population (**Grice *et al.*, 2008**). **Myles *et al.* (2016)** ont également démontré la présence de *Roseomonas mucosa*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Pantoea septica* et *Moraxella osloensis* dans le microbiote cutané via une approche culturale. Cependant, la fraction de bactéries à Gram négatif forme une population dynamique très variable et ces germes sont souvent associés à la flore transitoire de la peau (**Boxberger *et al.*, 2021**).

Comme mentionné précédemment, la majorité des études réalisées sur le microbiote cutané se base sur des échantillons collectés sur les couches les plus externes de l'épiderme. Cependant, une étude de **Bay *et al.* (2020)** basée sur des échantillons de biopsie cutanée de la hanche et du genou de 50 participants sains (24 hommes et 26 femmes de 47 à 85 ans) a permis d'obtenir de premières informations sur les communautés bactériennes des couches plus profondes de la peau. Après avoir séparé l'épiderme et le derme papillaire du derme réticulaire, ils ont effectué un séquençage de l'ARNr 16S et ont démontré des similarités, entre individus, dans la composition du microbiote cutané bactérien au niveau du derme. Celle-ci, de même que l'abondance relative des différentes espèces, ne semblent pas différer entre les deux sites de prélèvement qui sont représentatifs des environnements secs de la peau. Une précédente étude avait montré des profils microbiens similaires entre l'épiderme et le derme (**Grice *et al.*, 2008**), ce qui est en contraste avec les résultats de **Bay *et al.* (2020)** qui montrent une différence de composition et d'abondance relative des différentes espèces entre les deux compartiments cutanés. Bien que la technique de biopsie de **Bay *et al.* (2020)** soit adaptée de celle de **Grice *et al.* (2008)**, il n'en demeure pas moins quelques différences, notamment au niveau des zones prélevées qui sont sèches et humides respectivement. De même, les méthodes d'extraction d'ADN, de même que les amorces utilisées et les analyses bioinformatiques qui en découlent restent propres à chaque étude et peuvent expliquer ces différences de résultats.

Les communautés du derme semblent néanmoins moins variables que celles de l'épiderme mais également moins diversifiées. Les auteurs retrouvent les mêmes genres prédominants dans les deux cas, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Pelomonas*, avec une plus forte abondance de ces dernières dans le derme, contrairement aux autres. Le microbiote du derme semble également moins affecté par les facteurs environnements car il y est moins exposé (**Bay *et al.*, 2020**). Cependant, au vu de la méthode employée, ces résultats doivent être complétés par une étude plus large, incluant des sites cutanés représentatifs des régions sébacées et humides de la peau. De même, les résultats obtenus par séquençage de l'ARNr 16S pourrait être approfondis par une étude métagénomique qui permettrait une analyse plus détaillée des communautés présentes dans le derme cutané.

Parmi les annexes cutanées, l'unité pilo-sébacée va présenter des conditions physico-chimiques et immunologiques qui lui sont propres et qui vont créer un environnement particulièrement favorable à la colonisation microbienne. En effet, contrairement à la surface de la peau, le follicule pileux crée un milieu plus humide, hydraté et protégé des rayons UV, avec un pH moins acide et donc plus favorable à la croissance des microorganismes (**Lousada *et al.*, 2021**). On y retrouve ainsi des espèces des genres *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Moraxella* (**Lousada *et al.*, 2021**). En dehors de ces caractéristiques physiologiques, le follicule pileux est une des seules structures cutanées à posséder ce que l'on nomme le « privilège immun ». Ce terme, introduit par Peter Medawar en 1948, désigne des tissus dans lesquels un ou plusieurs mécanismes permettent de tolérer la présence d'antigènes et d'éviter le déclenchement d'une réponse immunitaire inflammatoire (**Paus *et al.*, 2005**). Dans le cas du follicule pileux, il semblerait qu'il y ait une régulation négative des molécules du CMH de classe Ia, ainsi qu'une production d'immunosuppresseurs tels que le TGFβ-1, le TGFβ-2, l'IL-10 ou encore l'α-MSH. Les cellules de Langerhans y sont présentes en nombre réduit et sont non-fonctionnelles, et on n'y retrouve également pas de LT (**Ito *et al.*, 2004 ; Lousada *et al.*, 2021**). Malgré cela, il existe tout de même des moyens de contrôle des communautés microbiennes résidentes des follicules pileux, notamment par la production d'AMPs ainsi que la présence de macrophages et de mastocytes pouvant être stimulés par des ligands

d'origine bactérienne (**Lousada *et al.*, 2021**). L'impact du microbiote sur le système immunitaire cutané sera abordé plus loin dans ce Chapitre.

Parmi les principales espèces bactériennes du microbiote cutané, on trouve ainsi *C. acnes, Staphylococcus* spp. et *Corynebacterium* spp. qui sont décrites plus en détails dans les sous-parties suivantes.

a. Cutibacterium acnes

Cutibacterium acnes est un bacille à Gram positif, anaérobie aérotolérant, considéré comme un commensal de la peau humaine. On le retrouve principalement au niveau de l'unité pilosébacée où il représente presque 90% des communautés microbiennes résidentes, sur peau saine comme sur peau acnéique (**Ahle *et al.*, 2023 ; Mias *et al.*, 2023**). Les glandes sébacées vont créer un environnement particulièrement propice à la colonisation par *C. acnes* qui possède plusieurs gènes codant pour des lipases. Cette bactérie est donc capable de dégrader les triglycérides du sébum pour obtenir du glycérol et des acides gras libres lui servant de source de nutriments. Ces acides gras, combinés à la production d'acide propionique par *C. acnes*, vont participer à l'acidification de la surface de la peau, créant ainsi un environnement peu favorable à la colonisation par d'autres microorganismes exogènes (**Flowers and Grice, 2020**). L'adhésion de *C. acnes* à ces acides gras serait un facteur qui faciliterait sa colonisation des glandes sébacées (**Belkaid and Segre, 2014 ; Byrd *et al.*, 2018**). Comme décrit plus loin dans ce Chapitre, la maturation des glandes sébacées et l'augmentation de la production de sébum pendant la puberté entraîne une prédominance de *C. acnes* dans le microbiote cutané (**Oh *et al.*, 2012 ; Ahle *et al.*, 2023**).

Les souches de *C. acnes* ont d'abord été classées en 6 phylotypes : IA-1, IA-2, IB, IC, II et III par analyse de Multilocus Sequence Typing (MLST) sur 7 gènes de ménage : *aroE*, *atpD*, *gmk*, *guaA*, *lepA*, *recA* et *sodA* (**McDowell *et al.*, 2011 ; Kilian *et al.*, 2012 ; Vörös *et al.*, 2012**). Par la suite, **Fitz-Gibbon *et al.* (2013)** ont proposé leur propre classification par ribotypes, en se basant sur la séquence de l'ADN ribosomal 16S. Ainsi, la séquence retrouvée majoritairement a donné lieu au ribotype 1 (RT1) tandis que les suivantes, qui partagent 99% d'identité de séquence avec la RT1, ont donné lieu à une multitude de ribotypes dont 10 majeurs (notés de RT1 à RT10). Outre ces deux grandes classifications, une publication de **Dekio *et al.* (2019)** propose également différentes sous-espèces de

C. acnes, à savoir : *C. acnes* subsp. *acnes* (phylotype I), *C. acnes* subsp. *defendens* (phylotype II) et *C. acnes* subsp. *elongatum* (phylotype III) (**Lee *et al.*, 2019**).

C. acnes produit de multiples facteurs influençant son interaction avec l'hôte, tels que les Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) factors, la Dermatan-sulphate adhesin (DsA) qui peut se lier au fibrinogène, des porphyrines, des acides gras à chaîne courte et des enzymes capables de dégrader les composants des tissus de l'hôte (lipases, sialidases, hyaluronidases) (**Ahle *et al.*, 2023**).

b. Staphylococcus spp.

Les staphylocoques sont des coques à Gram positif, anaérobie facultatifs et ubiquitaires, faisant partie de la flore permanente de la peau. La production de coagulase, une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin, permet de faire la distinction entre deux grands groupes majoritaires de staphylocoques. On retrouve ainsi d'une part l'espèce *Staphylococcus aureus*, qui est coagulase positive, et d'autre part les autres espèces de staphylocoques dites coagulase négatives et regroupées sous le terme CoNS.

Il s'agit d'un groupe de 38 membres constituant l'un des principaux colonisateurs de tous les sites cutanés avec des espèces telles que *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* et S. *haemolyticus* (**Brown and Horswill, 2020 ; Flowers and Grice, 2020**). Les CoNS participent activement au maintien de l'intégrité et de l'homéostasie de la peau, stimulent l'immunité cutanée et ont la capacité de pouvoir entrer en compétition avec des agents pathogènes tels que *S. aureus* (**Brown and Horswill, 2020**). Cette dernière fonction, que l'on nomme « colonization resistance », passe notamment par la sécrétion d'AMPs et de protéases ainsi que la production de Phenol-soluble modulins (PSMs) dont l'activité a été démontrée contre *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* et *C. acnes* (**Flowers and Grice, 2020**). Les différentes interactions entre les CoNS, *S. aureus* et les autres membres du microbiote cutané seront abordées plus loin, dans la partie consacrée au rôle du microbiote cutané dans l'inhibition de la colonisation par les pathogènes.

Le membre le plus étudié des CoNS est *S. epidermidis*, une espèce retrouvée dans tous les microenvironnements cutanés. Souvent désigné comme un commensal de la peau, *S. epidermidis* est également considéré comme un pathogène opportuniste pouvant être

néfaste pour l'hôte dans certaines conditions (*i.e.* rupture de la barrière cutanée) (**Brown and Horswill, 2020**). Sa pathogénicité étant liée à sa capacité à former du biofilm, la présence de cette bactérie sur les prothèses et cathéters font de *S. epidermidis* un agent souvent responsable d'infections associées aux implants médicaux (**Schilcher and Horswill, 2020**). *S. aureus*, quant à lui, colonise la cavité nasale d'environ 30% de la population humaine de façon asymptomatique (**Laux *et al.*, 2019**). Ce pathogène exprime des superantigènes tels que les entérotoxines SEA et SEB, la toxic shock syndrome toxin 1 (TSST1), des exotoxines, des PSMs, une protéine de surface nommée protéine A impliquée dans le processus inflammatoire, et plusieurs protéases qui lui confèrent un pouvoir pathogène expliquant son implication dans plusieurs infections cutanées (**Geoghegan *et al.*, 2018 ; Koh *et al.*, 2022**).

c. *Corynebacterium* spp.

Les espèces du genre *Corynebacterium* appartiennent à la famille des Actinomycetales et au phylum des Actinobactéries. Ce sont des bacilles à Gram positif, aérobie, retrouvés principalement dans les zones humides de la peau (**Flowers and Grice, 2020**). On retrouve en tout plus de 130 espèces de *Corynebacterium* dont certaines sont considérées comme des pathogènes, telles que *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis* (**Jensen *et al.*, 2023**). Une multirésistance aux antibiotiques a déjà été observée chez certaines espèces dont *C. striatum*, une espèce capable de provoquer des infections de la peau et des tissus mous chez les individus immunodéprimés, hospitalisés ou souffrant d'une maladie chronique (**Flowers and Grice, 2020**). Parmi les espèces retrouvées le plus abondamment au niveau cutané, il y a *C. tuberculostearicum*, *C. fastidiosum*, *C. afermentans*, *C. simulans*, *C. aurimucosum*, *C. kroppenstedtii*, *C. amycolatum* et *C. resistens* (**Byrd *et al.*, 2018**). De même que pour les CoNS, il a été démontré que les *Corynebacterium* peuvent également interférer avec le développement des bactéries pathogènes, en produisant des bactériocines (**Swe *et al.*, 2007**) ou en libérant des acides gras grâce à leur activité lipase (**Bomar *et al.*, 2016**). Presque toutes les espèces de *Corynebacterium* possèdent une couche d'acides mycoliques, des acides gras à longue chaîne jouant un rôle dans la résistance au stress et permettant ainsi la colonisation et la survie dans diverses conditions (**Flowers and Grice, 2020**). Malgré ces quelques éléments, les connaissances au sujet des *Corynebacterium* restent limitées, notamment à cause de leur croissance lente et de leurs conditions de cultures

particulières, rendant leur étude plus complexe que celle d'autres genres bactériens (**Flowers and Grice, 2020 ; Jensen *et al.*, 2023**).

2. Les eucaryotes

a. Les levures/moisissures

La peau est également colonisée par des microorganismes eucaryotes, bien qu'ils soient moins abondants que les différentes communautés microbiennes citées précédemment. La composition des communautés fongiques est relativement similaire sur la partie centrale du corps et les bras, avec une prédominance des espèces du genre *Malassezia* chez l'adulte (**Findley *et al.*, 2013 ; Oh *et al.*, 2014 ; Byrd *et al.*, 2018**). En revanche, une plus grande diversité peut être retrouvée au niveau des pieds avec une combinaison de *Malassezia* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. et *Epicoccum* spp. notamment (**Byrd *et al.*, 2018**).

Les espèces du genre *Malassezia* spp. sont des levures commensales faisant partie intégrante du microbiote cutané, et nommées ainsi en l'honneur du physiologiste français Louis-Charles Malassez. Il existe 18 espèces de *Malassezia*, principalement présentes au niveau des sites sébacés de la peau, et divisées en trois groupes majeurs notés A, B et C (**Wu *et al.*, 2015 ; Vijaya Chandra *et al.*, 2020**). Le groupe A est représenté par *M. furfur*, une espèce moins fréquemment retrouvée dans le microbiote et plutôt liée au développement de maladies cutanées ou de sepsis. Par opposition, le groupe B est le plus couramment retrouvé sur la peau humaine saine et est composé notamment de *M. restricta*, *M. globosa* et *M. sympodialis* (**Vijaya Chandra *et al.*, 2020**). Le génome des *Malassezia* spp. est enrichi en gènes codant pour des lipases, des phospholipases, des sphingomyélinases et des protéases. De même, ces levures ne possédant pas les enzymes nécessaires pour synthétiser leurs propres acides gras, toutes ces caractéristiques les rendent particulièrement aptes à se développer dans l'environnement riche en lipides de certains sites cutanés (**Vijaya Chandra *et al.*, 2020**).

L'étude de **Findley *et al.* (2013)** a révélé une spécificité des espèces de *Malassezia* en fonction des sites corporels. Ainsi, *M. restricta* est prédominante dans le canal auditif externe, le pli rétro-auriculaire et la glabelle. A l'opposé, *M. globosa* est plus abondante sur le dos, la partie postérieure et inférieure de la tête, et le pli inguinal. Ces deux espèces sont également le plus fréquemment retrouvées ensemble dans le follicule pileux

(**Lousada *et al.*, 2021**). D'autres zones du corps comme les narines, les avant-bras et la paume sont caractérisées par plusieurs espèces dont *M. restricta*, *M. globosa* et *M. sympodialis*.

En plus des *Malassezia* spp., le genre *Candida* peut également être évoqué dans le contexte du microbiote cutané. Ces champignons dimorphique sont communément retrouvés sur la peau et les muqueuses humaines (**Peleg *et al.*, 2010 ; Kashem and Kaplan, 2016**). L'espèce *Candida albicans*, la plus commune et la plus étudiée du genre, est retrouvée chez près de 70% des individus sains (**Kashem and Kaplan, 2016**). Plusieurs autres espèces ont déjà été identifiées dans l'environnement cutané, telles que *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guillermondii*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis* et *C. intermedia* (**Espinosa-Hernández *et al.*, 2020**). Ces levures peuvent être considérées comme commensales mais sont aussi capables de provoquer des infections, en particulier dans des cas d'immunodéficience, de diabète ou consécutivement à l'utilisation d'antibiotiques (**Grice and Segre, 2011 ; Kashem and Kaplan, 2016**). Il existe des interactions bidirectionnelles, physiques comme chimiques, entre *C. albicans* et les bactéries. L'impact positif ou négatif de celles-ci a son importance, notamment dans un contexte infectieux (**Peleg *et al.*, 2010**).

b. Les acariens

Deux espèces d'acariens, appartenant au genre *Demodex*, que sont *Demodex folliculorum* et *Demodex brevis* sont également retrouvées au niveau des follicules pileux (**Lousada *et al.*, 2021**), la première étant plus prévalente que la seconde. On note également leur présence sur le visage et en particulier dans les zones présentant une forte densité de glandes sébacées, comme le front, les joues ou encore le nez (**Grice and Segre, 2011 ; Jacob *et al.*, 2019**). Ces acariens se nourrissent de sébum mais également des cellules épithéliales qui tapissent les follicules pileux ainsi que de microorganismes tels que *C. acnes* (**Grice and Segre, 2011**). Bien que les *Demodex* puissent être transmis par contact entre la mère et l'enfant, leur prolifération a lieu après la puberté et est liée à l'augmentation de l'activité des glande sébacées (**Jacob *et al.*, 2019**). De là, leur nombre continue d'augmenter, atteignant une prévalence de plus de 95% chez les individus âgés de plus de 71 ans (**Elston and Elston, 2014**).

c. *Les virus*

La colonisation de la peau par des microorganismes s'accompagne de la présence de bactériophages. On retrouve en plus forte abondance des phages associés aux espèces de *Cutibacterium* et *Staphylococcus* (**Oh *et al.*, 2016**). Les cycles lytique ou lysogénique de ces phages ont des conséquences directes sur la composition des populations bactériennes, et peuvent également affecter le métabolisme, la virulence, la résistance aux antibiotiques et la sensibilité à d'autres phages de leur hôte. Tous ces éléments mettent en avant le rôle important des phages dans la régulation d'une partie du microbiote cutané et la nécessité de nouvelles études sur le sujet (**Boxberger *et al.*, 2021 ; Hannigan *et al.*, 2015**). Des virus eucaryotes sont également retrouvés en faible abondance et sont davantage spécifique à un individu donné plutôt qu'à un site cutané. **Byrd *et al.* (2018)** ont ainsi identifié la présence des virus suivants : *Acheta domestica* densovirus, *Alphapapillomavirus*, *Human papillomavirus* (β), (γ) et (μ), *Merkel cell polyomavirus*, *Molluscum contagiosum virus*, *Polyomavirus* HPγV6 et HPγV7, *RD114* retrovirus et Simian virus.

3. Les archées

Probst *et al.* (2013) ont estimé que les archées représentent environ 4.2% de la fraction procaryote du microbiote cutané. Bien qu'en minorité par rapport aux bactéries, la présence occasionnelle d'archées a en effet été reportée dans plusieurs publications se basant sur le séquençage de l'ARNr 16S (**Caporaso *et al.*, 2011 ; Hulcr *et al.*, 2012**). Une étude plus récente basée sur l'analyse de 51 échantillons issus du torse d'individus allant de 1 à 75 ans a mis en avant une plus forte abondance de ces archées chez les sujets ayant moins de 12 ans ou plus de 60 ans, des périodes où la production de sébum est plus faible. Elle a également confirmé que ce sont les *Thaumarchaeota* et *Euryarchaeota* qui sont particulièrement associés à la peau humaine (**Koskinen *et al.*, 2017 ; Moissl-Eichinger *et al.*, 2017**). Les *Thaumarchaeota* ont la capacité d'oxyder l'ammoniac pour produire du nitrite en conditions aérobies (**Moissl-Eichinger *et al.*, 2017**). La détection du gène *amoA (*ammonia monooxygenase) dans les échantillons de 13 individus par **Probst *et al.* (2013)** semble indiquer que ce processus de nitrification pourrait également avoir lieu sur la peau et entraîner une baisse locale de pH (**Moissl-Eichinger *et al.*, 2017**).

2- Mise en place du microbiote cutané

Le premier moment crucial de la mise en place des communautés microbiennes de la peau intervient à la naissance. Il a été démontré que la mise en place du microbiote cutané chez les nouveau-nés dépend du mode d'accouchement (**Dominguez-Bello *et al.*, 2010 ; Luna, 2020**). Dans le cas des nourrissons nés par voie basse, la composition microbienne initiale est influencée par le passage à travers le col de l'utérus et le vagin, entraînant un transfert d'espèces de *Lactobacillus*, *Prevotella* ou *Sneathia* sur la peau (**Dominguez-Bello *et al.*, 2010 ; Luna, 2020 ; Harris-Tryon and Grice, 2022**). En revanche, chez les nourrissons nés par césarienne, les genres *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Cutibacterium* prédominent, démontrant une composition proche de celle classiquement retrouvée sur la peau (**Dominguez-Bello *et al.*, 2010 ; Chu *et al.*, 2017**). La transmission du microbiote vaginal maternel pourrait, via l'occupation des différentes niches écologiques cutanées, jouer un rôle de flore protectrice en permettant notamment la défense contre la colonisation par des organismes pathogènes (**Luna, 2020**). De même, la composition du microbiote initial peut avoir des implications sur les fonctions immunitaires, entraînant une plus grande sensibilité aux allergies et à l'asthme chez les nourrissons nés par césarienne (**Negele *et al.*, 2004 ; Bager *et al.*, 2008**). L'influence du microbiote sur le système immunitaire sera abordée en détails plus loin dans ce Chapitre.

Contrairement à ce qui a été évoqué précédemment chez l'adulte, aucune influence des différents habitats corporels (peau, oral, nasopharyngé, intestinal, vaginal, *etc.*) n'a été mise en évidence sur la composition du microbiote chez les nouveau-nés (**Dominguez-Bello *et al.*, 2010 ; Chu *et al.*, 2017**). Cependant, il a été démontré que de 4 à 6 semaines après la naissance, au fur et à mesure que le microbiote cutané des nourrissons se diversifie, la structure et la fonction des communautés microbiennes commencent à ressembler davantage à celle de leur mère, avec une spécificité liée aux sites corporels (**Chu *et al.*, 2017**). On retrouve alors une majorité d'espèces de *Staphylococcus* et *Corynebacterium* et une réorganisation spatiale qui n'est plus influencée par le mode d'accouchement (**Chu *et al.*, 2017 ; Luna, 2020**).

L'évolution de la composition de ce microbiote cutané se poursuit au cours de la première année de vie (**Capone *et al.*, 2011**). Une étude à ce sujet a été réalisée sur un

panel de 31 enfants sains de type caucasien, allant de 3 à 52 semaines et répartis en trois groupes : 1 à 3 mois, 4 à 6 mois et 7 à 12 mois. Les résultats ont montré une colonisation initialement dominée par des espèces du genre *Staphylococcus* (**Capone *et al.*, 2011**). Des différences de propriétés de la barrière cutanée des bébés, qui montre une plus forte hydratation du *stratum corneum* que les adultes, justifient la prédominance d'espèces généralement associées aux zones humides de la peau chez l'adulte (**Grice *et al.*, 2009 ; Capone *et al.*, 2011**). Cette forte abondance de *Staphylococcus*, et également de *Streptococcus*, va peu à peu diminuer au profit d'autres genres bactériens, montrant ainsi une diversification progressive de la composition du microbiote cutané se poursuivant jusqu'à 12 mois après la naissance. La mise en place d'une spécificité de ces communautés microbiennes pour les différents sites de la peau intervient à partir du troisième mois de vie (**Capone *et al.*, 2011**).

Bien qu'il ne s'agisse pas de l'unique facteur influençant la composition du microbiote cutané chez les bébés, il est à noter que les contacts fréquents entre la mère et l'enfant entraînent une transmission microbienne donnant lieu à une prédominance de *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Proteus* et *Klebsiella* (**Gaitanis *et al.*, 2019**). Une autre étude réalisée sur 158 enfants âgés de 1 à 10 ans a démontré que cette diversité microbienne continue à augmenter au fil du temps (**Zhu *et al.*, 2019**). Les différents phyla retrouvés ressemblent alors à ceux de l'adulte avec une majorité de Protéobactéries, Firmicutes, Actinobactéries et Bacteroidetes.

La puberté constitue un autre moment crucial de la vie car elle entraîne un remaniement de la composition du microbiote cutané. En effet, l'importante production d'hormones durant cette période stimule la sécrétion de sébum par les glandes sébacées, favorisant ainsi la colonisation par des espèces lipophiles telles que *C. acnes* et *Malassezia* spp. (**Harris-Tryon and Grice, 2022**). Ces changements d'abondance relative de chaque espèce et la colonisation par certains phylotypes de *C. acnes* peuvent aboutir à l'apparition d'acné au niveau de la peau, un sujet qui sera abordé plus loin dans ce Chapitre (**Luna, 2020**). D'autres paramètres rentrent également en compte, avec un impact notable du système neuroendocrinien ainsi que du système immunitaire.

En dehors de ces évènements, la composition du microbiote cutané reste relativement stable dans le temps chez les individus adultes sains. Une étude longitudinale réalisée

par **Oh *et al.* (2016)** sur la surface de la peau, a démontré que malgré une exposition constante aux variations de l'environnement extérieur, les communautés microbiennes cutanées sont stables au cours du temps. Des données de métagénomique obtenues sur les échantillons de 12 individus sains, à partir de 17 sites cutanés et sur une courte (1 à 2 mois) ou longue (1 à 2 ans) période ont montré que cette stabilité est due au maintien dans le temps des souches propres à chaque individu plutôt qu'à la réacquisition d'espèces dans l'environnement (**Oh *et al.*, 2016**). Des différences ont cependant été observées en fonction du site de prélèvement. Ainsi, les communautés bactériennes et fongiques des sites sébacés sont les plus stables dans le temps, tandis que les communautés microbiennes associées aux pieds ont montré la plus grande instabilité. Malgré la prédominance de certaines espèces, d'autres présentant une faible abondance sont également maintenues dans le temps et donnent ainsi une signature microbienne unique à chaque individu (**Oh *et al.*, 2016**). La seule exception concerne les virus à ADN eucaryotes qui ont montré un caractère transitoire plus prononcé que les autres membres du microbiote cutané. Ces particularités du microbiote cutané font l'objet d'un intérêt grandissant pour son utilisation en criminologie (**Tozzo *et al.*, 2020**).

Avec l'âge, des changements au niveau de la production d'hormones ou de sébum, ainsi qu'une altération des fonctions immunitaires, vont avoir des conséquences sur la composition du microbiote cutané chez les personnes âgées (**Luna, 2020**). Plusieurs études réalisées sur des populations asiatiques ont montré des modifications importantes de la structure du microbiote, notamment chez les femmes **(Leung *et al.*, 2018 ; Ying *et al.*, 2015 ; Shibagaki *et al.*, 2017**). On observerait ainsi une diversification et des variations importantes des différentes espèces, des éléments d'informations qui mériteraient d'être complétés par d'autres études sur le sujet.

3- Variabilité du microbiote cutané

De manière générale, les caractéristiques physico-chimiques d'une niche cutanée donnée déterminent la composition de son microbiome, mais des facteurs spécifiques à la physiologie de l'hôte (genre, âge, système immunitaire) à son mode de vie (profession, hygiène, utilisation d'antibiotiques) ainsi qu'à son environnement (climat, pollution, exposition aux UV) contribuent aussi grandement à la variabilité de la flore microbienne de la peau (**Figure 6**).

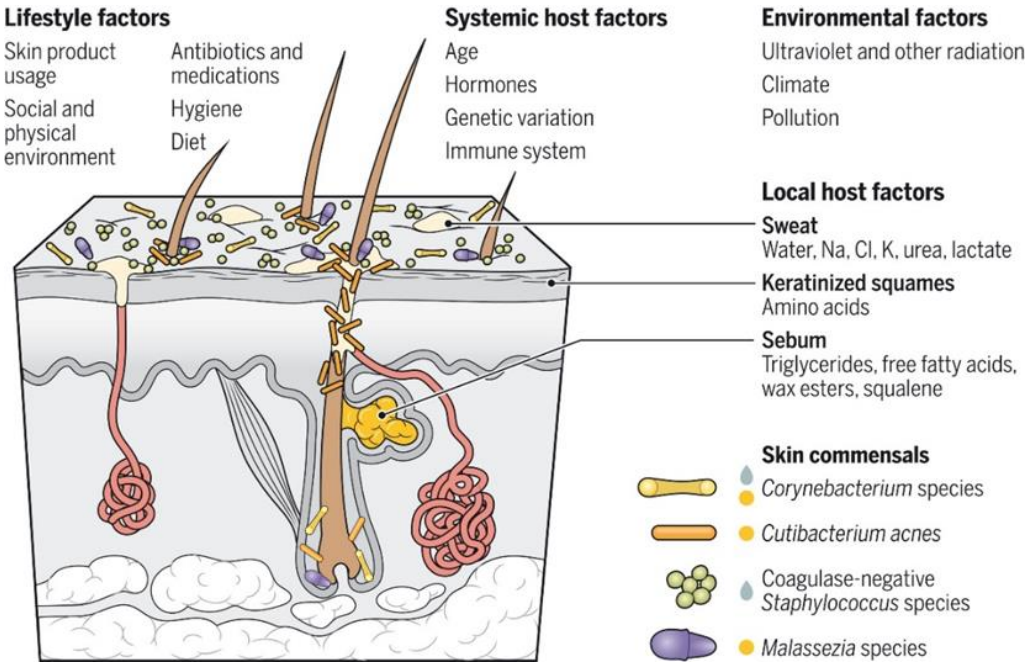


Figure 6 : ***Principaux organismes commensaux et facteurs influençant la composition du microbiote cutané.*** *On retrouve ainsi les paramètres (locaux et systémiques) propres à l'hôte et les facteurs environnementaux ou liés au mode de vie. Les microorganismes hydrophiles et lipophiles sont indiqués par une gouttelette d'eau (bleu) et une gouttelette d'huile (jaune), respectivement (adapté de* ***Harris-Tryon and Grice, 2022****).*

1. Variabilités intrapersonnelles

Plusieurs études ont démontré que la localisation corporelle est le principal facteur influençant la composition du microbiote cutané (**Costello *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2016**). En effet, comme mentionné précédemment, les différents sites corporels offrent une variété de microenvironnements qui se différencient au niveau de divers paramètres physico-chimiques. La majorité des études réalisées chez des sujets adultes sains montrent que la composition des communautés microbiennes de la peau est dépendante de ces caractéristiques physiologiques, avec des variations en termes d'abondance relative des différents taxa (**Byrd *et al.*, 2018**).

Un exemple parlant à ce sujet concerne l'eau, un élément important influençant la croissance bactérienne. La quantité d'eau disponible pour la croissance des microorganismes est appelée activité de l'eau (a_w) et varie de 0 (aucune molécule d'eau disponible) à 1 (toutes les molécules d'eau sont libres). L'hydratation de la peau va varier entre les différents microenvironnements et influencer la composition du microbiote

cutané. Ainsi, les staphylocoques sont plus tolérants car ils peuvent croître à des a_w de 0,83 et 0,87, respectivement pour *S. aureus* et *S. epidermidis*. A l'opposé, *Pseudomonas fluorescens* nécessite une a_w de 0,97 ou plus (**Baldwin *et al.*, 2017**). Un autre exemple concerne la présence de sébum qui sera particulièrement favorable à la croissance de microorganismes utilisant les lipides comme source de nutriments. On peut notamment citer *C. acnes* et *Malassezia*, mentionnées précédemment dans ce Chapitre. La répartition des glandes sébacées étant hétérogène, cela explique les différences d'abondance de ces espèces lipophiles sur toute la surface du corps.

De manière générale, l'environnement hypoxique et riche en sébum des annexes cutanées, et en particulier du follicule pileux, est idéal pour la colonisation par les souches de *C. acnes* qui dominent en majorité dans les couches plus profondes de la peau. Parmi les bactéries caractéristiques de la surface de la peau figurent les CoNS, telles que *Staphylococcus epidermidis*, qui sont équipées pour adhérer et persister sur la peau humaine et en tolérer les conditions (**Harris-Tryon and Grice, 2022**). En effet, cette bactérie est caractérisée par sa tolérance pour les fortes concentrations de sel, la présence de composés antimicrobiens dans la sueur, ainsi que sa capacité à utiliser l'urée comme source de nutriments (**Yang *et al.*, 2024**). Les sites cutanés où l'humidité est plus importante sont, quant à eux, enrichis en espèces du genre *Corynebacterium* (**Harris-Tryon and Grice, 2022**).

Cependant les variations intrapersonnelles dans la composition et la structure des communautés microbiennes sont généralement inférieures aux variations interpersonnelles causées par les multiples facteurs décrits ci-dessous (**Burns *et al.*, 2019 ; Boxberger *et al.*, 2021**).

2. Variations interpersonnelles

Plusieurs études ont démontré que l'ethnie semble entraîner des variations du microbiote cutané (**Harker *et al.*, 2014 ; Perez *et al.*, 2016 ; Leung *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2019**). Cependant, il semblerait que celles-ci soient surtout liées au mode de vie de ces différentes populations (**Boxberger *et al.*, 2021**), indiquant l'influence de paramètres exogènes qui seront abordés dans la partie suivante. De même, bien qu'il existe des différences notables en termes de production d'hormones, de transpiration ou encore de pH entre les hommes et les femmes (**Hillion *et al.*, 2013 ; Boxberger *et al.*, 2021**),

l'impact du genre sur la composition du microbiote cutané reste à explorer davantage. **Fierer *et al.* (2008)**, ont par exemple montré des différences de diversité alpha, la diversité locale mesurée dans un écosystème délimité, entre les hommes et les femmes. Ils ont également relevé une influence de l'âge, un paramètre qui se retrouve dans une étude de **Oh *et al.* (2012)** qui n'indique, quant à elle, aucune différence entre les deux genres chez des individus allant de 2 à 40 ans. Les abondances relatives des espèces cutanées majeures diffèrent grandement entre les études (**Fierer *et al.*, 2008 ; Callewaert *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2019**) ne permettant pas de conclure avec certitude sur l'influence du genre dans la composition des communautés microbiennes de la peau. Cependant, comme mentionné précédemment, malgré une relative stabilité du microbiote dans le temps, des variations sont tout de même observées avec l'âge avancé. Une étude réalisée par **Dimitriu *et al.* (2019)** sur des prélèvements de 495 individus âgés de 9 à 78 ans et issus de 4 sites cutanés, ainsi que de la bouche, a placé l'âge comme le quatrième facteur affectant le plus le microbiote cutané. Plusieurs études ont montré une augmentation de la diversité alpha dans les échantillons cutanés de fractions plus âgées de la population (**Boxberger *et al.*, 2021**). Il semble également que la diminution de production de sébum avec l'âge entraîne une baisse de l'abondance de *Cutibacterium* et une augmentation de celle des *Corynebacterium* (**Shibagaki *et al.*, 2017 ; Jugé *et al.*, 2018**).

3. Facteurs extrinsèques

Le mode d'accouchement évoqué précédemment est un des premiers facteurs influençant la mise en place et la composition du microbiote cutané (**Dominguez-Bello *et al.*, 2010 ; Chu *et al.*, 2017**). Par la suite, l'environnement dans lequel évolue les différents individus semble jouer un rôle important. Des différences ont été observées entre les populations des zones urbaines et rurales avec de plus fortes variations intrapersonnelles. Les sources à partir desquelles le microbiote cutané a pu se former sont également différentes, avec des microorganismes principalement d'origine humaine pour le milieu urbain, tandis que les travailleurs en extérieur des zones rurales sont davantage soumis à des sources microbiennes environnementales (**Ying *et al.*, 2015**). L'utilisation de produits cosmétiques et de soins, qui contiennent notamment des conservateurs, a montré des modulations de la composition et de la diversité des

communautés de bactéries et d'archées cutanées (**Staudinger *et al.*, 2011 ; Bouslimani *et al.*, 2019 ; Gannesen *et al.*, 2019 ; Wang *et al.*, 2019**). Plusieurs études ont enfin montré que l'utilisation d'antibiotiques tels que la vancomycine ou la doxycycline par voie orale, aussi bien qu'en application topique, impact la flore résidente de la peau ainsi que la réparation des plaies. Ces modifications peuvent avoir un impact positif en favorisant par exemple *C. granulosum* par rapport à *C. acnes* chez des patients atteints d'acné ; tout comme négatif avec une baisse de l'abondance de souches commensales de *S. epidermidis* qui ont un rôle antagoniste vis-à-vis de la colonisation par *S. aureus* (**Zhang *et al.*, 2015 ; SanMiguel *et al.*, 2017 ; Park and Lee, 2018**). D'autres paramètres, tels que la localisation géographique, le climat, les saisons, l'exposition aux UV et la pollution ont montré une influence sur la composition du microbiote cutané.

Une étude de **Burns *et al.* (2019)** réalisée sur le dos de 6 participants masculins allant de 19 à 35 ans et exposés à des doses d'UVA (22-47 J/cm^2) et d'UVB (100-350 J/cm^2) a mis en évidence que les UV affectent le microbiote cutané. Les résultats ont montré une augmentation de la présence du phylum des Cyanobactéries, des bactéries à Gram négatif capable de réaliser la photosynthèse ; et une diminution des familles de *Lactobacillaceae* et *Pseudomonadaceae*. Les effets des UV sur les communautés fongiques et virales sont moins connus bien qu'une inhibition de la croissance de *M. furfur* et un déclenchement ou une réactivation des infections liées au virus de l'herpès, à la varicelle et au papillomavirus aient déjà été observées. Ces derniers exemples peuvent s'expliquer par l'immunosuppression induite par les UV (**Grant *et al.*, 2024**).

Dans le cas de la pollution, **Janvier *et al.* (2020)** se sont intéressés à l'effet du NO_2 sur cinq bactéries commensales de la peau, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *P. fluorescens* et *C. tuberculostearicum*. Les effets des polluants atmosphériques sur la peau ont déjà été décrits dans la littérature mais cette étude a la particularité de s'être intéressée à leur impact sur la physiologie, la morphologie et la réponse au niveau moléculaire des bactéries exposées à 10 ou 80 ppm (partie par million) de NO_2. Des effets délétères ont été observés, dont une baisse de la cultivabilité, une augmentation de la perméabilité membranaire et une augmentation du taux de 3-Nitrotyrosine, un marqueur de l'altération des protéines par la présence d'espèces réactives de l'azote (**Janvier *et al.*, 2020**).

4- Pathologies de la peau

Une grande partie des pathologies de la peau a un lien étroit avec des altérations du microbiote cutané menant à la dysbiose. **Levy *et al.* (2017)** définissent cette dysbiose de la façon suivante : il s'agit d'une altération de la composition et de la fonction du microbiote due à un ensemble de facteurs, environnementaux et liés à l'hôte, qui perturbent l'écosystème microbien dans une mesure qui dépasse ses capacités de résistance et de résilience.

Dans certains cas, cette dysbiose peut être liée à des bactéries commensales opportunistes qui vont évoluer vers un état pathogène, à la suite d'une rupture de la barrière cutanée (**Grice *et al.*, 2008**). Dans d'autres cas, ces bactéries commensales ne peuvent plus assurer une protection de la peau par colonisation de leur niche écologique, laissant ainsi la place à des microorganismes pathogènes.

1. L'acné

L'acné, ou *acne vulgaris*, est une maladie dermatologique inflammatoire et chronique caractérisée par le développement sur le visage ou la moitié supérieure du thorax de lésions rétentionnelles à comédons ouverts ou fermés et/ou de lésions inflammatoires telles que des papules, papulopustules ou nodules (**Dictionnaire de l'Académie Nationale de Médecine – version 2024**). La physiopathologie de l'acné inclut plusieurs éléments majeurs dont le premier est une surproduction de sébum, avec une composition altérée de celui-ci, par stimulation de l'activité des glandes sébacées (**Dreno *et al.*, 2024**). Outre cette augmentation de la production de sébum, l'acné donne également lieu à une kératinisation excessive de l'unité pilosébacée et une inflammation importante (**Dreno *et al.*, 2024**). Un quatrième facteur, cette fois-ci microbien, entre également en jeu puisque cette pathologie est depuis longtemps associée à la bactérie *Cutibacterium acnes* (**Leyden *et al.*, 1975**). Etonnamment, il a été démontré que l'acné est davantage corrélée à une perte de diversité des différents phylotypes de *C. acnes* plutôt qu'à une prolifération de la bactérie (**Dréno *et al.*, 2020**). Ainsi, dans la majorité des cas, les souches de *C. acnes* retrouvées sur les peaux acnéiques appartiennent au phylotype IA-1 tandis que les peaux saines sont davantage associées aux phylotypes IA-2, IB et II (**Lomholt and Kilian, 2010 ; McDowell *et al.*, 2012, 2013 ; Barnard *et al.*, 2016**). En termes de ribotypes, l'étude de **Fitz-Gibbon *et al.* (2013)** a démontré que les ribotypes

4 et 5 sont particulièrement prédominants chez les patients atteints d'acné, tandis que le ribotype 6 est plus fortement corrélé à une peau saine.

C. acnes étant une bactérie prédominante du microbiote cutané, aussi bien chez les individus sains que les patients atteints d'acné, son rôle exact dans la maladie est toujours en cours d'investigation (**Spittaels *et al.*, 2020**). Cependant, il a été démontré que *C. acnes* est fortement impliquée dans la mise en place d'une réponse inflammatoire notamment via l'activation des TLR2/TLR4 sur les kératinocytes, ce qui entraîne l'activation des voies MAPK et NF-kB, donnant lieu à la libération de cytokines pro-inflammatoires type IL-8, TNF-α, GM-CSF ou encore du hBD2 (**Graham *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2005**) entre autres. L'activation des sébocytes et des macrophages via le TLR2 participe également à la mise en place d'une réponse inflammatoire (**Lee *et al.*, 2019**) et il semblerait que *C. acnes* puisse aussi induire la sécrétion d'IL-1β via l'inflammasome NLRP3, un protéique cytosolique capable de déclencher le processus inflammatoire (**Qin *et al.*, 2014**). En parallèle, *C. acnes* peut également activer la voie de signalisation IGF-1 (Insulin-like growth factor-I), dont les récepteurs se trouvent également sur les glandes sébacées, ce qui augmente l'expression de la filaggrine et affecte la prolifération et la différenciation des kératinocytes, entraînant la formation de comédons (**Lee *et al.*, 2019**). La formation de biofilm, la production de porphyrines, ainsi que la présence de lipases, protéases, hyaluronidases et autres facteurs de virulence tels que le facteur CAMP font également partie des éléments permettant à *C. acnes* d'avoir un impact important sur le développement de l'acné (**Lee *et al.*, 2019 ; Spittaels *et al.*, 2021 ; Dreno *et al.*, 2024**). Un autre microorganisme est également associé au développement de l'acné. En effet, bien que *C. acnes* soit dominant dans l'unité pilosébacée, les travaux de **Dreno *et al.* (2017)** ont démontré que c'est *S. epidermidis* qui est prédominant sur la surface des comédons, papules et pustules. *S. epidermidis* est notamment capable d'utiliser la fermentation pour inhiber la croissance de *C. acnes* (**Wang *et al.*, 2014**) mais également de diminuer l'inflammation provoquée par cette dernière. Ainsi, l'acide lipotéichoïque (LTA) présent dans la paroi de *S. epidermidis* active, via le TLR2, le microARN miR-143, qui va à son tour entraîner une baisse de stabilité de l'ARNm de ce TLR2 en ciblant sa région 3' UTR. Ceci entraîne donc une baisse du nombre de protéines TLR2 et *in fine* une baisse de la production de cytokines pro-inflammatoires induites par

C. acnes (**Xia *et al.*, 2016**). Le rôle plus exact de cette bactérie dans l'acné en tant que telle est un sujet d'étude actuel et devrait faire l'objet de nouvelles investigations.

2. Dermatite atopique

La dermatite atopique (AD) est une dermatose inflammatoire chronique, évoluant par poussées prurigineuses, et se manifestant par des lésions cutanées de type eczéma. Elle est liée à une prédisposition génétique, une altération de la barrière cutanée et du microbiote, ainsi qu'une activation du système immunitaire (**Byrd *et al.*, 2018**). Un des symptômes majeurs de cette maladie est une sécheresse cutanée, connue sous le nom de xérose, qui peut être expliquée par le lien entre l'AD et la présence de mutations dans le gène codant pour la filaggrine (**Palmer *et al.*, 2006 ; Nakamizo *et al.*, 2015**). Pour rappel, la filaggrine est hydrolysée en NMFs, des facteurs qui ont un rôle important dans l'hydratation et le maintien de l'acidité de la peau. Plusieurs travaux ont également identifié une altération de la production d'AMPs en cas d'AD, avec une diminution de la production de cathélicidine LL-37 et une augmentation de l'expression de la RNase 7 ou encore de l'hBD2 (**Harder *et al.*, 2010 ; Mallbris *et al.*, 2010**). Des mutations dans les récepteurs et molécules de signalisation impliquées dans la détection des microorganismes tels que le TLR2, CARD4 et CD14 ont également été relevées (**Sanford and Gallo, 2013**). Une modification de tous ces paramètres entraîne des changements importants des propriétés physico-chimiques et immunologiques de la peau, pouvant ainsi provoquer une dysbiose (**Nakamizo *et al.*, 2015**).

En effet, une diminution de la diversité microbienne et une colonisation par des espèces du genre *Staphylococcus* sont des éléments fréquemment associés au développement de cette maladie (**LEYDEN *et al.*, 1974 ; Francuzik *et al.*, 2018 ; Koh *et al.*, 2022**). *S. aureus* est ainsi retrouvée dans les lésions de plus de 90% des patients atteints de dermatite atopique (**Nakamizo *et al.*, 2015**). Une première étude se basant sur le séquençage de l'ARNr 16S a démontré que *S. aureus* est plus abondante pendant les poussées de la maladie, en comparaison au début de celle-ci ou à des prélèvements réalisés post-traitement antibiotique. Une autre espèce initialement commensale, qui est *S. epidermidis*, est également plus représentée au moment des poussées de dermatite (**Kong *et al.*, 2012**). Une autre étude de métagénomique est venue confirmer ces résultats en démontrant une plus grande prédominance de *S. aureus* chez les

patients souffrant d'une forme plus grave de l'AD, tandis que *S. epidermidis* semble être plus représentatif des formes moins sévères (**Byrd *et al.*, 2017**).

Les isolats de *S. aureus* provenant de patients atteints d'AD expriment également davantage de facteurs de virulence et ont une plus grande propension à produire des biofilms pour favoriser leur colonisation et leur évasion immunitaire (**Koh *et al.*, 2022**). *S. aureus* serait ainsi capable d'exacerber et de contribuer à la persistance de l'inflammation cutanée pendant l'AD en sécrétant des toxines possédant un fort pouvoir antigénique et activant les cellules immunitaires. Ainsi la δ-toxine, produite en grande quantité par les isolats de *S. aureus* issus de patient atteints d'AD, entrainerait la dégranulation des mastocytes, provoquant ainsi des réactions allergiques et une activation des réponses immunitaires innée et adaptative (**Nakamura *et al.*, 2013 ; Nakamizo *et al.*, 2015**). De même, l'augmentation du pH de la peau causée par la maladie favorise l'expression de protéines impliquées dans l'évasion immunitaire et l'adhérence telles que le clumping factor B (ClfB) ou les fibronectin-binding proteins (FnBPs). Ces derniers facilitent d'autant plus la colonisation de *S. aureus* (**Koh *et al.*, 2022**).

Outre ce facteur bactérien, les *Malassezia* spp., dont notamment *M. furfur* et *M. sympodialis*, sont également associées au développement de la dermatite atopique (**Koh *et al.*, 2022**). La présence d'IgE spécifiques à cette levure est un marqueur important de la gravité de la maladie chez l'adulte (**Glatz *et al.*, 2015**). Il semblerait que *M. sympodialis* soit capable de libérer des vésicules extracellulaires qui provoquent la sécrétion d'IL-4 et de TNF-α (**Glatz *et al.*, 2015**). En complément, elle augmenterait également la dégranulation des mastocytes, perpétuant ainsi la réaction allergique et l'inflammation (**Koh *et al.*, 2022**). Un effet similaire est observé avec *M. globosa*, dont la protéine MGL_1304 retrouvée dans la sueur des patients atteints d'AD, peut causer la libération d'histamines par les cellules immunitaires et donc des réactions allergiques (**Hiragun *et al.*, 2013**). Grâce à des travaux sur modèle murin, il a été démontré que la voie IL-23/IL-17 exerce des fonctions protectrices empêchant une colonisation fongique excessive de la peau, mais que cette même voie va également exacerber l'inflammation induite par *Malassezia* en cas de rupture de l'intégrité cutanée, comme c'est le cas pendant l'AD (**Sparber *et al.*, 2019 ; Koh *et al.*, 2022**).

3. Le psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau caractérisée par une prolifération rapide des cellules cutanées ainsi que l'apparition de plaques érythémateuses et squameuses généralement retrouvées sur les coudes, les genoux, le cuir chevelu et le tronc (**Sanford and Gallo, 2013 ; Visser *et al.*, 2019**). Bien que les causes exactes de cette maladie restent encore à ce jour mal connues, la littérature indique qu'elles comportent plusieurs éléments dont une susceptibilité génétique, des facteurs environnementaux, une perturbation de la barrière cutanée et un dysfonctionnement immunitaire (**Ayala-Fontánez *et al.*, 2016**). En effet, il semblerait que le psoriasis soit médié par une hyperactivité des LT Th17, ce qui causerait l'inflammation et l'hyperprolifération des kératinocytes (**Chang *et al.*, 2018**). Plusieurs études ont montré une augmentation de la diversité et de l'hétérogénéité du microbiote cutané chez les patients souffrant de psoriasis. On observe ainsi, de manière générale, une augmentation de la présence de *S. pyogenes* et *S. aureus* (**Ayala-Fontánez *et al.*, 2016**), un résultat retrouvé par **Chang *et al.* (2018)** qui montre un enrichissement de *S. aureus* sur les peaux psoriasiques, qu'elles comportent des lésions ou non, et une influence de la bactérie sur la polarisation des LT Th17. A l'opposé, les auteurs ont identifié une plus forte abondance de *S. epidermidis*, *C. acnes* et *C. granulosum* sur peaux saines. Cependant, comme mentionné par **Chang *et al.* (2018)** ainsi que **Boxberger *et al.* (2021)**, les résultats diffèrent selon le site cutané, la méthode de prélèvement de l'échantillon et le choix de la région de l'ARNr 16S étudiée. Il semblerait ainsi que *Streptococcus* soit le plus communément retrouvée en cas de biopsie tandis que les *Corynebacteria* prédominent dans les échantillons récupérés par écouvillonnage (**Ayala-Fontánez *et al.*, 2016**). Des prélèvements effectués sur le dos et le coude ont montré une forte abondance, respectivement, de *M. restricta* et *M. sympodialis* (**Boxberger *et al.*, 2021**). Il semblerait que la levure puisse contribuer au déclenchement de la maladie ainsi qu'à l'exacerbation des plaques psoriasiques. D'autres espèces de levures appartenant au genre *Candida* semblent prévalentes dans la cavité orale et les lésions cutanées des patients atteints de psoriasis. La production de superantigènes et de toxines par les *Candida* spp. participe à l'activation des LT et à la sécrétion de cytokines par les kératinocytes, aggravant d'autant plus la maladie (**Ayala-Fontánez *et al.*, 2016**).

Ainsi, bien que des différences existent dans la composition du microbiote cutané entre les peaux saines et les peaux atteintes de psoriasis, il n'existe à ce jour aucune signature microbienne directement identifiée et liée à la pathogénèse de cette maladie (**Sanford and Gallo, 2013 ; Ayala-Fontánez *et al.*, 2016 ; Chang *et al.*, 2018**).

IV- Rôles du microbiote cutané

1- Inhibition de la colonisation des pathogènes

Les facteurs de l'hôte ont un rôle indéniable dans la composition et les variations du microbiote cutané, mais celui-ci est également fortement influencé par les interactions entre microorganismes (**Byrd *et al.*, 2018**). Ainsi, la flore commensale possède de nombreux mécanismes lui permettant d'entrer en compétition pour l'espace et les ressources disponibles d'une niche écologique. Ceux-ci inclus la production d'AMPs et de protéases ainsi que divers mécanismes interférant avec des voies importantes pour la colonisation et la virulence des pathogènes (**Figure 7**) (**Harris-Tryon and Grice, 2022 ; Yang *et al.*, 2024**).

Ces phénomènes ont d'abord été démontrés chez les staphylocoques. **Iwase *et al.* (2010)** ont mis en évidence que la sécrétion de l'enzyme Esp (Extracellular serine protease) par *S. epidermidis* inhibe la formation de biofilm et la colonisation nasale par *S. aureus*. Esp viendrait également potentialiser l'effet d'un AMP d'origine humaine, l'hBD2. En parallèle la production bactérienne d'AMPs, par *S. epidermidis* et *S. hominis* par exemple, entraîne également une inhibition de *S. aureus* tout en étant capable d'entrer en synergie avec la cathélicidine LL-37 humaine (**Nakatsuji *et al.*, 2017**). Enfin, dans certains cas, des composés produits par les bactéries cutanées peuvent également entraîner la sécrétion d'AMPs par les kératinocytes de la peau. C'est le cas de la lugdunine produite par *S. lugdunensis* (**Zipperer *et al.*, 2016**) qui déclenche la libération de cathélicidine LL-37 et d'interleukine 8, une cytokine permettant le recrutement des neutrophiles lors de la réponse immunitaire (**Bitschar *et al.*, 2019**).

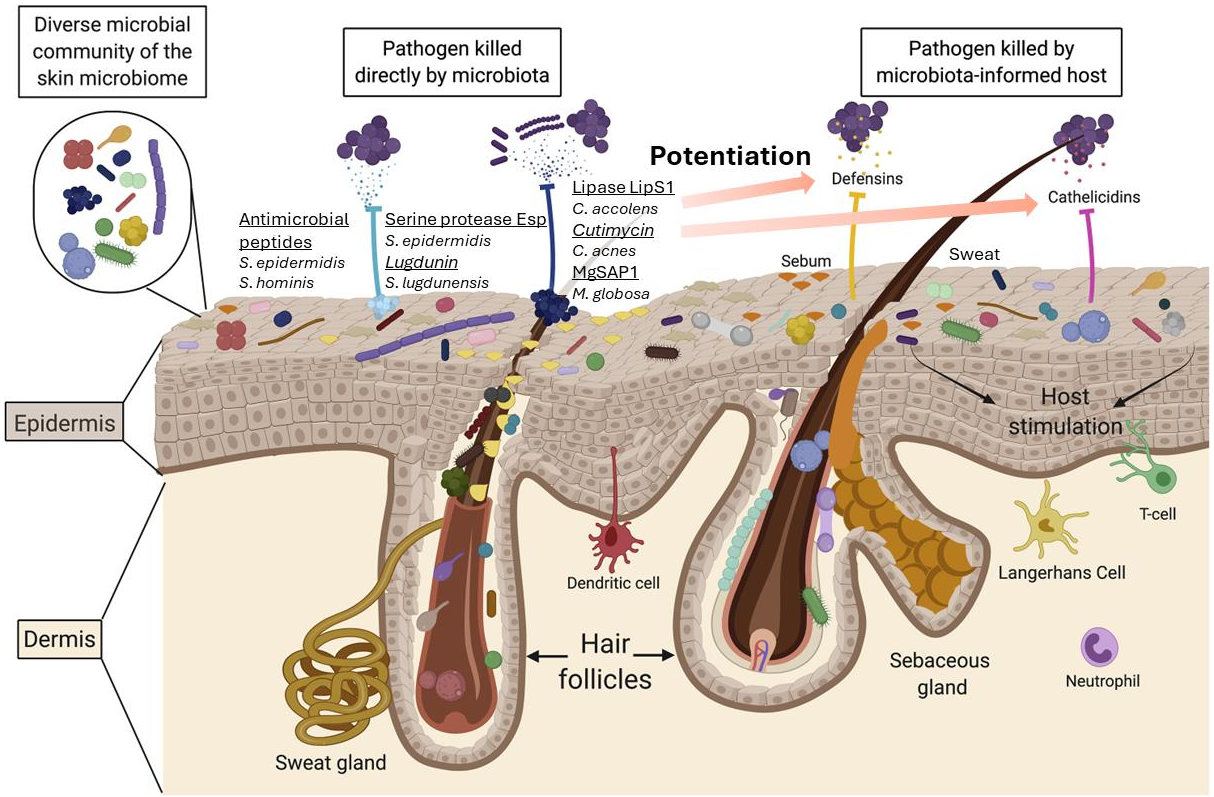


Figure 7 : Mécanismes de « colonization resistance » permettant au microbiote cutané d'assurer une protection contre les agents pathogènes. *Les microorganismes peuvent sécréter diverses molécules et peptides antimicrobiens (AMPs), leur permettant d'avoir une action directe sur les pathogènes. En parallèle, le microbiote peut également potentialiser l'effet des AMPs produits par l'hôte et enclencher la mise en place d'une réponse immunitaire (**voir point IV-2**). La combinaison de ces interactions microorganismes – microorganismes et microorganismes – hôte joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cutanée (adapté de **Flowers and Grice, 2020**).*

De plus, plusieurs espèces de CoNS peuvent interférer avec le système *agr* de *S. aureus* qui est indispensable pour la virulence du pathogène (**Paharik *et al.*, 2017 ; Williams *et al.*, 2019**). Une autre étude a également montré que *Corynebacterium striatum* provoque une modification de la transcription des gènes chez *S. aureus*, augmentant ainsi sa capacité de colonisation aux dépends de la production de facteurs de virulence et favorisant ainsi son implantation et sa transition de pathogène à commensal (**Ramsey *et al.*, 2016**). Une autre étude a indiqué que *Corynebacterium accolens* produit la lipase LipS1, capable d'hydrolyser la trioléine pour obtenir de l'acide oléique, ce qui inhibe les pneumocoques tels que *Streptococcus pneumoniae in vitro* (**Bomar *et al.*, 2016**). *Cutibacterium acnes* sécrète également la cutimycine, un antibiotique lui permettant d'empêcher la colonisation des follicules pileux par *S. aureus* (**Claesen *et al.*, 2020**).

Enfin, il semblerait que tous les génomes des souches de *C. acnes* de phylotype I-2 codent pour la biosynthèse d'un thiopeptide susceptible d'exercer une activité antimicrobienne contre *S. epidermidis* (**Christensen *et al.*, 2016**).

En dehors des interactions bactériennes, une étude de **Li *et al.* (2018)** a démontré que la *Malassezia globosa* Secreted Aspartyl Protease 1 (MgSAP1) est capable d'hydrolyser la protéine A de *S. aureus*, un facteur de virulence nécessaire à la formation de biofilm et à l'échappement au système immunitaire du pathogène.

2- Stimulation du système immunitaire

La peau comprend un réseau de cellules et de médiateurs moléculaires qui forment ce que l'on appelle le « système immunitaire cutané » (**Abdallah *et al.*, 2017**). Celui-ci est capable de faire la distinction entre les microorganismes pathogènes et la flore commensale. Cette dernière va participer activement aux réponses immunitaires en produisant des AMPs ou en régulant le processus inflammatoire (**Baldwin *et al.*, 2017**) et va être un acteur important de l'immunité innée comme adaptative.

Une étude de **Meisel *et al.* (2018)** réalisée sur le transcriptome de souris avec et sans microbiote cutané a montré 2820 gènes différentiellement exprimés entre les deux groupes, notamment des gènes impliqués dans la réponse immunitaire de l'hôte et la différenciation de l'épiderme. Ainsi, les auteurs ont montré des différences dans l'expression des gènes liés aux réponses immunitaire innée et adaptative, notamment ceux codant les TLRs, les AMPs, les protéines du complément, les gènes impliqués dans la signalisation via les cytokines et chimiokines, ainsi que la localisation des LT. La capacité du microbiote à moduler l'expression de gènes appartenant au complexe de différenciation épidermique démontre également son implication dans la différenciation des kératinocytes.

1. Système immunitaire inné

Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature quant au rôle du microbiote intestinal dans le développement des structures lymphoïdes associées à l'intestin, les microorganismes commensaux de la peau ne sont pas nécessaires à l'organisation générale des tissus et cellules immunitaires (**Belkaid and Segre, 2014**). Cependant, ils sont tout de même impliqués à différents niveaux de la réponse immunitaire.

Les AMPs, décrit précédemment dans ce chapitre, ont un rôle primordial dans la composition des communautés microbiennes de la peau. Ces petits peptides possèdent une activité antimicrobienne à faible concentration contre une variété de microorganismes et ont également des propriétés immunomodulatrices (**Rademacher *et al.*, 2021**). Il semblerait que l'expression de certains AMPs cutanés soit dépendante de signaux bactériens. **Nagy *et al.* (2006)** ont démontré, *in vitro*, que des souches de *C. acnes* appartenant aux phylotypes IA et IB induisent l'hBD2 ainsi que l'expression de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires. En parallèle, les membres du microbiote cutané produisent et sécrètent eux-mêmes des AMPs. Ainsi les bactéries à Gram positif telles que les *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Streptomyces* spp. produisent des bactériocines leur permettant d'inhiber la croissance d'autres souches bactériennes (**Gallo and Hooper, 2012**). Les SPB (Short Peptide Bacteriocins) qui possèdent un seuil d'activité de l'ordre du nanomolaire ainsi que de faible chances d'entraîner le développement de résistances, agissent en interférant avec la synthèse du peptidoglycane, en formant des pores dans la membrane ou en inhibant l'ARN polymérase ainsi que la synthèse des protéines (**Joshi *et al.*, 2023**).

La flore commensale peut également augmenter l'expression des gènes codant pour les protéines du complément. Pour rappel, le complément désigne un groupe de plus de 25 protéines plasmatiques et membranaires engagées dans une cascade de réactions se terminant par la formation du complexe d'attaque membranaire. L'insertion de celui-ci dans la membrane des agents pathogènes va créer des pores, entraînant leur élimination. Ceci, couplé à la capacité d'opsonisation de ces protéines, en font un acteur majeur de la réponse immunitaire innée. Des expériences menées par **Chehoud *et al.* (2013)** ont démontré qu'une altération de l'expression de la protéine du complément C5aR entraîne une baisse de l'expression des AMPs, des PRRs et des médiateurs pro-inflammatoires chez la souris. En comparant des souris sans microbiote avec des souris conventionnelles, il est apparu que la flore commensale régule l'expression des gènes du complément (**Chehoud *et al.*, 2013**).

En cas de blessure au niveau de la peau, les cellules endommagées de la barrière cutanée libèrent des ARN capables d'activer le TLR3 présent sur les kératinocytes, provoquant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Dans ce contexte, des

travaux ont démontré que le LTA de *S. epidermidis*, qui est reconnu par le TLR2, va pouvoir inhiber la signalisation via le TLR3 par induction du TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1). Cette inhibition permet ainsi de limiter l'inflammation et démontre un rôle important des ligands bactériens dans la modulation de la réponse inflammatoire (**Figure 8**) (**Lai *et al.*, 2009 ; Nakamizo *et al.*, 2015**). A l'opposé, la flore commensale augmente l'expression de l'IL-1, une cytokine majeur impliquée dans l'initiation et l'amplification des réponses immunitaires. Cette voie de signalisation a également un impact sur la modulation de la fonction des LT, indiquant un rôle du microbiote cutané dans l'immunité adaptative (**Figure 8**) (**Naik *et al.*, 2012 ; Belkaid and Segre, 2014**).

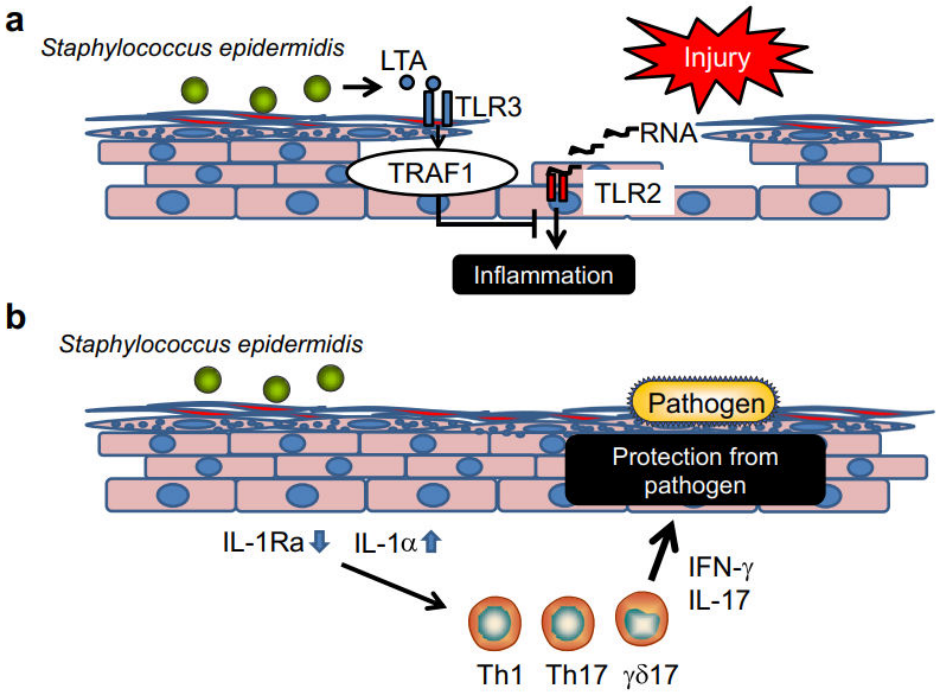


***Figure 8* : Modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives par *Staphylococcus epidermidis*.** *(**a**) Après une lésion cutanée, l'acide lipotéichoïque staphylococcique (LTA) inhibe la libération excessive de cytokines inflammatoires par les kératinocytes via l'induction du facteur TRAF1. (**b**) Staphylococcus epidermidis module la production d'IL-1 par les kératinocytes, ce qui induit la différenciation des lymphocytes T cutanés et joue un rôle dans la protection contre les pathogènes (**Nakamizo et al., 2015**). **LTA** : acide lipotéichoïque ; **TLR** : Toll-like Receptor ; **TRAF1** : TNF receptor-associated factor 1.*

2. Système immunitaire adaptatif

Le microbiote cutané est essentiel à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative, notamment au moment de la naissance. Une étude de **Scharschmidt *et al.***

(2015) a démontré qu'une exposition des nouveau-nés à *S. epidermidis* entraine une accumulation de Tregs sur la peau. Une inhibition de cette accumulation empêche le développement de la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la flore commensale. Chez les nouveau-nés, cette accumulation de Tregs est également liée au développement du follicule pileux (**Figure 9**).

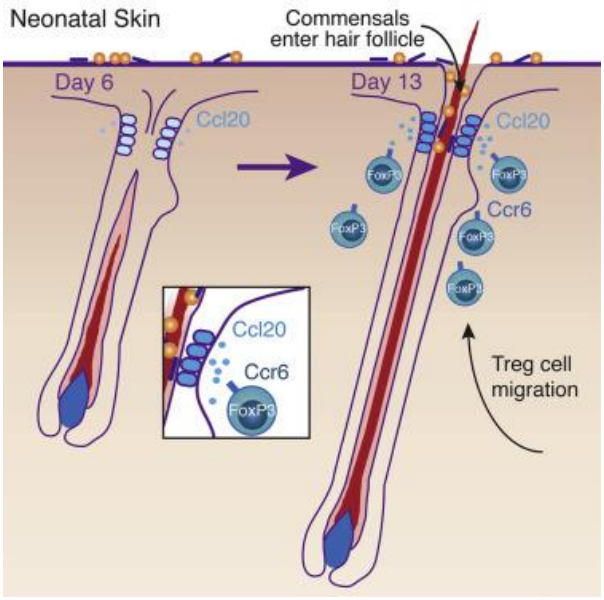


***Figure 9** : **Mise en place de la tolérance immunitaire vis-à-vis de la flore commensale** chez les nouveau-nés (**Scharschmidt et al., 2017**).*

Les auteurs ont ainsi identifié la chimiokines Ccl20, produite par ces follicules en présence du microbiote, et ont découvert qu'elle est capable de se fixer sur le récepteur Ccr-6 présent sur les Tregs cutanés chez les nouveau-nés (**Figure 9**). Cette voie Ccl20-Ccr6 favorise la migration des Tregs vers la peau aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (**Scharschmidt *et al.*, 2017**).

Les membres du microbiote cutané participent aussi à l'éducation des LT résidents de la peau. Ainsi, **Naik *et al.* (2015)** ont démontré que la production d'IL-1 par les cellules dendritiques après exposition à *S. epidermidis* induit une polarisation des LT cutanés en LT CD8+ producteurs d'IL-17A. Ces dernières auraient un rôle dans la production de deux AMPs appartenant à la famille des protéines S100 par les kératinocytes, renforçant ainsi également la réponse immunitaire innée.

De même, les Mucosal-associated invariant T cells (MAITs) sont un type cellulaire particulier faisant le lien entre immunité innée et adaptative. Les MAIT sont activées par

des ligands d'origine bactérienne et dérivés de la biosynthèse de la vitamine B (**Toubal *et al.*, 2019**). Ainsi, **Legoux *et al.* (2019)** ont montré que c'est le passage de la 5-(2-oxopropylideneamino)-6-d-ribitylaminouracil d'origine bactérienne, de la peau vers le thymus, qui entraîne le développement des MAITs après présentation par le CMH MR1. En complément, le travail de **Constantinides *et al.* (2019)** a précisé que l'induction des MAITs se fait pendant une période de temps limitée au début de la vie et nécessite une exposition à des microorganismes produisant des dérivés de la riboflavine.

De la même façon, l'acide mycolique présent dans l'enveloppe des *Corynebacterium* spp. favorise l'accumulation des LT γδ en passant par l'IL-23. Dans le contexte d'un régime riche en graisses, il a cependant été montré que cette interaction peut causer une inflammation au niveau cutané (**Ridaura *et al.*, 2018**).

3- Intégrité de la peau et réparation tissulaire

Le maintien de l'intégrité de la peau est absolument nécessaire à son bon fonctionnement. Dans ce cadre, l'importance des jonctions serrées dans la structure et la robustesse de la barrière cutanée a déjà été évoquée dans la première partie de ce Chapitre. Une étude de **Yuki *et al.* (2011)** a montré qu'une exposition de kératinocytes humains à du peptidoglycane, un composant de la paroi bactérienne, entraîne une augmentation de l'effet barrière des jonctions serrées. **Bäsler *et al.* (2017)** viennent apporter un peu de nuance à ce résultat en démontrant qu'une exposition à court terme à *S. aureus* semble en effet promouvoir l'effet barrière, tandis qu'une exposition à long terme fini par entraîner une altération de la fonction des jonctions serrées.

Ces altérations peuvent également correspondre à l'apparition de plaies cutanées. Celles-ci constituent une vaste catégorie de blessures allant des coupures et égratignures mineures aux incisions chirurgicales, aux brûlures et aux traumatismes graves. Ces ruptures de la barrière cutanée constituent un point d'entrée pour la colonisation par des microorganismes qui ne sont habituellement pas retrouvés sur la peau et/ou la translocation des constituants du microbiote vers des compartiments où ils n'apparaissent normalement pas (**Plichta *et al.*, 2017 ; Yang *et al.*, 2024**).

Le processus de cicatrisation qui fait suite à ces plaies comporte, en principe, trois étapes : l'inflammation, la formation de nouveaux tissus et le remodelage (**Gurtner *et al.*,**

2008). Il a été démontré que les bactéries commensales provoquent l'activation des neutrophiles et l'expression de la chimiokine CXCL10. Celle-ci possède une activité antimicrobienne et va également recruter des cellules dendritiques productrices des interférons de type I, ce qui va accélérer la réparation des plaies en déclenchant l'inflammation ainsi qu'en induisant la production de facteurs de croissance par les fibroblastes et les macrophages (**Di Domizio *et al.*, 2020**). Une autre étude de **Wang *et al.* (2021)** a montré que la flore cutané résidente, de même que la présence de *S. aureus*, participent à la régénération cutanée, et la néogenèse du follicule pileux suite à une plaie, par induction de l'IL-1β et de la voie MyD88 dépendante des kératinocytes. Par opposition, les travaux de **Canesso *et al.* (2014)** avaient conclu que l'absence de microbiote commensal chez un modèle murin accélérait la cicatrisation et permettait également une meilleure angiogenèse. Ces quelques exemples indiquent encore une fois le rôle très versatile du microbiote cutané (**Yang *et al.*, 2024**) et démontrent son implication dans des processus essentiel à l'intégrité de la barrière cutanée, qu'elle soit physique ou immunitaire.

V- Bacillus licheniformis

Dans le cadre de cette thèse, *B. licheniformis* a été isolée pour la première fois à partir d'un écouvillonnage du cuir chevelu et a fait l'objet d'un premier article intitulé « Identification of a scalp associated *Bacillus licheniformis* strain with unexpected Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sensitivity » (**Hadjiev *et al.*, in preparation**). Pour cette raison, les caractéristiques principales de cette bactérie vont être abordées dans la dernière partie de ce Chapitre 1.

1- Présentation générale

Bacillus licheniformis appartient au groupe *Bacillus subtilis*, au genre *Bacillus* faisant partie de la famille des *Bacillaceae*, et au phylum des Firmicutes (nouvellement nommé *Bacillota*) (**National Center for Biotechnology Information – Taxonomy Browser**). C'est un bacille à Gram positif, anaérobie facultatif, mésophile et sporulant communément retrouvé dans les échantillons de sol et de plantes (**Muras *et al.*, 2021**). Grâce à la mise en place d'une analyse MLST réalisée sur 6 gènes de ménage (*adk*, *ccpA*, *recF*, *rpoB*, *spo0A* et *sucC*) de 53 souches provenant de divers sources (nourriture, environnement et clinique), **Madslien *et al.* (2012)** ont établi l'existence de deux sous-groupes A et B

chez *B. licheniformis*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **De Clerck and De Vos (2004)** qui avaient déjà identifié deux lignées différentes en se basant, entre autres, sur les gènes *rpoB* et *gyrA* ainsi que l'ARNr 16S. Environ 74% des souches semblent appartenir au groupe B, où l'on retrouve également la souche de référence ATCC14580 (ou DSM 13), tandis que le groupe A semble différer et présente un taux de recombinaison plus élevé (**Madslien *et al.*, 2012**). L'existence d'un lien entre ces regroupements par lignées et le potentiel pathogène reste très discuté mais semble essentiellement lié à la capacité de production d'une toxine (**De Clerck and De Vos, 2004 ; Madslien *et al.*, 2012**).

Historiquement, *B. licheniformis* est une espèce particulièrement connue pour son fort intérêt biotechnologique dans la production de composés bioactifs, avec des applications vastes allant de l'industrie agro-alimentaire à la biomédecine et l'industrie pharmaceutique (**Muras *et al.*, 2021**). Elle est aussi souvent retrouvée en tant que contaminant de divers procédés industriels (**De Clerck and De Vos, 2002 ; Suihko and Stackebrandt, 2003**). Bien que généralement considérée comme une espèce non pathogène en raison de l'absence de caractère invasif (**Muras *et al.*, 2021**), plusieurs cas d'intoxication alimentaire (**Pavić *et al.*, 2005 ; Logan, 2012 ; Rønning *et al.*, 2015**), de production de toxines (**Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999 ; Mikkola *et al.*, 2000**), d'infections cliniques (**Park *et al.*, 2006 ; Haydushka *et al.*, 2012 ; Padhi *et al.*, 2012 ; Yuste *et al.*, 2016**) ainsi que de mammites et avortements chez les bovins (**Hommez *et al.*, 1997 ; Agerholm *et al.*, 1999 ; Nieminen *et al.*, 2007**) ont été reportés sur les 20 dernières années. Ainsi, cette espèce fait l'objet d'un intérêt grandissant, démontré par l'augmentation du nombre de publications à son sujet (**Muras *et al.*, 2021**).

2- Intérêt biotechnologique

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont connues dans la littérature pour leurs multiples applications biotechnologiques (**Figure 10**).

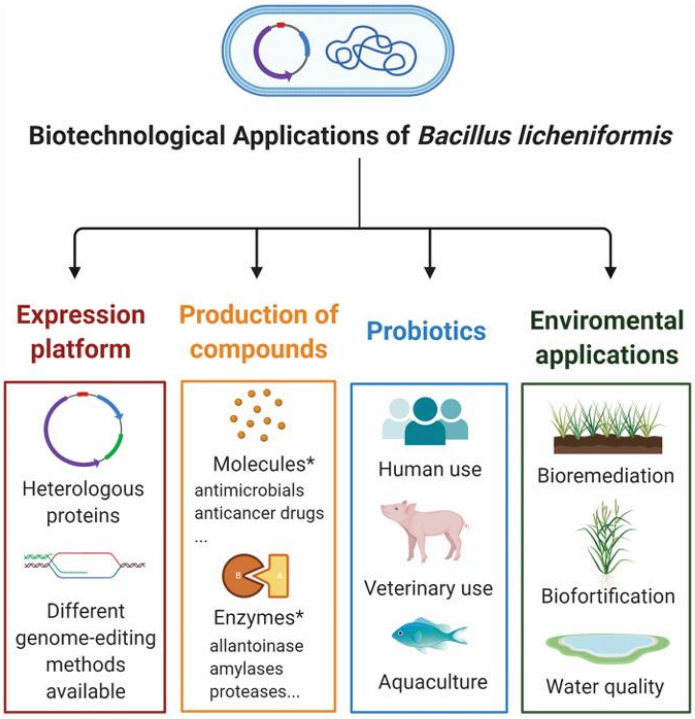


Figure 10* : *Principales applications biotechnologiques de Bacillus licheniformis. *Les éléments présentés ici constituent une liste non exhaustive des multiples applications biotechnologiques de Bacillus licheniformis, allant ainsi de la production de protéines recombinantes et de composés au sens large, à son utilisation en tant que probiotique en santé humaine et animale et jusqu'à des applications environnementales (**Muras et al., 2021**).*

Plusieurs auteurs ont ainsi mis en évidence l'utilisation des *Bacillus* spp., sporulants ou non, comme additifs alimentaires (**Wang *et al.*, 2016**), probiotiques (**Elshaghabee *et al.*, 2017 ; Lee *et al.*, 2019**) et outils biologiques pour la préservation des cultures (**Radhakrishnan *et al.*, 2017**). *B. licheniformis* est depuis longtemps utilisée comme vecteur d'expression pour la production de protéines recombinantes. En particulier, plusieurs souches ont fait l'objet de publications pour leur capacité à produire des enzymes telles que la β-mannanase (**Niu and Wang, 2007**), l'α-amylase (**Niu *et al.*, 2009**), et la nattokinase (**Wei *et al.*, 2015**). De manière générale, en raison de son mode de vie saprophyte, *B. licheniformis* produit naturellement un panel d'enzymes (cellulases, chitinases, glucosidases, lipases, protéases, *etc.*) lui permettant de dégrader les composés dont elle a besoin et constituant donc une source intéressante pour des applications biotechnologiques (**Muras *et al.*, 2021**). En parallèle, tout comme de nombreux autres membres du genre *Bacillus*, *B. licheniformis* est également une source de composés ayant des activités antibactériennes et antifongiques (**Cui *et al.*,**

2012 ; Tareq *et al.*, 2015 ; Ji *et al.*, 2020) tels que la lichenine et la bacillocine (**Pattnaik *et al.*, 2001 ; Martirani *et al.*, 2002 ; He *et al.*, 2006**) mais également antivirales et immunomodulatrices (**Arena *et al.*, 2006**). D'autres composés tels que des L-asparaginases (**Mahajan *et al.*, 2014 ; Alrumman *et al.*, 2019**) ont démontré des activités anti-cancéreuses. Par ailleurs, bien que le mode d'action précis associé à l'utilisation de *B. licheniformis* en tant que probiotique reste à ce jour mal connu, plusieurs produits commerciaux utilisant cette espèce sont déjà disponibles sur le marché. **Muras *et al.* (2021)** ont dressé une liste de ces probiotiques utilisés aussi bien en santé humaine, qu'en tant qu'additif alimentaire en élevage ou en aquaculture. Dans la majorité des cas, la formulation inclus cependant d'autres *Bacillus* spp. en plus de *B. licheniformis* (**Muras *et al.*, 2021**). Des études ont aussi démontré la capacité de *B. licheniformis* à améliorer la qualité de l'eau, que cela soit seule (**Lalloo *et al.*, 2007 ; Liang *et al.*, 2015**) ou en association avec l'algue *Chlorella vulgaris* (**Liang *et al.*, 2013 ; Ji *et al.*, 2018**). De même, **Jamil *et al.* (2014)** ont mis en avant l'utilisation d'une souche de *B. licheniformis* pour la décontamination des sols et la phytoremédiation tandis que deux autres souches décrites par **Yasin *et al.* (2015)** participent à la biofortification des plantes en améliorant leur absorption de sélénium et de nutriments. Enfin, une activité anti-biofilm de *B. licheniformis* contre divers espèces bactériennes et fongiques, considérées comme pathogènes, a été mise en évidence et est liée à la production de lipopeptides (**Rivardo *et al.*, 2009**), d'exopolysaccharides (**Sayem *et al.*, 2011 ; Spanò *et al.*, 2016**) ou de protéines extracellulaires (**Dusane *et al.*, 2013**).

3- Sporulation

La formation de spores est une forme de résistance des microorganismes à des conditions environnementales défavorables telles que le manque de nutriments. Certaines espèces de *Bacillus*, dont *B. licheniformis*, sont capables de former des endospores, des cellules métaboliquement dormantes et résistantes à des conditions extrêmes de température, de dessication et de radiations (**Higgins and Dworkin, 2012**). Ces spores vont être particulièrement problématiques dans l'industrie agroalimentaire car elles vont survivre aux procédés de chauffage couramment utilisés pour la conservation des aliments tels que la pasteurisation (**Yeak *et al.*, 2022**). Elles pourront ensuite germer à nouveau en réponse à des signaux environnementaux et se développer

dans les produits alimentaires (**Higgins and Dworkin, 2012 ; Yeak *et al.*, 2022**). *B. licheniformis* est d'ailleurs un des microorganismes sporulants majoritaires dans les cas de contamination de poudre de lait (**Miller *et al.*, 2015 ; Eijlander *et al.*, 2019**) et peut également être retrouvé dans les épices et herbes séchées (**Mathot *et al.*, 2021**) ainsi que la farine (**Iurlina *et al.*, 2006**). Récemment, **Pickering *et al.* (2018)** ont montré que l'exposition d'une lignée de cellules épithéliales bronchiques NuLi-1 à des particules de poussière irradiées aux UV entraîne une augmentation de la production d'IL-6 et IL-8. Après avoir constaté la présence d'une croissance microbienne dans leurs échantillons de particules, ils ont identifié par séquençage de l'ARNr 16S la présence de *B. licheniformis* et ont donc réalisé un traitement thermique des particules à 100°C afin d'éliminer le contaminant. Cela a eu pour conséquence de réduire l'inflammation par rapport aux échantillons non traités. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que *B. licheniformis* pourrait être présente sous forme d'endospores dans les particules de poussière et pourrait ensuite germer après pénétration dans le tractus respiratoire et donc provoquer une inflammation. Ces travaux viennent compléter les éléments évoqués précédemment sur le potentiel pathogène de la bactérie puisqu'une exposition des cellules à des doses croissantes de *B. licheniformis* a montré une cytotoxicité de la bactérie au bout de 24h. **Rey *et al.* (2004)** ont évoqué, entres autres, la présence de gènes codant des sérines protéases (*aprE*, *epr*, *vpr*), une métalloprotéase (*mpr*) ainsi que des endo- et exopeptidases (*yjbG*, *ydiC*, *gcp*, *ykvY*, *ampS*, *bpr*, *yfxM*, *yuiE*, *yusX*, *ywaD*, *pepT*) chez *B. licheniformis*. Une hypothèse émise par **Pickering *et al.* (2018)** pour expliquer leurs résultats de cytotoxicité repose donc sur la production de ces protéases par la bactérie.

4- Production de lichenysine

Plusieurs études ont démontré que *B. licheniformis* est capable de provoquer des intoxications alimentaires. Les travaux de **Mikkola *et al.* (2000)** ont mis en évidence que la cause de ces intoxications peut être liée à la production d'un lipopeptide cyclique non ribosomique nommé lichenysine. Il s'agit d'un métabolite secondaire codé par le cluster de gènes *lchAA-AB-AC-TE* (ou *licA-TE*) (**Konz *et al.*, 1999**). Les lipopeptides sont notamment connus pour leurs propriétés thérapeutiques en tant qu'antibiotiques ainsi que pour leur intérêt biotechnologique (**Seydlová and Svobodová, 2008**). La surfactine,

produite par *B. subtilis*, est un des membres le plus connu de cette classe de composés, notamment pour son large spectre d'activités antimicrobiennes et antivirales (**Jia *et al.*, 2024**). Une autre de ses caractéristiques est sa capacité à agir en tant que biosurfactant. Pour rappel, les biosurfactants sont des substances amphiphiles capables d'abaisser la tension superficielle à l'interface entre deux phases (*i.e.* eau/huile ou air/eau) (**Seydlová and Svobodová, 2008 ; Singh *et al.*, 2019**). Cette propriété est également retrouvée chez la lichenysine de *B. licheniformis* dont la structure est très similaire à celle de la surfactine (**Figure 11**).

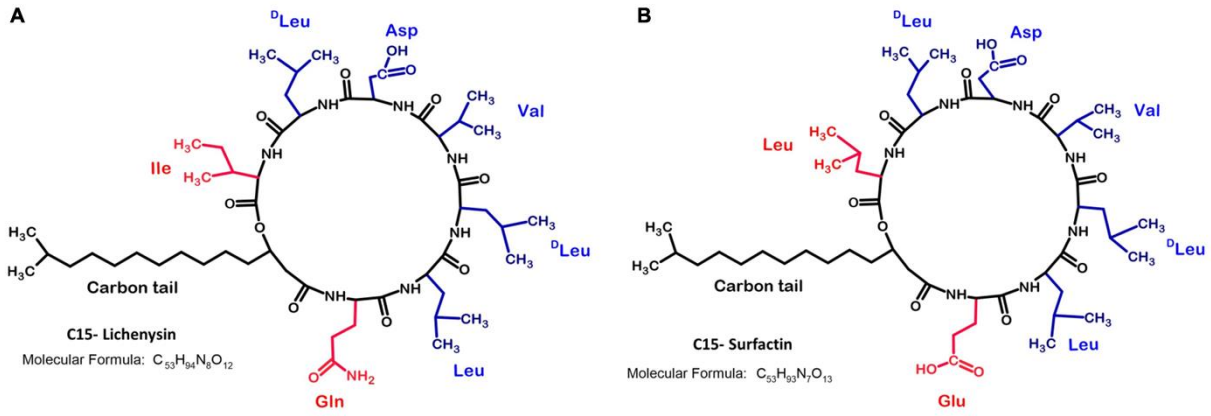


***Figure 11* : Comparaison des structures de la C15-Lichenysine (A) et de la C15-Surfactine (B).** *Les positions 1 et 7 de l'anneau peptidique diffèrent entre la lichenysine A et la surfactine et sont indiquées en rouge (**Yeak et al., 2022**).*

La lichenysine existe sous plusieurs isoformes (**Yeak *et al.*, 2022**) et une étude de **Madslien *et al.* (2012)** a confirmé la présence du gène *lchAA*, codant pour la lichenysin synthetase A, chez l'intégralité des 53 isolats faisant l'objet de leurs travaux. Les auteurs ont également confirmé la production d'au moins un isoforme du lipopetide, bien qu'en quantités différentes, par toutes les souches. Cependant, (**Yeak *et al.*, 2022**) évoque le fait que la présence du cluster à lui seul ne garantit pas la production de lichenysine et que cette dernière dépendrait des niveaux de transcription, de traduction ainsi que de l'activité de la lichenysine synthetase et des conditions environnementales.

En termes d'activité, les surfactants sont des composés particulièrement stables en conditions extrêmes de pH, température ou salinité et présentent généralement un bon pouvoir solubilisant, moussant, émulsifiant et détergent. Outre ces propriétés, la lichenysine est également un bon chélateur d'ions, et est capable d'exercer une activité

antibiotique, antiadhésive et anti-biofilm, ainsi que d'interagir et de perturber les membranes cellulaires (**Coronel-León *et al.*, 2016; Yeak *et al.*, 2022**). **Madslien *et al.* (2012)** ont rapporté une activité hémolytique proportionnelle à la concentration de lichenysine et ont démontré une cytotoxicité d'extraits contenant le lipopetide, à des concentrations supérieures à 10 µg/mL et 33 µg/mL, respectivement sur des spermatozoïdes de sanglier et la lignée cellulaire Vero dérivée du singe. Les auteurs n'excluent pas la possible présence d'une autre substance toxique thermostable dans ces mêmes extraits puisque leur étude s'est uniquement focalisée sur la lichenysine. Les travaux plus récents de **Yeak *et al.* (2022)** ont à nouveau confirmé la production de lichenysine chez 11 isolats alimentaires de *B. licheniformis*, sans que l'activité hémolytique ne soit généralisée à toutes les souches. De même, les auteurs observent des variations dans la quantité de lipopetide produite en fonction du milieu de culture et de la température d'incubation et précisent qu'aucune production n'est détectée dans leurs conditions à des densités cellulaires inférieures à 5 $\log_{10}$ UFC/ml. Enfin, il s'agit de la première étude s'intéressant à la cytotoxicité de la lichenysine sur une lignée cellulaire humaine, celle des cellules épithéliales intestinales Caco-2. Une réduction de la viabilité cellulaire de l'ordre de 50% est observée pour une concentration (IC_{50}) de 16.6 µg/mL, contre 16.8 µg/mL sur des organoïdes d'iléon de porc. Des études complémentaires réalisées sur chaque isoforme pur de la lichenysine, plutôt que sur un mélange, permettraient d'aller plus loin sur la compréhension du mécanisme d'action de ce lipopeptide (**Yeak *et al.*, 2022**).

En conclusion de cette partie sur *B. licheniformis*, il semblerait que cette espèce présente de nombreuses applications dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire, la santé humaine et l'environnement. Cependant, chaque article se concentre davantage sur les spécificités d'une souche donnée, ce qui ne permet pas de savoir si les caractéristiques décrites peuvent être généralisées à l'espèce dans sa globalité. De même, la majorité du temps, le mécanisme d'action sous-jacent à l'utilisation de ces souches est mal connu. Dans ces circonstances, le travail réalisé pendant cette thèse vient apporter encore plus de nuances au sujet de *B. licheniformis* en étudiant cette bactérie, pour la première fois, dans un contexte cutané.

Chapitre 2 – Endocrinologie Microbienne

I- La peau en tant qu'organe neuro-immuno-endocrinien

La peau représente la plus grande surface d'interaction de l'organisme avec l'environnement extérieur. Par son origine embryonnaire commune avec le système nerveux (SN), elle est constituée d'un réseau nerveux riche et complexe capable de répondre aux stimuli physiques (mécaniques, thermiques, rayonnement UV), chimiques et biologiques (allergènes, agents microbiens, inflammation), ainsi qu'à des facteurs internes provenant de la circulation sanguine ou du stress émotionnel. La transmission de ces informations au système nerveux central (SNC) permet de déclencher une réponse appropriée au niveau cutané par le biais des systèmes immunitaire et endocrinien, entraînant ainsi la libération de cytokines, chimiokines, neuropeptides, neurohormones et neurotransmetteurs (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Shastri *et al.*, 2024**). L'association anatomique étroite qui existe entre ces différents acteurs, la présence de récepteurs neuropeptidiques spécifiques sur les cellules immunitaires et non immunitaires, ainsi que de récepteurs aux cytokines sur les neurones sensoriels donnent lieu à des interactions complexes jouant un rôle majeur dans la fonction immunitaire et l'inflammation (**Trier *et al.*, 2019 ; Tamari *et al.*, 2021 ; Shastri *et al.*, 2024**).

Jusqu'à présent, le Chapitre 1 s'est focalisé sur la structure de la peau et de ses annexes, tout en abordant la composition et la fonction du microbiote cutané. Le Chapitre 2 complète ces informations en soulignant l'importance de la peau en tant qu'organe neuro-immuno-endocrinien et en mettant en évidence l'interaction entre les microorganismes et différents neuromédiateurs.

1- Le système nerveux cutané

Le SN est un réseau de cellules neuronales et de nerfs capables de coordonner les fonctions vitales de l'organisme. Il est constitué du SNC (encéphale et moelle épinière) et du prolongement de celui-ci, nommé système nerveux périphérique (SNP), qui permet de réguler un grand nombre de fonctions au sein de l'organisme. Le SN cutané fait partie du SNP et comporte des fibres nerveuses afférentes, transmettant au SNC des messages provenant des récepteurs sensoriels de la peau ; ainsi que de nerfs appartenant au SN autonome qui entre dans la régulation des fonctions vitales et viscérales de l'organisme

(**Roosterman *et al.*, 2006 ; Dictionnaire de l'Académie Nationale de Médecine – version 2024**). Ces nerfs sensoriels et autonomes ont une influence sur la physiologie (vasoconstriction/vasodilatation, différenciation, croissance, nutrition cellulaire, fonction de barrière, sécrétion, *etc.*) et la pathophysiologie (défenses immunitaires, inflammation, apoptose, cicatrisation) de la peau (**Roosterman *et al.*, 2006**).

1. Anatomie et physiologie

D'après la classification d'Erlanger et Gasser, le SN comporte 4 groupes de fibres nerveuses qui se différencient au niveau de la vitesse de circulation de l'influx nerveux. Celle-ci est dépendante de la présence ou non d'une gaine de myéline ainsi que du diamètre de l'axone. On retrouve donc d'une part les fibres de type Aα, Aβ et Aδ qui sont myélinisées et possèdent une conduction rapide à modérée ; et d'autre part les fibres nerveuses de type C, non myélinisées et à conduction lente (**Tableau 1**). Les fibres Aα étant associées aux faisceaux musculaires et aux organes tendineux, elles ne seront pas abordées dans ce Chapitre (**Roosterman *et al.*, 2006**).

a. Nerfs autonomes

La peau possède des connexions avec le SN autonome reposant majoritairement sur des neurones sympathiques (adrénergiques), et dans le cas du visage, sur des neurones parasympathiques (cholinergiques) (**Shastri *et al.*, 2024**). Les nerfs autonomes sont en minorité par rapport aux nerfs sensoriels et leur distribution est limitée au derme, innervant ainsi les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les glandes sudoripares et les follicules pileux. Elles vont ainsi impacter le tonus vasculaire, le fonctionnement du muscle érecteur du poil ainsi que la transpiration et la température corporelle par une double régulation, cholinergique et noradrénergique, des glandes eccrines et apocrines respectivement (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Shastri *et al.*, 2024**). En plus des neurotransmetteurs classiques, les nerfs autonomes vont également libérer des neuropeptides tels que le neuropeptide Y (NPY), la galanine, le CGRP, la SP ou encore le peptide VIP (**Roosterman *et al.*, 2006**). Ces neuromédiateurs interviennent, de concert avec l'acétylcholine et la noradrénaline, dans la régulation des fonctions citées ci-dessus.

b. Nerfs sensoriels

Les nerfs sensoriels sont des prolongements des neurones pseudo-unipolaires des ganglions spinaux et sont présents dans les trois couches de la peau (épiderme, derme et hypoderme). Les fibres de type Aβ véhiculent des informations tactiles et mécaniques (pression, vibration, *etc.*) et possèdent des extrémités associées à des structures complexes (disques de Merkel et corpuscules de Meissner, Ruffini et Pacini entres autres) qui incluent la présence d'une capsule conjonctive et de cellules de Schwann pour la myélinisation (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Tachdjian, 2016 ; Shastri *et al.*, 2024**). Ce sont des récepteurs à bas seuil d'activation et répondant à des stimuli non dommageables et de faible intensité (**Lawson, 2002**). Les fibres Aδ et C, quant à elle, possèdent des terminaisons nerveuses libres ayant un haut seuil d'activation et répondant à des stimuli de haute intensité, donnant souvent lieu à une sensation de douleur (**Lawson, 2002 ; Shastri *et al.*, 2024**). De ce fait, en plus de transmettre des informations mécaniques, ces nerfs reconnaissent également les stimuli thermiques et sont impliqués dans la nociception. La localisation et la pilosité vont exercer une influence sur l'innervation d'une zone cutanée donnée mais la plupart des terminaisons/structures réceptrices vont se situer à la frontière dermo-épidermique. Les seules exceptions concernent les disques de Merkel et les extrémités libres de type C qui peuvent être retrouvées au niveau des kératinocytes (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Shastri *et al.*, 2024**). Une augmentation de l'innervation de l'épiderme a déjà été observée en réponse à des maladies inflammatoires ou des cancers de la peau, des lésions cutanées et leur cicatrisation ou en cas d'hyperplasie épithéliale après exposition au rayonnement UV (**Roosterman *et al.*, 2006**).

L'ensemble des caractéristiques ci-dessus, de même que des informations complémentaires sur chaque fibre nerveuse et structure associée, sont résumées dans le **Tableau 1**.

2. Connexions avec le système nerveux central

Le SNP cutané est efficacement contrôlé par le SNC. En réponse à la réception et à l'intégration des informations sensorielles (démangeaison, douleur, toucher, etc.), le SNC permet la transmission de signaux efférents permettant d'appréhender ces stimuli (**Roosterman *et al.*, 2006**).

Tableau 1 *:* ***Caractéristiques neurophysiologiques des fibres nerveuses sensitives cutanées*** *(adapté de* ***Shastri et al., 2024*** *avec des données de* ***Roosterman et al., 2006*** *et* ***Tachdjian, 2016****).*

Type de fibre nerveuse	**Aβ**				**Aδ**	**C**
Myélinisation	Modérée (6-12 µm)				Fine (1-5 µm)	Non myélinisée
Conduction	Rapide (35-75 m/s)				Modérée (5-30 m/s)	Lente (0.5-2 m/s)
Type de terminaison/récepteur	**Disque de Merkel**	**Corpuscule de Ruffini**	**Corpuscule de Wagner-Meissner**	**Corpuscule de Vater-Pacini**	**Terminaisons nerveuses libres**	
Localisation	Epiderme (*stratum basale*) et derme	Derme	Papilles dermiques (peau épaisse) et derme papillaire (doigts, paume des mains, plante des pieds)	Derme réticulaire et hypoderme	Derme papillaire et couches inférieures de l'épiderme	
Seuil d'activation	Faible, adaptation lente	Faible, adaptation lente	Faible, adaptation rapide	Faible, adaptation rapide	Elevé	
Fonction	Sensation tactile fine	Mécanorécepteur (étirement, pression, distorsion)	Mécanorécepteur (déformation, mouvement, toucher fin, vibrations faible fréquence)	Mécanorécepteur (vibrations haute fréquence, pression forte)	Mécanorécepteur, thermorécepteur (chaud), nocicepteur (douleur)	Mécanorécepteur, thermorécepteur (chaud et froid), nocicepteur, démangeaison

Le SNC va ainsi pouvoir moduler, accentuer ou inhiber les signaux neuronaux périphériques, notamment par l'intermédiaire de la matière grise présente dans le mésencéphale (**Shastri *et al.*, 2024**). Un bon exemple de la communication entre peau – SNP – SNC est le phénomène de démangeaison. Celui-ci va être perçu par les fibres nerveuses afférentes de type Aδ et C, qui vont ensuite transmettre l'information via la moelle épinière vers le thalamus puis jusqu'au cortex insulaire dorsal. Combiné à une stimulation importante des aires motrices, le signal renvoyé après traitement de l'information entraîne le geste inconscient de se gratter (**Roosterman *et al.*, 2006**).

2- Hormones libérées au niveau cutané

Initialement, la peau était considérée comme une cible passive du système neuroendocrinien, capable de répondre à des stimuli hormonaux générés par des glandes spécialisées et transmis par le système vasculaire et les nerfs cutanés (**Ramot *et al.*, 2021**). Parmi ces molécules, on retrouve des hormones classiques impliquées dans les grands axes neuroendocriniens du corps humain tels que l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (HHT) qui repose sur la sécrétion de thyréolibérine (TRH) et thyréostimuline (TSH) ; et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) qui fait intervenir la corticolibérine (CRH) et l'adrénocorticotrophine (ACTH) (**Ramot *et al.*, 2021**). Ainsi, plusieurs travaux ont démontré que la TRH et la TSH stimulent la biogénèse et l'activité des mitochondries dans l'épiderme et le follicule pileux (**Poeggeler *et al.*, 2010 ; Knuever *et al.*, 2012 ; Vidali *et al.*, 2014**) et que la TRH impact également l'activité des mélanocytes, la mélanogénèse et donc par extension, la pigmentation au niveau de ces mêmes follicules (**Gáspár *et al.*, 2011**). La CRH, l'ACTH et le cortisol jouent un rôle majeur dans la régulation des réponses de la peau à divers facteurs de stress et entraînent la production de différents peptides régulateurs et d'hormones stéroïdiennes (**Slominski *et al.*, 2000, 2013 ; Ramot *et al.*, 2021**). La prolactine, une hormone impliquée dans le transport des électrolytes et la production de lait par les glandes mammaires (**Walker *et al.*, 1989**) possède des récepteurs cutanés et contribue à l'expression de la kératine (**Ramot *et al.*, 2010**) ou encore à la modulation de la croissance des cheveux (**Foitzik *et al.*, 2006**). Enfin, les adipocytes, présents notamment dans l'hypoderme, peuvent générer des neurohormones, telles que l'adipokine ou la leptine, qui participent à la régulation de la prolifération des kératinocytes, à la

cicatrisation des plaies ainsi qu'au contrôle de la croissance du follicule pileux (**Yang *et al.*, 2015 ; Mercati *et al.*, 2019 ; Ramot *et al.*, 2021**).

Les travaux de **Slominski et Wortsman (2000)** ont décrit pour la première fois le concept selon lequel la peau peut être considérée comme un organe neuroendocrinien à part entière. Par la production locale et/ou la libération systémique d'hormones, de neuropeptides, neurotransmetteurs et autres régulateurs, la peau est capable d'établir une communication bidirectionnelle avec les systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire (**Figure 12**). Cette communication, à la fois autocrine et paracrine, participe à l'homéostasie cutanée mais également plus globalement à celle de l'organisme (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Zmijewski and Slominski, 2011 ; Theoharides *et al.*, 2016 ; Ramot *et al.*, 2021 ; Slominski *et al.*, 2022**).

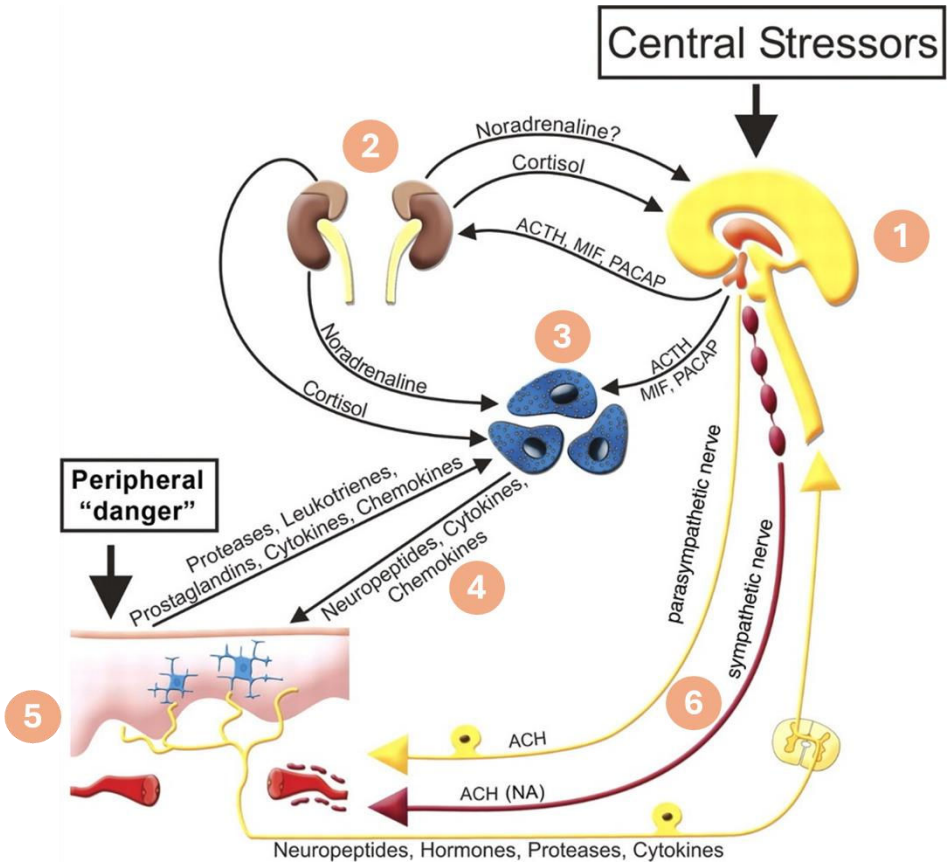


Figure 12* : *La peau en tant qu'organe neuro-immuno-endocrinien. *(**1**) Divers facteurs de stress entraînent la libération de neuromédiateurs par le système nerveux central (ACTH, polypeptide activateur de l'adénylate cyclase hypophysaire (PACAP), MIF, etc.). Ils peuvent soit (**2**) stimuler la libération de norépinéphrine et de cortisol par les glandes surrénales, soit (**3**) stimuler directement les leucocytes (bleu) dans le système sanguin afin de moduler les réponses immunitaires. La noradrénaline et le cortisol agissent, elles*

*aussi, sur plusieurs cellules immunitaires (lymphocytes, granulocytes et macrophages). (**4**) Les cellules immunitaires libèrent des cytokines, des chimiokines et des neuropeptides qui modulent les réponses inflammatoires de la peau. (**5**) En cas de stimulation, les nerfs sensoriels cutanés libèrent des neuromédiateurs qui modulent la douleur, la démangeaison ou encore l'inflammation cutanée. Cette dernière affecte à son tour l'activation des cellules immunitaires via des cytokines, chimiokines, prostaglandines et leucotriènes. (**6**) Les nerfs autonomes (sympathiques et, plus rarement, parasympathiques) innervent également plusieurs cellules de la peau (**Roosterman et al., 2006**).*

En plus d'être une source importante de vitamine D, la peau et ses annexes sont également capable de synthétiser des médiateurs impliqués dans les grands axes neuroendocriniens du corps humain cités ci-dessus (**Zmijewski and Slominski, 2011 ; Ramot *et al.*, 2021**). Il apparait ainsi que l'épiderme humain produit de la TSH et que l'expression de celle-ci est stimulée par la TRH et régulée négativement par les hormones thyroïdiennes, tout comme dans l'axe HHT (**Slominski *et al.*, 2002 ; Bodó *et al.*, 2010**). Il existe également un axe HHS pleinement fonctionnel au niveau cutané (**Ito *et al.*, 2005 ; Slominski *et al.*, 2013**) avec une expression de la pro-opiomélanocortine (POMC), de la CRH et de son récepteur, ainsi qu'une synthèse de glucocorticoïdes par les cellules de la peau et de l'immunité. Le POMC étant le précurseur de l'ACTH, de l'α- et de la γ-mélanotropine (MSH) et des β-endorphines, ces hormones sont donc aussi produites par les différentes structures cutanées (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Slominski *et al.*, 2007 ; Ramot *et al.*, 2021**). Les glandes sudoripares eccrines peuvent produire une protéine prolactin-like (**Walker *et al.*, 1989**) tandis que la peau et les follicules pileux libèrent la prolactine en tant que telle (**Richards and Hartman, 1996 ; Foitzik *et al.*, 2006**), la production de cette dernière étant influencée par des facteurs hormonaux (TRH, œstrogènes, *etc.*) et immunitaires (TNF-α, IFN-γ) (**Langan *et al.*, 2010, 2013**). D'autres neurohormones et neuromédiateurs tels que la SP, la neurokinine A (NKA), la neurotensine, le CGRP, le VIP, le polypeptide activateur de l'adénylate cyclase hypophysaire (PACAP), le peptide histidine-isoleucinamide (PHI), le NPY, la somatostatine, l'enképhaline, la galanine, la dynorphine, la sécrétoneurine, l'acétylcholine, l'adrénaline et la noradrénaline sont également retrouvés au niveau cutané (**Slominski and Wortsman, 2000 ; Roosterman *et al.*, 2006**). La manière dont la production des neurohormones et l'expression cutanée de leurs récepteurs sont régulés

reste cependant largement inconnue. La peau humaine peut réaliser la conversion enzymatique des prohormones en neurohormones actives, ou les dégrader par des enzymes synthétisées localement mais la façon dont l'expression et l'activité de ces enzymes cruciales sont contrôlés *in vivo* dans des conditions physiologiques et pathologiques reste à explorer (**Ramot *et al.*, 2021**). Cette situation se complexifie d'autant plus que les neurohormones produites dans la peau peuvent atteindre le SNC et déclencher des réponses neuroendocriniennes centrales complexes, qui peuvent ensuite agir en retour sur la peau. La compréhension des fonctions spécifiques de chaque neurohormone est également entravée par le fait qu'elles ont généralement un impact sur l'expression/la production d'autres neurohormones et/ou de leurs récepteurs, de même que par les différences de réponses en fonction du sexe (**Ramot *et al.*, 2021**). Toutes ces interactions neuro-hormonaux-cutanées influencent cependant une variété de fonctions physiologiques et physiopathologiques, y compris la croissance cellulaire, l'immunité, l'inflammation, le prurit et la cicatrisation des plaies. Plusieurs excellents articles scientifiques sur le sujet ont été publiés, au fur et à mesure des années, et réalisent une analyse encore plus approfondie des éléments cités ici (**Black, 2002 ; Steinhoff *et al.*, 2003 ; Roosterman *et al.*, 2006 ; Ramot *et al.*, 2021 ; Slominski *et al.*, 2022 ; Shastri *et al.*, 2024**).

Au-delà des interactions bien établies entre les systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire, une dimension complexe supplémentaire émerge lorsqu'on intègre la présence du microbiote cutané. Ce vaste ensemble de microorganismes vivant en symbiose sur et dans les couches de la peau joue un rôle essentiel dans l'équilibre immunitaire local, tout en étant potentiellement influencé par les signaux hormonaux et neuronaux. Les exemples développés dans les points suivants servent à explorer les échanges entre microorganismes et hormones, démontrant une nouvelle fois la communication bidirectionnelle entre l'hôte et son microbiote.

II- Endocrinologie microbienne

Le début du XXème siècle a été marqué par des avancées scientifiques majeures, ouvrant la voie à une nouvelle ère dans le domaine de l'Endocrinologie. Ainsi, l'adrénaline fut la première hormone humaine à être purifiée, grâce aux travaux du chimiste japonais Jokichi Takamine, apportant des solutions thérapeutiques inédites pour l'époque. Son

rôle dans la vasoconstriction, l'augmentation de la pression artérielle et le rythme cardiaque en firent un atout médical précieux (**Yamashima, 2003**). Cependant, plusieurs cas de septicémies, suite à l'injection d'adrénaline chez des patients sains et sans antécédents, firent leur apparition vers la fin des années 1920. **Renaud et Miget (1930)** ont ainsi rapporté un cas de gangrène gazeuse après l'injection d'une dose d'adrénaline pour un traitement contre l'urticaire. L'utilisation de seringues en verres contaminées par des spores de *Clostridium perfringens* fut mise en cause, permettant par la suite de découvrir que l'adrénaline réduisait fortement la dose de bactéries nécessaire pour provoquer une infection (**Cooper, 1946 ; Evans *et al.*, 1948**). Les explications quant à cet effet furent d'abord centrées sur l'hormone en elle-même et sa capacité à inhiber le système immunitaire, facilitant ainsi la prolifération microbienne. La possibilité qu'un microorganisme puisse détecter et répondre à la présence d'une hormone humaine en adaptant sa virulence était encore inenvisageable. Bien plus tard, plus précisément en **1981**, **LeRoith *et al.*** ont démontré que la bactérie *Escherichia coli* K12 est capable de produire une molécule possédant des propriétés similaires à celles de l'insuline humaine. Dans les années 1990, des travaux portant sur les hormones du stress, ou catécholamines, ont montré leur impact sur l'augmentation de la réponse immunitaire innée tout en soulignant une susceptibilité aux infections accrue (**Lyte *et al.*, 1990 ; Peterson *et al.*, 1991**). Ce paradoxe a entraîné des études démontrant une stimulation de la prolifération des bactéries à Gram négatif (**Lyte and Ernst, 1992, 1993 ; Lyte *et al.*, 1996b**), ainsi qu'une production de facteurs de virulence tels que les adhésines et toxines par *E. coli*, en présence de noradrénaline (**Lyte *et al.*, 1996a, 1997**).

C'est dans ce contexte que l'article publié par **Mark Lyte**, en **2004**, fut le premier à introduire un concept encore nouveau à l'époque, celui de l'Endocrinologie Microbienne. Constituant une intersection entre les domaines de la Microbiologie, de la Neurobiologie et de l'Endocrinologie, celui-ci postule que les microorganismes sont capables de réagir à l'environnement neuroendocrinien de leur hôte, voire de participer à la physiologie de celui-ci en produisant des molécules semblables aux hormones. Cette interaction bidirectionnelle permet aux microorganismes de reconnaître qu'ils se trouvent à proximité d'un hôte approprié et d'initier l'expression de gènes impliqués dans la colonisation pour les commensaux et dans la virulence pour les pathogènes (**Freestone,**

2013). Les études à ce sujet se sont d'abord concentrées sur l'environnement intestinal qui possède le plus grand microbiote du corps humain et un système nerveux entérique très développé sécrétant de nombreux neuropeptides. La peau, également considérée comme un des organes neuroendocriniens majeurs du corps humain, est arrivée dans un second temps et fait aujourd'hui l'objet d'un intérêt grandissant. Comme décrit dans ce Chapitre 2, de nombreuses hormones, neurohormones et peptides de défense peuvent diffuser dans la sueur et les couches supérieures de l'épiderme, exposant ainsi en permanence le microbiote cutané à des facteurs eucaryotes (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). La majorité de ces neuropeptides est libérée par les terminaisons nerveuses afférentes de la peau et présente d'importantes variations locales de concentration en réponse au stress, à l'inflammation ou même à la douleur (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). Ainsi, les points suivants vont s'intéresser aux données de la littérature décrivant les interactions et impacts de ces molécules sur la physiologie et la virulence bactérienne.

1- Les catécholamines

1. Généralités

Chez l'humain, les catécholamines sont impliquées dans la réponse de « combat ou de fuite », une réaction physiologique se produisant en cas d'exposition à des éléments physiques ou psychologiques ayant le potentiel de mettre en danger l'équilibre du milieu interne de l'organisme (**Wadhwa *et al.*, 2001**). En cas de stress, et après intégration de signaux sensoriels, le cerveau génère un flux efférent vers la périphérie par l'intermédiaire de deux systèmes hormonaux : 1) l'axe HHS qui entraîne la libération d'ACTH par l'hypophyse et l'augmentation des glucocorticoïdes circulants et 2) l'axe sympathique-surrénalien-médullaire qui va impacter l'activité de la médullosurrénale et augmenter la sécrétion de catécholamines (**Padgett and Glaser, 2003 ; William Tank and Lee Wong, 2014**). De manière générale, l'activation de l'axe HHS permet de médier des réponses à long terme tandis que l'action du système nerveux sympathique est adaptée aux réponses immédiates et à court terme. Dans la réponse de « combat ou de fuite », la sécrétion de catécholamines va augmenter la pression artérielle, la fréquence et la contractilité cardiaque et entraîner la dérivation du sang vers les muscles squelettiques, le cerveau et le cœur. En parallèle, la relaxation des muscles bronchiques permet d'améliorer l'apport d'oxygène. Enfin, l'augmentation de la glycogénolyse et de la

néoglucogenèse dans le foie, ainsi que de la lipolyse dans les adipocytes, permet de fournir suffisamment de substrats énergétiques pour l'activité musculaire. Toutes ces modifications physiologiques sont mises en place afin de garantir la survie de l'organisme, ce qui explique pourquoi d'autres fonctions comme la digestion et la miction sont reléguées au second plan (**William Tank and Lee Wong, 2014**). Il a également été démontré que les catécholamines entraînent une altération de l'inflammation et des fonctions immunitaires, incluant la prolifération et le fonctionnement des cellules de l'immunité, le trafic des lymphocytes et la production de cytokines (**Marino and Cosentino, 2013 ; Alexopoulos and Chrousos, 2016**).

2. Structure et biosynthèse

Les catécholamines sont très conservées chez les animaux, qu'ils soient vertébrés ou invertébrés (**Sarkodie *et al.*, 2019**). On en retrouve trois types dans le corps humain : la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline, les deux dernières étant également connues sous le nom de norépinephrine (NE) et épinéphrine (Epi) respectivement. Ces molécules peuvent agir aussi bien comme des hormones que comme des neurotransmetteurs (**Freestone, 2013**).

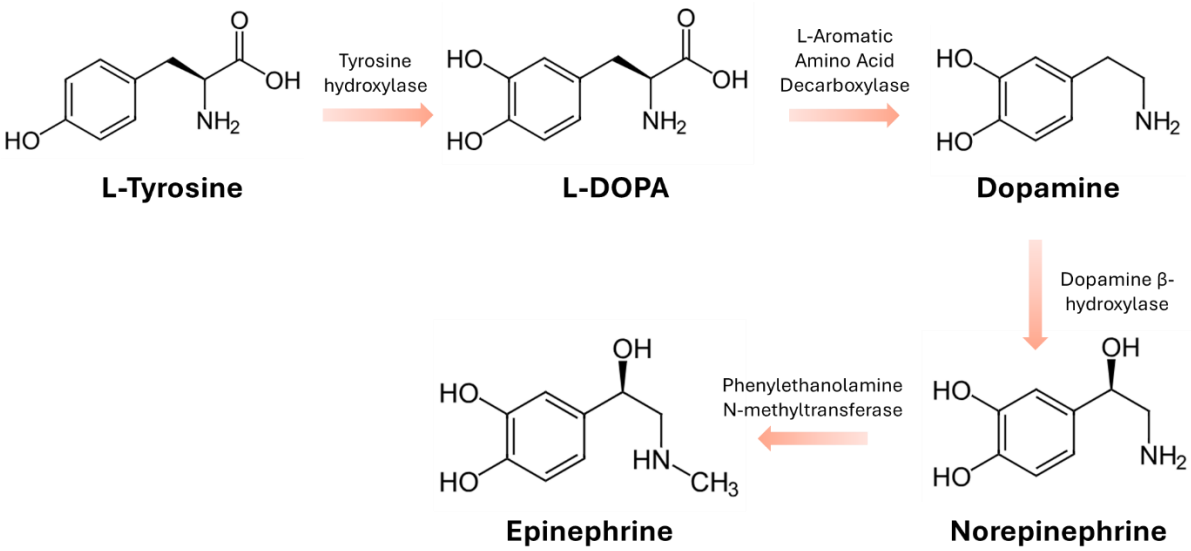


Figure 13** : **Voie de biosynthèse des catécholamines.

Elles ont une structure similaire composée d'un noyau catéchol, qui contient un anneau benzénique et deux groupements hydroxyles, ainsi qu'une chaîne latérale contribuant à la spécificité des récepteurs. Celle-ci présente un groupement NH_2 pour la NE et CH_3 pour l'Epi (**Figure 13**) (**Sarkodie *et al.*, 2019**). La dopamine est produite par les neurones

dopaminergiques, présents notamment dans le cerveau, et constitue un neurotransmetteur essentiel dans le circuit de la récompense (**Boukerb *et al.*, 2021**). L'Epi et la NE sont synthétisées par les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale mais la NE est également libérée par les neurones post-ganglionnaires du SN sympathique (**Sarkodie *et al.*, 2019 ; Boukerb *et al.*, 2021 ; Luqman, 2023**). Les terminaisons noradrénergiques et dopaminergiques sont largement présentes dans le tractus gastro-intestinal et font partie intégrante du SN entérique (SNE), faisant de l'intestin un environnement riche en catécholamines. Jusqu'à la moitié de la NE des mammifères est produite et utilisée dans le SNE (**Freestone, 2013**). La voie de biosynthèse des catécholamines (**Figure 13**) débute par l'hydroxylation de la tyrosine, un acide aminé apporté par l'alimentation et présent dans la circulation sanguine. Sous l'action de la tyrosine hydroxylase se forme de la dihydroxyphénylalanine (DOPA), une molécule intermédiaire qui sera ensuite décarboxylée pour donner la dopamine (< 1%). Par la suite, cette dopamine peut être hydroxylée pour donner la NE (20%), qui est à son tour méthylée en Epi (80%).

3. Récepteurs eucaryotes

L'Epi et la NE agissent via les récepteurs α1- (α1A, α1B, α1C), α2- (α2A, α2B, α2C) et β- (β1, β2, β3) adrénergiques. Les neufs sous-types possèdent tous une chaîne polypeptidique de 400 à 500 acides aminés avec sept régions transmembranaires, une extrémité C-terminale intracellulaire et une extrémité N-terminale extracellulaire (**Strosberg, 1993**). Ce type de structure intègre donc les récepteurs adrénergiques à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). L'activation d'un RCPG, par la fixation de son ligand, entraîne un changement de conformation lui permettant d'activer des protéines G intracellulaires. Ces dernières sont situées sur la face interne de la membrane plasmique et sont généralement formées de trois sous-unités (α, β, γ). La sous-unité α, couplée au guanosine triphosphate (GTP), va pouvoir agir sur une variété d'effecteurs intracellulaires, membranaires ou cytosoliques. Ainsi, le récepteur α1 est couplé à la protéine Gq et fait intervenir la phospholipase C. Celle-ci va cliver le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) et activer la voie inositol triphosphate (IP_3)/diacylglycérol (DAG), ce qui entraîne l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique et l'activation de la protéine kinase C (**Figure 14**). Les récepteurs α2 et β

sont, quant à eux, couplés aux protéines Gi et Gs respectivement et vont dépendre de l'action de l'adénylate cyclase. Dans les deux cas, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) constitue le messager secondaire et sera stimulé (Gs) ou inhibé (Gi) en fonction du récepteur adrénergique. Cette voie mène à l'activation, ou non, des protéines kinases A (PKA) (**Figure 14**) (**Andreis and Singer, 2016**). L'activation de toutes ces voies entraîne, ou non, des phosphorylations responsables de nombreuses réponses cellulaires altérant l'expression des gènes.

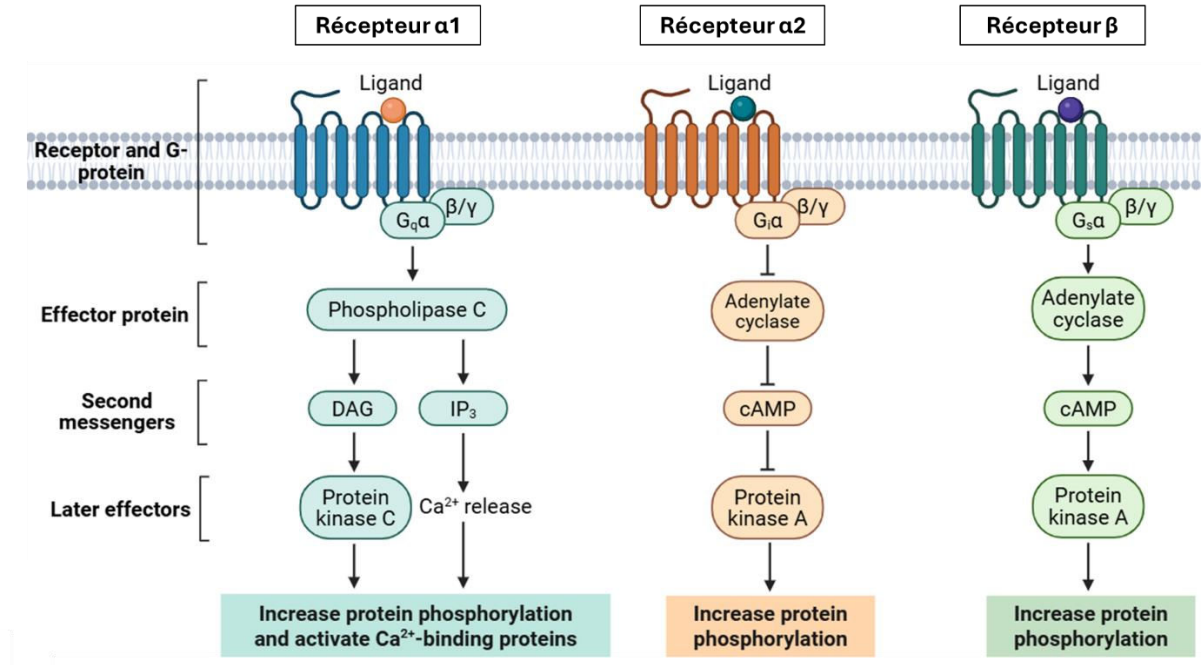


Figure 14 : Représentation schématique du fonctionnement des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPGs). *Le récepteur α1, couplé à la protéine Gq, active la voie de la phospholipase C, ce qui augmente la concentration de Ca^{2+} et active la protéine kinase C. Les récepteurs α2 et β, couplés respectivement aux protéines Gi et Gs, vont dépendre de l'action de l'adénylate cyclase qui va inhiber ou activer l'AMPc (https://BioRender.com).* ***DAG*** *: diacylglycérol ;* ***IP_3*** *: inositol triphosphate ;* ***cAMP*** *: adénosine monophosphate cyclique.*

4. Action sur les bactéries

Grâce aux nombreux travaux de Mark Lyte et Primrose Freestone, l'interaction entre les bactéries et les catécholamines est une des plus étudiées dans le domaine de l'Endocrinologie Microbienne (**Freestone, 2013**). Comme mentionné au début de cette partie, les travaux de Lyte et son équipe dans les années 1990 ont démontré l'impact de ces catécholamines sur la croissance des bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Lyte and Ernst,**

1992). Ces résultats ont ensuite été confirmés par **Freestone *et al.* (1999)** qui ont mis en évidence que la reconnaissance des catécholamines est aussi répandue chez des bactéries à Gram positif comme *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus epidermidis*. Depuis, les études se sont multipliées et ont démontré l'influence des catécholamines, et notamment de l'Epi et de la NE, non seulement sur la croissance mais également sur la virulence bactérienne (**Freestone, 2013**).

La plupart des études sur l'interaction bactéries/hormones de stress ont été réalisée *in vitro* en utilisant des milieux à base de sérum ou de sang, connus pour être pauvres en nutriments et permettant de refléter plus fidèlement les conditions rencontrées chez l'hôte. Ces milieux ont des effets bactériostatiques, notamment grâce à la séquestration du fer libre par des protéines de liaison au fer ferrique telles que la transferrine (Tf) et la lactoferrine (Lf). Le fer étant un élément nutritionnel nécessaire à la croissance de presque toutes les bactéries, sa séquestration représente un mécanisme de défense non spécifique de l'hôte en cas d'infection (**Freestone, 2013**). Les noyaux catéchol de la dopamine, de l'Epi et de la NE ont la capacité de se lier au fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans la Tf et la Lf, provoquant ainsi sa réduction en fer ferreux (Fe^{2+}), une forme pour laquelle ces protéines possèdent moins d'affinité. Le fer ainsi libéré est mis à disposition des microorganismes et va pouvoir stimuler la croissance bactérienne (**Freestone *et al.*, 2000, 2002, 2003, 2007 ; Neal *et al.*, 2001 ; Anderson and Armstrong, 2008 ; Sandrini *et al.*, 2010**).

De manière générale, les études montrent que les catécholamines influencent la virulence des pathogènes intestinaux tels que *E. coli* et *Salmonella* spp. (**Lyte *et al.*, 2011**). Des augmentations de la production de Shigatoxine (**Lyte *et al.*, 1996a**), de la motilité (**Bansal *et al.*, 2007**), de la capacité d'adhésion aux cellules intestinales (**Lyte *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 2003 ; Green *et al.*, 2004**), du chimiotactisme (**Lopes and Sourjik, 2018**) et de la formation de biofilm (**Yang *et al.*, 2014**) ont été reportées chez divers espèces d'*E. coli* dont le sérotype entérohémorragique O157:H7. Ces mêmes effets se retrouvent chez *S. enteritidis* avec une augmentation de la formation de biofilm (**Hiller *et al.*, 2019**) ou encore une stimulation de la motilité et du système de sécrétion de type III chez *S. enterica* serovar Typhimurium (**Bearson and Bearson, 2008 ; Moreira *et al.*, 2010**

; Peterson *et al.*, 2011). D'autres pathogènes tels que *Helicobacter pylori* (**Doherty *et al.*, 2009**), *Y. enterocolitica* (**Freestone *et al.*, 2007**), *P. aeruginosa* **(Biaggini *et al.*, 2015; Cambronel *et al.*, 2019**) ou encore les *Campylobacter* spp. (**Cogan *et al.*, 2007 ; Aroori *et al.*, 2014 ; Truccollo *et al.*, 2020**), *Vibrio* spp. (**Nakano *et al.*, 2007 ; Pande *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2021 ; Weigert Muñoz *et al.*, 2022**) et *Listeria* spp. (**Coulanges *et al.*, 1998**) semblent également répondre à la présence des hormones de stress. Les études citées ici ne constituent que quelques exemples parmi une multitude de travaux réalisés sur ce sujet, démontrant ainsi l'ampleur de l'intérêt que suscitent les catécholamines. **Freestone (2013)** souligne le large spectre de bactéries habitant le tractus gastro-intestinal et répondant à la présence de ces hormones en mettant particulièrement en avant les effets de la NE et de la dopamine par rapport à l'adrénaline qui n'est pas retrouvée dans le SNE et qui entraîne une réactivité moindre chez les microorganismes. Cela suggère que les bactéries ont développé des systèmes de réponse aux catécholamines spécifiques à l'hormone qu'elles rencontrent dans leur niche écologique (**Freestone, 2013**).

Il est important de noter que les effets cités ci-dessus vont varier en fonction des conditions expérimentales (milieu de culture, concentrations en hormones, temps d'exposition, etc.), des paramètres qui vont aussi influencer les études transcriptomiques sur le sujet (**Freestone, 2013**). Cependant, malgré ces différences, ces dernières semblent confirmer les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* en démontrant notamment un impact des hormones de stress sur le métabolisme et l'expression des gènes liés à la motilité, à la virulence ainsi qu'à l'acquisition et au transport du fer (**Dowd, 2007 ; Kendall *et al.*, 2007 ; Oneal *et al.*, 2008 ; Karavolos *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2015 ; Sharma *et al.*, 2022 ; Niu *et al.*, 2023**). Une revue complète et détaillée sur le sujet reprend l'ensemble des résultats obtenus et rend compte de l'impact important des catécholamines sur la modification de l'expression génétique d'une variété de microorganismes (**Boujnane *et al.*, 2024**). Deux études de protéomique réalisées chez *V. cholerae* et *E. faecium* viennent compléter ces conclusions et démontre également un impact des catécholamines sur l'homéostasie du fer, le métabolisme, la réponse au stress, les protéines impliquées dans l'interaction avec l'hôte, ainsi que sur le contrôle de la transcription et de la traduction (**Toulouse *et al.*, 2019; Scardaci *et al.*, 2021**). Enfin,

une étude métabolomique récente montre des différences significatives dans la formation de biofilm, la tolérance au stress et la résistance aux antibiotiques chez *Mycobacterium tuberculosis* (**Lei *et al.*, 2023**).

La peau est également un acteur important de la réponse au stress et participe activement à l'axe HHS. Des hormones clés telles que la CRH et la POMC, le précurseur de l'ACTH, sont produites par la peau et les annexes cutanées (**Alexopoulos and Chrousos, 2016**). De même, environ 25 à 50% des terminaisons du SN sympathique ciblent les effecteurs cutanés, avec un rôle important des fibres noradrénergiques dans la vasoconstriction et la piloérection (**Donadio *et al.*, 2006**). Les kératinocytes et les mélanocytes sont capables de biosynthétiser et de métaboliser l'Epi et la NE, de même que d'exprimer leurs récepteurs, donnant ainsi lieu à un système catécholaminergique périphérique qui joue un rôle important dans l'homéostasie de la peau (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Alexopoulos and Chrousos, 2016**). Ainsi, chez les kératinocytes, l'Epi active le récepteur β2-adrénergique et induit une forte augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, celui-ci étant impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation de l'épiderme (**Alexopoulos and Chrousos, 2016**). Comme mentionné dans le Chapitre 1, parmi les genres majoritaires de la peau se trouvent les staphylocoques à coagulase négative. Plusieurs études ont montré une augmentation de la croissance ainsi que de la formation de biofilm chez les CoNS (**Neal *et al.*, 2001 ; Lyte *et al.*, 2003 ; Frank and Patel, 2008 ; Freestone *et al.*, 2008**). Une étude menée par **Mart'yanov *et al.* (2021)** a également mis en évidence l'impact de la NE sur des biofilms mono-espèce et mixtes de *S. epidermidis* et *S. aureus*. Les auteurs ont montré que *S. epidermidis* a l'avantage sur *S. aureus* dans les biofilms mixtes, et que la NE favorise ce phénomène en accélérant la compétition entre ces deux espèces à une concentration similaire à celle retrouvée dans le plasma sanguin. Les effets de l'hormone dépendent cependant des conditions de culture, étant plus marqués en anaérobie pour les biofilms mono-espèce et en aérobie pour les biofilms mixtes (**Mart'yanov *et al.*, 2021**). *C. acnes* fait également partie de la flore résidente de la peau. Son implication dans l'acné a déjà été discutée dans le Chapitre 1 et peut être complétée par une influence directe du stress émotionnel sur le développement de ce trouble cutané (**Jović *et al.*, 2017**). L'étude de **Borrel *et al.* (2019)** réalisée sur deux souches cutanées de *C. acnes*, une acnéique et une

non-acnéique, a mis en évidence des impacts de l'Epi et de la NE sur ces bactéries. Malgré une absence d'effet sur la croissance, les auteurs ont observé une influence des deux hormones sur la formation de biofilm de la souche acnéique tandis que la souche non acnéique semble être sensible à l'Epi uniquement. En revanche, les hormones n'affectent pas les caractères cytotoxiques ou inflammatoires des souches mais augmentent leur impact sur la stimulation de la production de lipides par la lignée de sébocytes SZ95. Cet effet permet à nouveau de faire le lien avec l'acné puisque l'hyperséborrhée joue un rôle central dans l'occlusion des pores et conduit à la mise en place d'un environnement anaérobie favorable au développement de *C. acnes* (**Borrel *et al.*, 2019**). Enfin, un impact de l'Epi, sur le biofilm de la souche cutanée *M. luteus* C01, a récemment été mis en évidence par **Gannesen *et al.* (2022)**. Par la technique de spectrométrie de masse Orbitrap et analyse protéomique, les auteurs ont ensuite montré que l'Epi affecte les ribosomes, la division cellulaire et le catabolisme de la bactérie (**Gannesen *et al.*, 2023**).

5. Mécanismes de réponse

L'augmentation du nombre de publications au sujet de l'impact des catécholamines sur la flore microbienne a conduit à des recherches visant à identifier le ou les mécanisme(s) de réponse sous-jacent(s). Les hypothèses se sont d'abord concentrées sur l'effet sidérophore, évoqué précédemment, qui explique en partie les résultats obtenus sur la croissance bactérienne. Une publication de **Toulouse *et al.* (2019)** a également démontré que *V. cholerae* est capable de métaboliser l'adrénaline en adrénochrome, stimulant ainsi sa croissance et déclenchant des réponses aussi bien chez la bactérie que dans les cellules immunitaires. Enfin, de même que les catécholamines se fixent sur des récepteurs spécifiques afin d'exercer leurs effets, l'existence d'un senseur bactérien semblait être une piste intéressante à explorer pour expliquer la variété d'effets physiologiques obtenus chez les microorganismes. C'est ainsi qu'en 2006, **Clarke *et al.*** ont identifié la protéine QseC comme étant le senseur adrénergique bactérien de l'Epi et de la NE chez *E. coli* O157:H7. QseC appartient à la famille des histidines kinases, des protéines capables de capter les signaux environnementaux et constituant une des formes majeures de transduction du signal chez les bactéries, archées et certains eucaryotes. Après autophosphorylation, ces histidines kinases vont pouvoir transférer

un groupement phosphate à une protéine régulatrice, généralement un facteur de transcription, et permettre une réponse adaptée de la cellule (**Clarke *et al.*, 2006 ; Boukerb *et al.*, 2021**). Ici, QseC forme un système à deux composants avec le régulateur QseB et est capable de lier l'autoinducteur 3 (AI-3) faisant partie du Quorum Sensing (QS) bactérien, ainsi que les hormones Epi/NE. En conséquence, QseB va réguler sa propre transcription et activer celle des gènes responsables de la formation du flagelle et de la motilité chez *E. coli*, permettant ainsi d'initier l'infection de l'épithélium intestinal. Des expériences *in vivo* ont d'ailleurs démontré qu'un mutant *qseC* possède une virulence atténuée chez le lapin (**Clarke *et al.*, 2006**). Il n'existe pas d'homologie de séquence primaire entre QseC et les récepteurs adrénergiques, indiquant donc que la protéine constitue un analogue fonctionnel des RCPGs (**Clarke *et al.*, 2006**) en permettant une communication intra-règne via l'AI-3 et inter-règnes en répondant à la présence des hormones de l'hôte (**Figure 15**) (**Freestone, 2013**). Chez l'humain, l'activité des récepteurs adrénergiques peut être bloquée par certaines molécules et il semblerait que ces dernières fonctionnent également chez les bactéries. Il a été démontré que l'ajout d'antagonistes des récepteurs eucaryotes α-adrénergiques, tels que la phentolamine, permet de bloquer l'action de l'Epi et de la NE chez les bactéries à Gram positif et négatif (**Clark *et al.*, 2006 ; Freestone, 2013**).

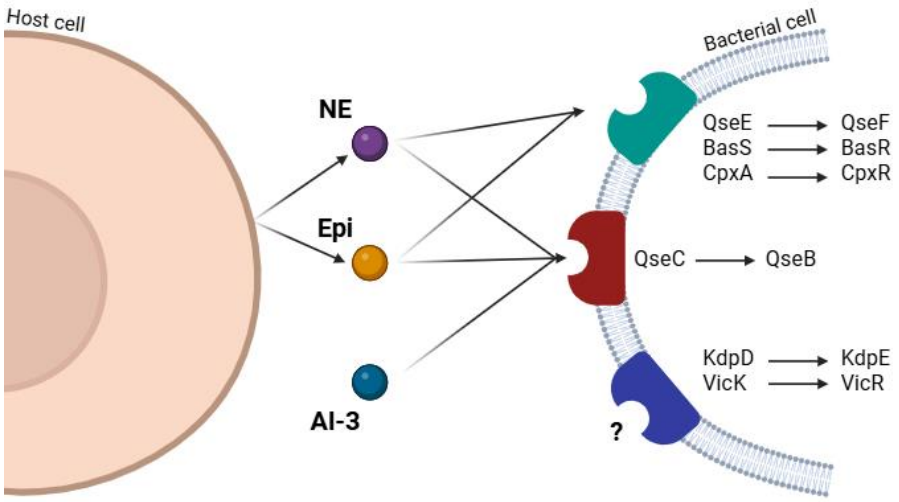


Figure 15* : *Représentation schématique des récepteurs bactériens de l'Epinéphrine (Epi) et de la Norépinephrine (NE). *La kinase QseC s'autophosphoryle lors de la détection de la NE, de l'Epi et de l'autoinducteur 3 (AI-3), transférant ensuite son groupement phosphate au régulateur de réponse QseB. Les autres systèmes à deux composants QseEF, BasSR et CpxAR sont également indiqués, de même que les*

récepteurs putatifs KdpD et VicK, présentant une homologie partielle avec QseC (https://BioRender.com ; adapté de ***Boukerb et al., 2021****).*

Des analyses *in silico* sur le domaine périplasmique (senseur) de QseC ont révélé un haut degré de conservation entre différentes espèces bactériennes dont les *Shigella* spp. et les *Salmonella* spp. (**Clarke *et al.*, 2006**). Les études sont cependant assez contradictoires quant au rôle de QseC dans la virulence de *Salmonella* (**Moreira *et al.*, 2010 ; Pullinger *et al.*, 2010 ; Moreira and Sperandio, 2012**). Cela pourrait s'expliquer par la découverte ultérieure de récepteurs adrénergiques alternatifs incluant les senseurs QseE, BasS et CpxA des systèmes à deux composants QseEF, BasSR et CpxAR respectivement (**Figure 15**) (**Reading *et al.*, 2009 ; Karavolos *et al.*, 2008, 2011 ; Spencer *et al.*, 2010**). Il est important de noter que ces senseurs sont retrouvés chez les bactéries à Gram négatif. Les études de **Borrel *et al.* (2019)** et **Cambronel *et al.* (2020)** rapportent l'existence de deux senseurs adrénergiques putatifs pour l'Epi et la NE chez *C. acnes* et *E. faecalis* : les protéines KdpD et VicK respectivement (**Figure 15**). Cependant, la piste des senseurs reste encore peu explorée dans le cas des bactéries à Gram positif.

2- Les peptides natriurétiques

1. Généralités

Les peptides natriurétiques (NPs) sont une famille d'hormones peptidiques initialement identifiées pour leurs activités cardiovasculaires et osmorégulatrices, et possèdent trois représentants majoritaires. En effet, c'est en 1981 que de Bold et ses collègues ont observé que des extraits de tissu auriculaire (oreillette cardiaque) favorisent la diurèse (excrétion d'urine) et la natriurèse (excrétion de sodium dans cette urine) chez le rat. Démontrant une surprenante activité endocrine par un facteur d'origine cardiaque, c'est ainsi que se fit la découverte de l'Atrial Natriuretic Peptide (ANP) dont la structure fut confirmée par **Flynn *et al.*** en **1983**. Un second facteur, le Brain Natriuretic Peptide (BNP) fut isolé à partir d'un cerveau de porc en 1988, avant que la même équipe ne décrivent deux ans plus tard un troisième peptide issu de la même source et possédant une structure similaire : le C-type Natriuretic Peptide (CNP) (**Sudoh *et al.*, 1988, 1990**). D'autres peptides structurellement apparentés existent et ont été décrits dans la littérature tels que l'urodilatine, la guanyline, l'uroguanyline ou encore le *Dendroaspis* Natriuretic Peptide (DNP) provenant du serpent (**Baxter, 2004**).

Les NPs sont retrouvés aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés et des analogues ont également été identifiés chez les plantes (**Veron *et al.*, 2007**). Chez l'Homme, L'ANP et le BNP sont majoritairement sécrétés par les cardiomyocytes des oreillettes et ventricules cardiaques respectivement, et vont avoir un rôle dans la modulation de la pression artérielle et du volume sanguin. Celle-ci passe par une action endocrine sur l'augmentation de la filtration rénale et autocrine/paracrine dans le cœur où les NPs vont également inhiber l'hypertrophie et participer au remodelage cardiaque. En comparaison, le CNP est libéré par le SN et les cellules endothéliales et serait capable de stimuler la croissance des os longs (**Baxter, 2004 ; Potter *et al.*, 2009 ; Lesouhaitier *et al.*, 2019**). Il ne circule pas ou très peu dans le sang et agirait donc surtout localement de manière autocrine/paracrine (**Baxter, 2004 ; Kuhn, 2004**). Les NPs peuvent aussi être retrouvés dans le tissu nerveux où ils auront un rôle plutôt neuromodulateur (**Veron *et al.*, 2007**). Dans la peau humaine, une étude immunohistochimique a montré une immunoréactivité à l'ANP au niveau des fibres cholinergiques sympathiques qui innervent les glandes sudoripares eccrines (**Tainio *et al.*, 1987**). En parallèle, il semblerait que les neurones afférents primaires impliqués dans la démangeaison expriment différents marqueurs moléculaires dont le BNP (**Schmelz, 2019**) et les NPs sont aussi produits localement par les cellules endothéliales et peuvent atteindre les sites cutanés via la circulation sanguine (**Potter *et al.*, 2009**).

2. Structure et biosynthèse

Comme c'est souvent le cas pour beaucoup d'hormones, les NPs sont synthétisés sous forme de pré-pro-hormones et vont subir deux clivages successifs afin de libérer la forme active du peptide dont la taille varie entre 22 et 38 acides aminés. Contrairement à l'ANP, qui est stocké sous forme de propeptide à l'intérieur de granules dans les myocytes auriculaires, le BNP est synthétisé en fonction des besoins (**Baxter, 2004 ; Potter *et al.*, 2009**). Les deux peptides sont retrouvés en faibles quantités dans le plasma mais leur concentration augmente rapidement en cas d'insuffisance cardiaque congestive. La sécrétion de CNP peut également être impactée par cette pathologie mais de façon moindre et est, en revanche, augmentée par les facteurs de croissance ou encore les lésions vasculaires (**Potter *et al.*, 2009**).

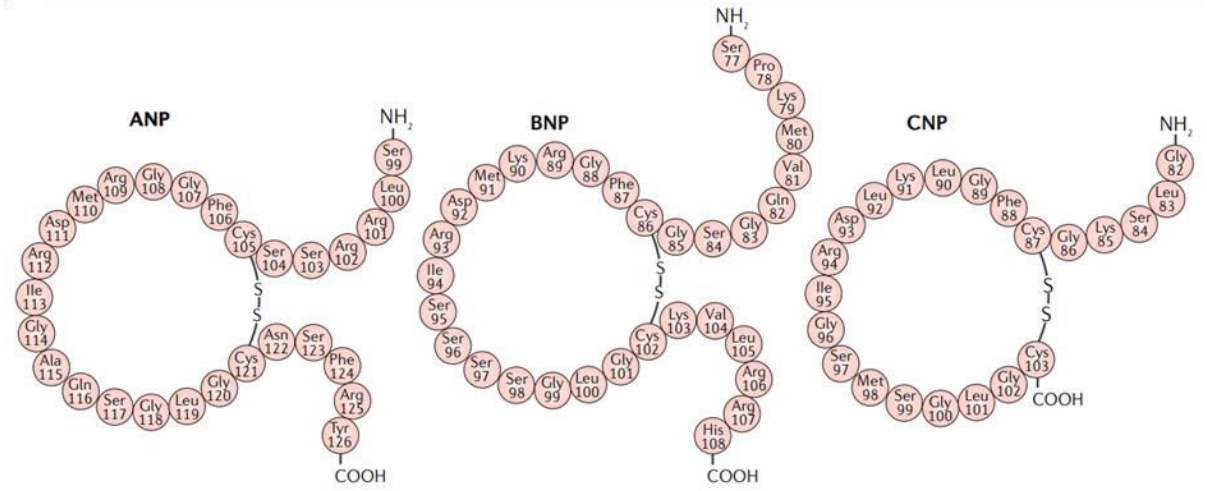


***Figure 16** : **Structure des peptides natriurétiques** (ANP, BNP et CNP) (**Goetze et al., 2020**).*

Les NPs possèdent un pont disulfure qui leur confère une structure partiellement circulaire de 17 acides aminés dites « omega-like » (**Figure 16**) (**Lesouhaitier *et al.*, 2019**). Celle-ci comportant de nombreux acides aminés chargés positivement, les NPs possèdent donc une caractéristique commune avec les AMPs cycliques cationiques (**Bulet *et al.*, 2004 ; Veron *et al.*, 2007**).

3. Récepteurs eucaryotes

Au niveau des cellules eucaryotes, les NPs exercent leurs effets par l'intermédiaire de trois récepteurs transmembranaires guanylate cyclase (GC) nommés NPR-A (pour Natriuretic Peptide Receptor type A), NPR-B et NPR-C (**Figure 17**). Le récepteur NPR-A (ou GC-A) lie à la fois l'ANP et le BNP, tandis que NPR-B (ou GC-B) lie sélectivement le CNP. Ces deux sous-types catalysent la conversion du guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et sont à l'origine de la plupart des effets connus des NPs. L'augmentation du GMPc intracellulaire module en effet l'activité de protéines régulatrices spécifiques en aval, telles que des phosphodiestérases, les canaux ioniques et les protéines kinases de type I (PKG I) et de type II (PKG II) (**Figure 17**). Le troisième sous-type, NPR-C (ou GC-C), est le plus abondant dans de nombreux tissues et lie tous les NPs avec une affinité à peu près égale. Il participe à l'élimination des peptides de la circulation en assurant leur internalisation et dégradation. Une fonction dans la médiation de certaines actions cellulaires des NPs a également été suggérée pour ce récepteur mais elle passe par d'autres intermédiaires que le GMPc. Il

s'agirait ici d'un couplage avec des protéines G_i et de la modulation négative de l'activité adénylate cyclase et donc de l'AMPc (**Figure 17**) (**Baxter, 2004 ; Kuhn, 2004 ; Potter *et al.*, 2009**).

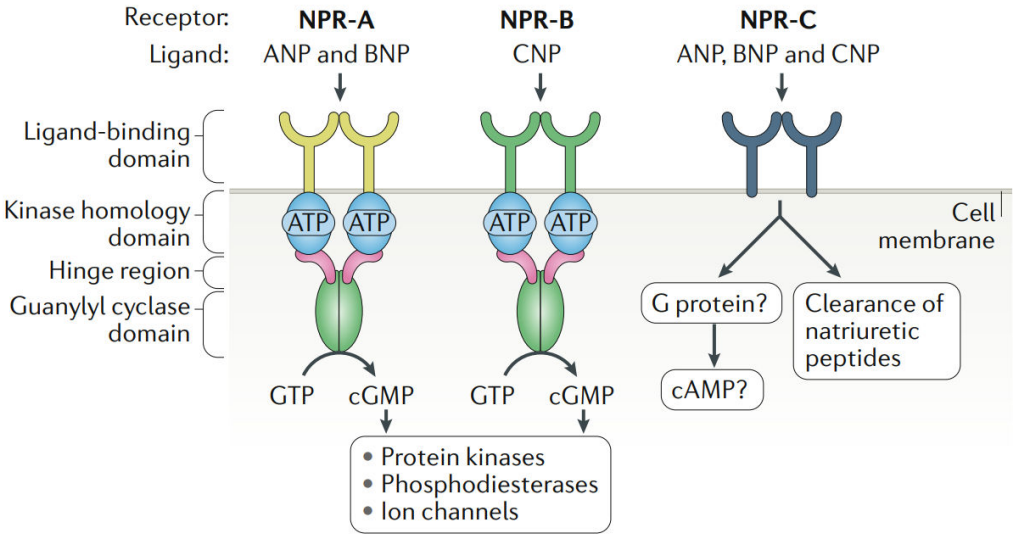


Figure 17* : *Récepteurs des peptides natriurétiques *(NPR-A, NPR-B et NPR-C) (**Goetze et al., 2020**). **ATP** : adénosine triphosphate ; **GTP** : guanosine triphosphate ; **cGMP** : guanosine monophosphate cyclique ; **cAMP** : adénosine monophosphate cyclique.*

4. Action sur les bactéries et mécanisme de réponse

Les travaux de **Krause *et al.* (2001)** ont constitué le point de départ de l'évaluation du potentiel antimicrobien des NPs en décrivant, pour la première fois, une activité antibactérienne du BNP humain contre les bactéries à Gram positif et négatif. Les concentrations minimales inhibitrices mesurées étant d'environ 5 µM et 30-35 µM respectivement, cela reste cependant supérieur aux concentrations physiologiques dans le sang humain. En parallèle, une plus faible activité a été démontrée pour l'ANP tandis que le CNP s'est révélé être le moins efficace des trois (**Krause *et al.*, 2001**).

Par la suite, l'effet des NPs a fait l'objet de plusieurs études chez les bactéries du genre *Pseudomonas*. Ainsi, à une concentration de l'ordre du micromolaire, similaire à celle rencontrée dans les tissus animaux, le BNP et le CNP ne présentent pas d'effets sur la croissance et la cultivabilité de *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* (**Veron *et al.*, 2007, 2008**). Cependant, malgré cette absence d'activité antibactérienne, **Veron *et al.* (2007)** ont démontré qu'un pré-traitement de *P. aeruginosa* avec ces peptides induit une augmentation de la cytotoxicité de la bactérie sur cellules gliales, avec un effet plus

marqué pour le CNP que le BNP. Des résultats similaires ont été obtenus chez *P. fluorescens* où un pré-traitement identique provoque une diminution de l'effet apoptotique de la bactérie au profit d'une augmentation de la nécrose des cellules gliales (**Veron *et al.*, 2008**). Dans les deux cas, l'utilisation d'analogues stables du GMPc et de l'AMPc, les deux intermédiaires rentrant en jeu dans la transduction du signal des NPs chez les eucaryotes, a reproduit les mêmes résultats. De plus, l'exposition aux NPs a entraîné, chez ces bactéries, une augmentation du potentiel cytotoxique du LPS, des modifications de sa structure et, dans le cas de *P. fluorescens*, une diminution de la diversité de ses isoformes. Le LPS étant un élément essentiel de la pathogénicité des *Pseudomonas*, cela peut en partie expliquer les résultats obtenus (**Veron *et al.*, 2007 ; Veron *et al.*, 2008**).

Veron *et al.* (2007) ont proposé que l'effet du CNP chez *P. aeruginosa* est médié par une augmentation de la synthèse d'AMPc, qui active ensuite la protéine Vfr, un régulateur global de la virulence chez les *Pseudomonas*, modifiant ainsi la structure du LPS. Plus tard, les travaux de **Blier *et al.* (2011)** ont complété ces résultats en évaluant la virulence de *P. aeruginosa*, après pré-traitement avec les NPs, sur le modèle *Caenorhabditis elegans*. Les auteurs ont ainsi montré que le CNP renforce la virulence bactérienne en augmentant la sécrétion d'HCN et d'exotoxine A par stimulation de Vfr, et par extension de la protéine régulatrice PtxR, et par activation du QS. Il est intéressant de noter que l'effet du CNP sur chaque facteur de virulence individuel est plutôt limité, mais que l'activité globale du peptide est probablement due à des effets additifs ou même synergiques entre les différentes toxines (**Blier *et al.*, 2011**). Dans le cas de *P. fluorescens*, le BNP augmente la quantité d'AMPc intracellulaire, tandis que le CNP agit plutôt sur le taux de GMPc (**Veron *et al.*, 2008**), montrant un mécanisme d'action différent par rapport à *P. aeruginosa* mais passant toujours par l'intermédiaire de nucléotides cycliques.

En complément, il a été démontré que le BNP et le CNP diminuent fortement la formation du biofilm de *P. aeruginosa* et que l'effet du CNP est spécifique et consécutif à la liaison du peptide sur la protéine AmiC, un orthologue du récepteur NPR-C eucaryote (**Rosay *et al.*, 2015**). Chez *P. aeruginosa*, AmiC est considérée comme un senseur. En l'absence de stimulation, AmiC se lie au facteur d'anti-terminaison AmiR qui régule à la baisse la

transcription de l'opéron *amiEBCRS*. Lors de la fixation de son ligand, l'acétamide, AmiC libère AmiR, ce qui déclenche la transcription de l'ensemble de l'opéron *ami*. Les travaux de **Rosay *et al.* (2015)** ont démontré que le CNP augmente la transcription des gènes *amiC*, *amiE* et *amiR* et que des molécules agonistes (ostéocrine, cANF) et antagoniste (isatine) du récepteur NPR-C peuvent également se lier à AmiC. La majorité des protéines AmiC se trouvent dans le cytosol mais il a été démontré qu'elles possèdent une signature périplasmique dans leur structure. Ainsi, pendant l'exposition au CNP, une portion des protéines AmiC pourrait se retrouver à proximité ou à l'intérieur de la membrane interne. En outre, il a été démontré que la présence d'une protéine appelée PA4858, qui présente une séquence d'acides aminés proche d'AmiC, est essentielle pour observer l'effet inhibiteur du CNP sur le biofilm. Dans ce contexte, AmiC pourrait interagir avec le CNP par l'intermédiaire de cette protéine de liaison périplasmique putative. Il est supposé que la protéine PA4858 pourrait faciliter la liaison entre AmiC et le CNP, probablement par le biais d'un complexe multiprotéique (**Figure 18**) (**Rosay *et al.*, 2015 ; Lesouhaitier *et al.*, 2019**).

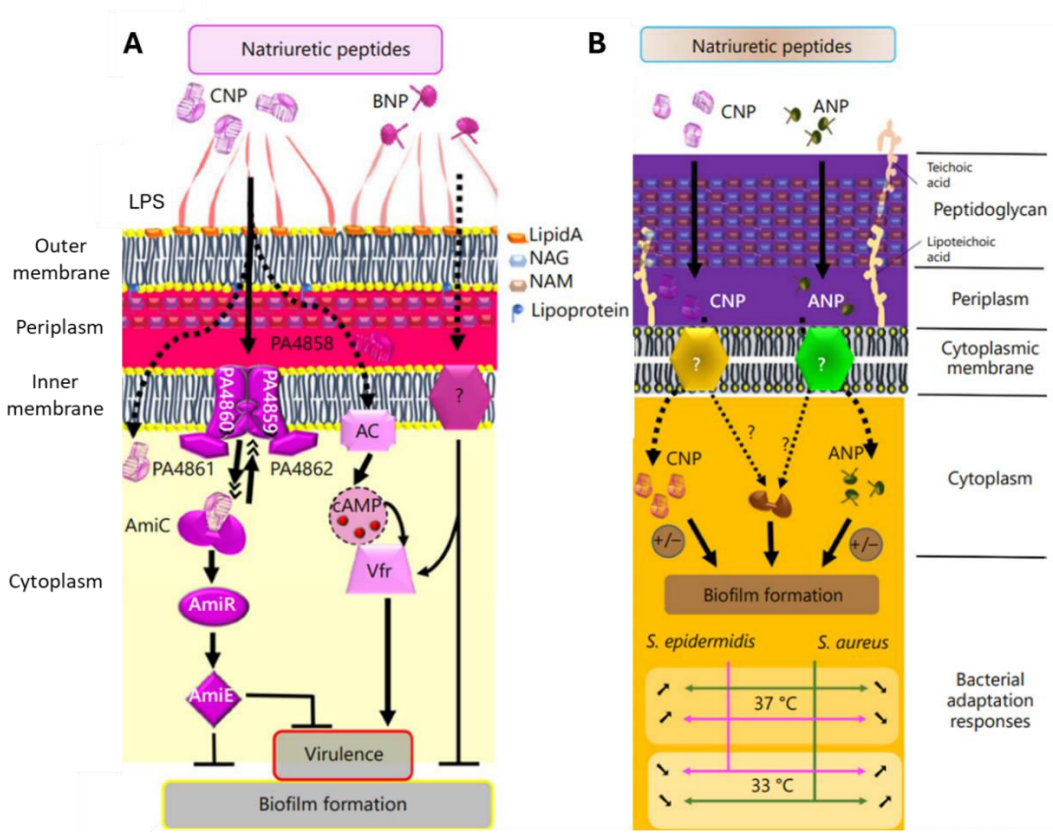


***Figure 18* : *Modèle des voies de régulations impliquées dans les effets des NPs** sur (**A**) P. aeruginosa et (**B**) les staphylocoques. **LPS** : lipopolysaccharides ; **AC** : adénylate*

cyclase ; ***NAG*** *: N-acétylglucosamine ;* ***NAM*** *: acide N-acétylmuramique (****adapté de Lesouhaitier et al., 2019****).*

Une autre étude a réaffirmé l'impact du CNP sur la formation de biofilm, de manière dose-dépendante (10 nM – 0.1 µM), chez *P. aeruginosa* mais a montré qu'à une concentration de 1 µM, cet effet n'est que partiellement médié par AmiC. Il a ainsi été observé qu'à 1 µM, le CNP réduit à la fois l'adhésion de *P. aeruginosa* sur le verre et la production de di-rhamnolipides, tout en augmentant la fluidité de la membrane bactérienne, ce qui pourrait expliquer les effets obtenus en biofilm (**Desriac *et al.*, 2018**).

Bien que peu de données existent sur l'impact de l'ANP sur les bactéries, une étude de **Louis *et al.* (2022)** a mis en avant que ce peptide inhibe la formation de biofilm et entraîne une forte dispersion des biofilms préétablis chez *P. aeruginosa*, et ce même à de très faibles concentrations (nM). Cette activité de dispersion semble être spécifique à l'ANP et relayée par AmiC et la protéine régulatrice AmiR qui lui est associée. De plus, l'ANP agit comme un adjuvant potentialisant l'effet des antibiotiques (imipénème, polymyxine B, tobramycine) couramment utilisés pour traiter les infections à *P. aeruginosa*. Les effets observés sur la dispersion n'ont aucun lien avec une quelconque activité bactéricide ou une augmentation de la virulence mais s'expliquent par une désorganisation de la matrice exopolysaccharidique du biofilm sous l'action de l'ANP (**Louis *et al.*, 2022**).

Les NPs étant transportés dans la circulation sanguine et pouvant également être produits localement par les parois des capillaires sanguins, ils sont donc également retrouvés au niveau cutané. Le bulge du follicule pileux est une zone particulièrement riche en vaisseaux sanguins et comporte une importante communauté microbienne dans laquelle on retrouve notamment les genres *Staphylococcus* et *Cutibacterium* (**Gannesen *et al.*, 2018a ; Ovcharova *et al.*, 2021**). L'exposition de *S. aureus* et *S. epidermidis* à l'ANP et au CNP à des concentrations de l'ordre du nanomolaire ou du micromolaire a montré un impact sur la croissance bactérienne, bien que celui-ci soit dépendant des souches et des conditions de culture (**Gannesen *et al.*, 2018a, 2018b ; Ovcharova *et al.*, 2021**). A 37°C, les auteurs ont observé une stimulation et une inhibition de la formation de biofilm de *S. epidermidis* et *S. aureus* respectivement. C'est cependant l'effet inverse qui est observée à 33°C, démontrant que l'impact des NPs

dépend des conditions environnementales (**Figure 18**) (**Gannesen *et al.*, 2018b**). En biofilm mixte, il semblerait qu'à 37°C, les NPs augmentent la compétitivité de *S. epidermidis* envers *S. aureus*, cette dernière ayant tendance à avoir l'avantage en temps normal. Les effets opposés exercés par les peptides sur des microorganismes étroitement liés et ayant des propriétés fonctionnelles et des rôles distincts dans la peau témoignent d'une fonction potentiellement importante des NPs en tant que régulateurs de la composition du microbiote cutané (**Gannesen *et al.*, 2018b**). Dans le cas de *C. acnes*, il semble que l'ANP et le CNP sont capables de moduler la dynamique de croissance de la bactérie, bien que ces effets restent modérés. Les deux peptides montrent à nouveau un effet important sur la formation du biofilm de *S. aureus* et de *C. acnes* avec des différences notables entre les souches pour cette dernière. Ces effets dépendent de manière significative des conditions aéro-anaérobies et de la température (33°C ou 37°C) et sont donc liés au microenvironnement des bactéries sur la peau (**Gannesen *et al.*, 2018a**). Dans une autre étude, **Ovcharova *et al.* (2021)** ont démontré que, dans les biofilms, l'ANP stimule l'agrégation de *C. acnes* et la dispersion des agrégats de S. *epidermidis*, tandis que chez cette dernière, l'ANP stimule également l'activité métabolique des cellules. Comme précédemment, les NPs augmentent les avantages compétitifs de *C. acnes* par rapport à *S. aureus* et *S. epidermidis* dans un biofilm mixte (**Gannesen *et al.*, 2018a ; Ovcharova *et al.*, 2021**). En raison du lien avec la température chez *C. acnes* et *S. aureus*, il est envisageable que les NPs agissent comme un « thermostat », permettant à la peau de moduler le développement bactérien dans des conditions normales et inflammatoires, ce qui aurait de son importance dans la pathologie de plusieurs maladies cutanées. Les effets observés sont étayés par la présence d'une amidase chez *C. acnes* présentant une homologie de séquence avec la protéine senseur AmiC de *P. aeruginosa* (**Gannesen *et al.*, 2018a**). Deux autres études ont démontré un impact de l'ANP sur *S. aureus* et *Kytococcus schroeteri*, un autre membre de la flore cutané (**Diuvenji *et al.*, 2022, 2023**). En particulier, *K. schroeteri* joue un rôle ambivalent en présentant un effet positif sur l'adhésion de *S. aureus* mais en modulant l'effet de l'ANP d'un effet stimulant à un effet inhibiteur en biofilm mixte (**Diuvenji *et al.*, 2022**). Toutes ces données démontrent l'importance des facteurs de l'hôte dans la dynamique des relations entre les différents membres du microbiote cutané.

3- La Substance P

1. Généralités

La SP a été découverte et isolée en 1931 par Von Euler et Gaddum à partir d'un extrait brut de cerveau et d'intestin de cheval. D'abord décrite pour ses propriétés hypotensives et sa capacité à entraîner la contraction des muscles lisses, les travaux de **Lembeck (1953)** ont conduit à l'hypothèse que la SP serait également associée aux nerfs sensoriels de la racine dorsale de la moelle épinière, permettant ainsi la transmission de la douleur. Cette idée a par la suite été confirmée par d'autres équipes (**Henry, 1976 ; Otsuka and Konishi, 1976**) et la libération de la SP par les terminaisons centrales et périphériques des neurones afférents a établi son rôle en tant que neurotransmetteur (**Otsuka and Yoshioka, 1993**). Dans le SNC, la SP participe aux réponses comportementales, au stress et à l'anxiété, ainsi qu'à la survie/dégénérescence des neurones et à la régulation des fonctions cardiovasculaire et respiratoire. Dans la moelle épinière, outre la nociception, la SP modulerait les réflexes autonomes tels que la miction. Présente dans tout l'organisme et également produite par les cellules immunitaires, la SP est biologiquement active à de faibles concentrations et participe à de nombreuses maladies des systèmes respiratoire (asthme par exemple), gastrointestinale (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), musculosquelettique (arthrite) et bien entendu cutané (**Black, 2002 ; Severini *et al.*, 2002 ; Steinhoff *et al.*, 2003 ; O'Connor *et al.*, 2004 ; Ebner and Singewald, 2006 ; Ebner *et al.*, 2009 ; Steinhoff *et al.*, 2014**).

2. Structure et biosynthèse

La SP appartient à la famille des tachykinines qui regroupe des peptides de 10 à 13 acides aminés possédant une région carboxy-terminale conservée (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH_2) essentielle à l'interaction avec les récepteurs ; et une extrémité amino-terminale variable qui assure la spécificité vis-à-vis de ces derniers (**Harrison and Geppetti, 2001 ; O'Connor *et al.*, 2004 ; Roosterman *et al.*, 2006**). Chez les mammifères, ces peptides proviennent de l'épissage alternatif des gènes codant pour la préprotachykinine A (PPT-A, renommé TAC1) et de la préprotachykinine B (PPT-B, renommé TAC3). Le gène TAC1 donne ainsi 4 ARNm (α-, β-, γ- et δ-TAC1) codant chacun pour le précurseur de la SP et, dans le cas des ARNm β-TAC1 et γ-TAC1, également pour le précurseur de la NKA et par extension de ses variants : le neuropeptide K et le neuropeptide γ respectivement. Le

gène TAC3 code, quant à lui, pour la Neurokinine B (NKB) via 2 ARNm α-TAC3 et β-TAC3. Un dernier membre de cette famille n'a été découvert que plus tard, il s'agit de l'hémokinine 1 codée par le gène TAC4 (**Joos and De Swert, 2006**). L'expression de la SP est largement répandue dans le SNC et le SNP puisque l'ARNm α-TAC1 est particulièrement abondant dans le cerveau, tandis que les ARNm β-TAC1 et γ-TAC1 sont principalement exprimés dans les tissus périphériques. Dans la peau, les cellules immunitaires peuvent également produire de la SP, en réponse au stress, à l'inflammation et aux infections notamment (**Harrison and Geppetti, 2001 ; Roosterman *et al.*, 2006**). Ainsi, une hausse de l'expression des ARNm codant pour la SP et son récepteur est observée en périphérie en cas de stimulation nocive pour l'organisme (douleur par exemple) et d'inflammation neurogène (**Harrison and Geppetti, 2001**).

La SP (**Figure 19**) est libérée de son précurseur sous l'action de convertases, puis est modifiée par une amidation à son extrémité C-terminale, permettant ainsi d'obtenir un undécapeptide dont la séquence finale est la suivante : Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH2 (**Chang *et al.*, 1971 ; Harrison and Geppetti, 2001**).

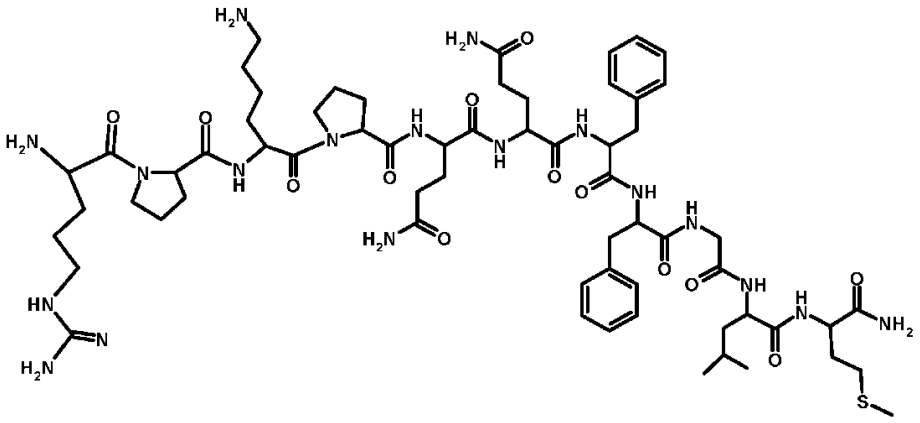


***Figure 19** : **Structure chimique de la SP** (**Majkowska-Pilip et al., 2019**).*

Le peptide est ensuite stocké dans des vésicules et transporté le long des axones jusqu'aux terminaisons nerveuses (**Harrison and Geppetti, 2001**). Plusieurs enzymes sont impliquées dans le métabolisme de la SP. Parmi elles, **Harrison et Geppetti (2001)** estiment qu'au vu de leur localisation, ce sont probablement la neutroendopeptidase (NEP) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) qui sont le plus souvent responsables du clivage de la partie C-terminale de la SP dans le cerveau, la moelle

épinière, le plasma et les tissus périphériques, empêchant ainsi sa liaison à son récepteur.

3. Récepteurs eucaryotes

Il existe trois récepteurs pour les tachykinines (nommé NK pour Neurokinines) : NK1 (**Figure 20**), NK2 et NK3. Ils font partie de la famille des RCPGs et ont chacun plus d'affinité pour la SP, la NKA et la NKB respectivement (**Regoli, 1994**). Les tachykinines ne sont cependant pas nécessairement sélectives pour un récepteur donné et peuvent agir sur chacun d'entre eux en fonction des conditions. C'est pourquoi malgré sa liaison préférentielle au récepteur NK1, la SP peut aussi activer les récepteurs NK2 et NK3 dans un certain nombre de tissus (**Harrison and Geppetti, 2001**).

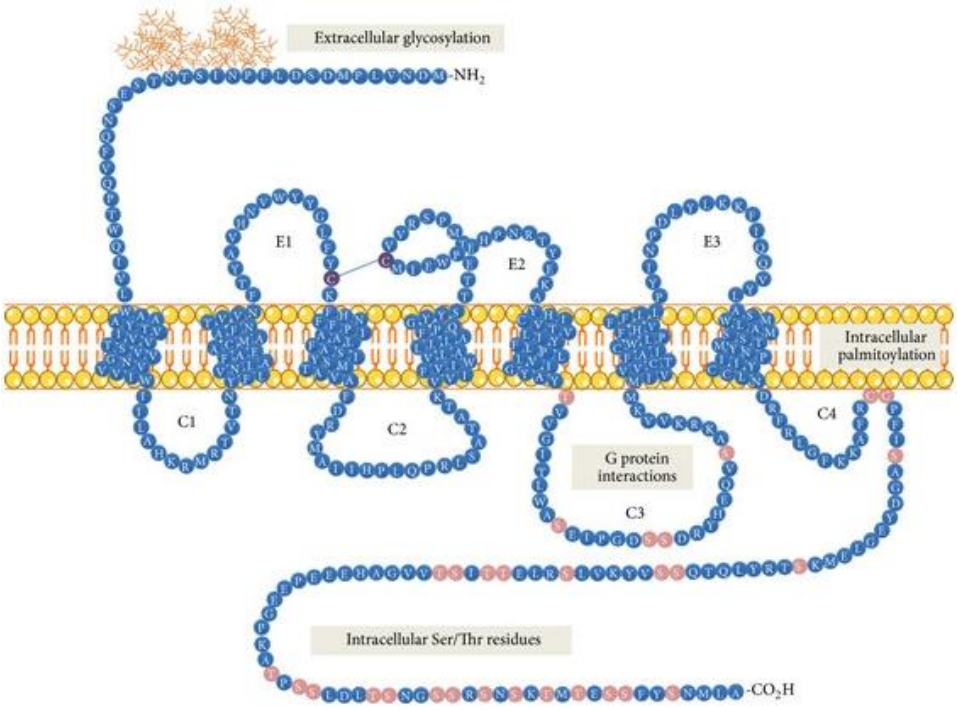


***Figure 20** : **Représentation schématique du récepteur NK1** de la SP (**Garcia-Recio and Gascón, 2015**). Il contient une extrémité N-terminale extracellulaire, sept domaines transmembranaires, trois boucles extracellulaires (E1, E2 et E3), trois boucles intracellulaires (C1, C2 et C3) et une extrémité C-terminale intracellulaire. Une boucle C4 est indiquée en raison de la présence d'un potentiel site de palmitylation. Les résidus sérine (Ser) et thréonine (Thr) intracellulaires responsables de l'internalisation du récepteur sont représentés en rose.*

Les mastocytes, fibroblastes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules de Merkel et de Langerhans expriment tous des récepteurs NK fonctionnels (**Roosterman *et al.*,**

2006). Des expériences de transfection réalisées sur la lignée cellulaire CHO issue du hamster ont démontré que le récepteur NK1 est couplé aux protéines $G_{\alpha q/11}$, $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha 0}$ (**Roush and Kwatra, 1998**). Ainsi, la liaison de la SP active trois voies : celle de la phospholipase Cβ qui entraîne une augmentation des concentrations d'IP_3 et de calcium ; celle de la phospholipase A2 induisant une libération d'acide arachidonique ; et celle de l'adénylate cyclase qui provoque une accumulation d'AMPc (**Harrison and Geppetti, 2001**). Chacune de ces voies (*décrites précédemment dans ce Chapitre*) agit ensuite sur l'expression des gènes, notamment ceux codant pour des cytokines ou des facteurs de transcription impliqués dans la régulation immunitaire. Comme beaucoup de RCPGs, les récepteurs NK sont sujets à l'internalisation et à la désensibilisation, après interaction avec leur ligand, afin d'éviter toute stimulation excessive. Il semblerait que la partie C-terminal des tachykinines participe à ce processus (**Figure 20**) (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Mashaghi *et al.*, 2016**).

4. Activités biologiques cutanées

La SP est le premier neuropeptide à avoir été identifié dans les terminaisons nerveuses de la peau où elle est particulièrement associée aux vaisseaux sanguins et aux fibres afférentes de type C, faisant à nouveau le lien avec son rôle dans la nociception (**Harrison and Geppetti, 2001 ; Severini *et al.*, 2002 ; Racine *et al.*, 2020**). Présente en abondance aussi bien au niveau du derme que de l'épiderme, l'expression du récepteur NK1 par les cellules cutanées lui confère un rôle dans la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes ainsi qu'une implication dans la cicatrisation (**Peters *et al.*, 2006 ; Roosterman *et al.*, 2006**). **Lai *et al.* (2002)** ont ainsi montré que la SP affecte l'expression du facteur de croissance épidermique (EGF) et de son récepteur au cours du processus de réparation tissulaire chez le rat. De même, une augmentation de la production du facteur de croissance nerveuse (NGF) par les kératinocytes humains après exposition à la SP et la NKA a également été démontrée. Cet effet peut donc avoir des conséquences importantes sur le maintien et la régénération des nerfs cutanés (**Burbach *et al.*, 2001 ; Roosterman *et al.*, 2006**). La SP augmente également l'expression des molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM) et vasculaires (VCAM) par les kératinocytes et les cellules endothéliales, ce qui participe à l'infiltration des granulocytes circulants dans la peau (**Quinlan *et al.*, 1998, 1999 ; Steinhoff *et al.*, 2003 ; Roosterman *et al.*, 2006**). De

manière générale, plusieurs revues font état de l'importance de la SP dans le fonctionnement du système immunitaire (**O'Connor *et al.*, 2004 ; Mashaghi *et al.*, 2016**) avec, par exemple, une implication dans les interactions kératinocytes/CPA (**Nakano, 2004**), la régulation des LT (**Orsal *et al.*, 2006**) et des cellules NK (**Lighvani *et al.*, 2005 ; Monaco-Shawver *et al.*, 2011**), le chimiotactisme des neutrophiles et des macrophages ou encore la dégranulation des mastocytes (**Brogden *et al.*, 2005**).

Outre son rôle dans la nociception (**Zieglgänsberger, 2019**), la SP est particulièrement connue pour son implication dans l'inflammation neurogène, c'est-à-dire la libération locale de neuropeptides par les terminaisons nerveuses sensorielles périphériques. Ces substances provoquent ainsi une augmentation du flux sanguin, une vasodilatation, une extravasation plasmatique et des symptômes inflammatoires (**Richardson and Vasko, 2002**). Un impact de la SP sur la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoire tels que l'IL-1β, l'IL-2, L'IL-6, l'IL-8, le TNF-α ou les leucotriènes B_4 a déjà été mis en évidence, de même que sur l'histamine et la prostaglandine D_2 (**Okabe *et al.*, 2000 ; Delgado *et al.*, 2003 ; Steinhoff *et al.*, 2003**). De ce fait, la SP va être liée de près à l'apparition de rougeurs correspondant à des érythèmes cutanés, de gonflements ou œdèmes, ainsi que de prurit soit des démangeaisons de la peau (**Steinhoff *et al.*, 2003 ; Raap *et al.*, 2011**). Ces particularités sous-entendent également une contribution de la SP à la pathogénèse de plusieurs maladies cutanées comme l'hypersensibilité, l'acné ou encore la rosacée. Une augmentation de la présence de fibres nerveuses épidermiques sensibles à la SP a également déjà été observée en cas de psoriasis, de dermatite atopique et de dermatite de contact (**Steinhoff *et al.*, 2003 ; Roosterman *et al.*, 2006 ; Mijouin *et al.*, 2013**). Au vu de l'implication du microbiote cutané dans ces mêmes maladies dermatologiques, une interaction entre la composante neuroendocrine et la composante microbienne dans ces différents cas de figure est plus qu'envisageable.

5. Action sur les bactéries et mécanisme de réponse

La présence de la SP dans tout l'organisme, ainsi que son implication dans les défenses immunitaires et la libération de LL37 et hBD2 (**Racine *et al.*, 2020**), lui confèrent un impact indirect sur la flore microbienne. **Kowalska *et al.* (2002)** sont les premiers à avoir montré que la SP a également des effets anti-microbiens directs sur *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* ainsi que *C. albicans* et que ces effets sont

comparables à ceux de l'indolicidine, un AMP puissant produit par les neutrophiles (**Brogden *et al.*, 2005**). Malgré des caractéristiques similaires à celles des AMPs (petite taille, nature amphiphile, légèrement cationique), cet effet anti-microbien n'est pas systématiquement retrouvé dans toutes les études. Ainsi, parmi le panel de microorganismes testés par **Hansen *et al.* (2006)**, seul *E. coli* a été inhibée par la SP tandis que l'étude de **El Karim *et al.* (2008)** démontre une sensibilité à la molécule chez plusieurs bactéries ainsi que *C. albicans*. Ces différences pourraient être propres à la diversité des souches testées et/ou à la méthodologie employée (**Hansen *et al.*, 2006 ; El Karim *et al.*, 2008 ; Augustyniak *et al.*, 2012**).

En tant que peptide le plus abondant au niveau cutané, la question de l'influence de la SP sur les bactéries commensales de la peau s'est évidemment posée et a fait l'objet de plusieurs publications. De manière générale, les neuropeptides cutanés (NPs, CGRP, NPY) démontrent une activité antimicrobienne à des concentrations élevées ($>10^{-4}$ M). A l'inverse, à des concentrations physiologiques sub-micromolaires, certains de ces neuropeptides, tels que la dynorphine et les NPs induisent un effet stimulant sur la virulence bactérienne sans pour autant modifier le taux de croissance (**Lesouhaitier *et al.*, 2019 ; Racine *et al.*, 2020**). C'est le cas de la SP, utilisée dans les études décrites ci-dessous à une concentration de l'ordre du micromolaire, correspondant à ce qui peut être retrouvé dans la sueur ou les zones intradermiques (**N'Diaye *et al.*, 2016a**).

Ainsi, une première publication datant de 2013 s'est intéressée à *B. cereus*, un membre de la flore cutanée transitoire, et a démontré une très forte augmentation de la cytotoxicité de la bactérie vis-à-vis de la lignée de kératinocytes HaCaT après exposition à la SP. Les auteurs ont ainsi observé qu'il suffit de 5 minutes de pré-traitement au neuropeptide, pendant la phase exponentielle de croissance de *B. cereus*, pour atteindre environ 90% de la réponse maximale en cytotoxicité, démontrant ainsi un effet très rapide de la SP. Cette augmentation de la virulence bactérienne est également associée à une hausse de la formation de biofilm qui peut s'expliquer par une modification des propriétés de surface de la bactérie (**Mijouin *et al.*, 2013**). L'étude a démontré que l'infection des HaCaT avec *B. cereus* pré-traitée à la SP entraîne une altération de la structure des kératinocytes, avec une désorganisation du cytosquelette et la formation de vésicules intracytoplasmiques, ainsi qu'une activation de l'inflammasome démontrée

par la libération de l'enzyme caspase-1 impliquée dans la nécrose cellulaire. Une analyse du sécrétome de la bactérie, combinée à des images de microscopie électronique, ont révélé que la SP stimule la libération de collagénase et de superoxyde dismutase et entraîne un décollement de la couche S de l'enveloppe bactérienne et la libération des protéines associées (**Mijouin *et al.*, 2013**). D'autres résultats obtenus sur des souches cutanées de *S. aureus* et *S. epidermidis* ont également montré une augmentation de la cytotoxicité et de l'adhésion de ces bactéries sur modèle HaCaT après exposition à la SP (**Mijouin *et al.*, 2013 ; N'Diaye *et al.*, 2016a**). En revanche, chez *P. fluorescens*, malgré une absence d'effet sur la cytotoxicité, le pré-traitement à la SP augmente la capacité d'adhésion et d'invasion de la bactérie, démontrant à nouveau un impact sur la virulence. Des modifications de la structure du biofilm ont également été observées (**Hillion *et al.*, 2014**). Afin de compléter les résultats obtenus sur les monocouches de HaCaT, **N'Diaye *et al.*** (**2016a**) ont évalué la virulence sur modèle Reconstructed Human Epidermis (RHE) et ont relevé une réduction de la viabilité du RHE après infection avec *S. aureus* et *S. epidermidis* prétraitées à la SP. Le RHE reste un modèle de peau relativement simplifié mais possède un *stratum corneum* bien différencié et un comportement proche des explants de peau humaine (**N'Diaye *et al.*, 2016a**). Des analyses de qRT-PCR en microarray réalisées sur 64 gènes des RHE après infection ont montré des modifications de l'expression des gènes liés aux défenses immunitaires et à l'inflammation en cas d'exposition préalable des bactéries à la SP. En parallèle, la réponse de *S. aureus* à la présence du neuropeptide est associée à une augmentation de la production d'entérotoxine staphylococcique C2 et à une réduction du clivage du précurseur d'une exolipase, tandis que chez *S. epidermidis*, l'effet de la SP semble être médié par une augmentation de la formation de biofilm (**N'Diaye *et al.*, 2016a**). En dehors du contexte cutané, la SP a des effets similaires chez *E. faecalis*, une bactérie intestinale responsable d'infections urinaires graves, d'infections de plaies chirurgicales, de bactériémies et d'endocardites bactériennes. Chez cette dernière, le neuropeptide stimule l'agrégation, l'hydrophobicité, la production d'acide lactique et de tyramine tout en favorisant la cytotoxicité et la translocation bactérienne sur la lignée intestinale Caco-2/TC7 (**Biaggini *et al.*, 2017**).

Chez les eucaryotes, la SP est reconnue par le récepteur NK1. Au vu de la structure et de la charge du neuropeptide ainsi que de la rapidité de la réponse obtenue chez *B. cereus*, **Mijouin *et al.* (2013**) ont exploré l'hypothèse de la présence d'un récepteur de surface et ont réalisé des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits de membrane de la bactérie. C'est ainsi que la présence d'une protéine de liaison de 43 kDa, identifiée ensuite par MALDI-TOF comme étant le facteur d'élongation ribosomale thermosensible Ef-Tu, a été mise en évidence. Des travaux ont montré qu'Ef-Tu peut être retrouvée à la surface ou dans des vésicules de la membrane externe chez *Acinetobacter baumannii* où elle va également pouvoir lier la fibronectine (**Dallo *et al.*, 2002, 2012**) et elle peut servir de récepteur au plasminogène chez *Bacillus anthracis* pour échapper à l'action du complément (**Chung *et al.*, 2011**). Bien qu'il n'y ait aucune homologie de séquence ou de structure entre Ef-Tu et le récepteur eucaryote NK1, la quantité d'Ef-Tu exprimée est 4 à 15 fois supérieure à celle requise pour son association stœchiométrique aux ribosomes. Pouvant ainsi atteindre jusqu'à 5 % des protéines bactériennes totales, cela laisse effectivement présager l'existence d'autres fonctions que celle classiquement attribuée à cette molécule (**N'Diaye *et al.*, 2019 ; Racine *et al.*, 2020**). Celles-ci étant également liées à la localisation de la protéine, dans le cytoplasme ou à la surface membranaire, cela place donc Ef-Tu dans la catégorie des « moonlighting proteins » (**Amblee and Jeffery, 2015**).

Ef-Tu est aussi retrouvée dans le cas de *S. aureus et S. epidermidis* et il apparaît qu'un analogue de la protéine existe également chez les *Pseudomonas*, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle Ef-Tu pourrait être le senseur bactérien de la SP (**Hillion *et al.*, 2014 ; N'Diaye *et al.*, 2016a**). **Mijouin *et al.* (2013)** ont suggéré qu'Ef-Tu est colocalisée et devrait interagir avec la protéine MreB qui possède une structure et des propriétés semblables à l'actine et pourrait jouer un rôle dans la transduction du signal après interaction avec la SP. Plus tard, **N'Diaye *et al.* (2019)** ont réalisé des études de microscopie confocale et microscopie électronique à transmission qui ont révélé qu'en l'absence de signal exogène, Ef-Tu n'est pas exposée à la surface de *B. cereus* mais est recrutée sous l'effet de la SP. Le neuropeptide semble également augmenter la transcription du gène *tuf* codant pour ce senseur hypothétique qui serait ensuite exporté à l'extérieur via les canaux mécanosensibles de large conductance MscL (**Figure 21**)

(**Berrier *et al.*, 2000 ; N'Diaye *et al.*, 2019**). Grâce à des expériences de thermophorèse à microéchelle (Microscale Thermophoresis, MST) et de docking moléculaire, les auteurs sont parvenus à proposer le mécanisme d'action suivant : en l'absence d'un ligand exogène, Ef-Tu resterait soluble dans le milieu extracellulaire, probablement sous forme monomérique, et incapable de s'associer à la membrane bactérienne. La liaison de la SP devrait induire des changements de conformation, probablement une multimérisation, et enfin une interaction avec les lipides de la membrane. Le processus conduisant à la réponse bactérienne reste à étudier, mais la possibilité qu'Ef-Tu forme des structures en forme de pore pourrait y participer (**N'Diaye *et al.*, 2019**). Des études supplémentaires permettraient de compléter cette hypothèse et d'élucider la manière dont se fait la transduction du signal.

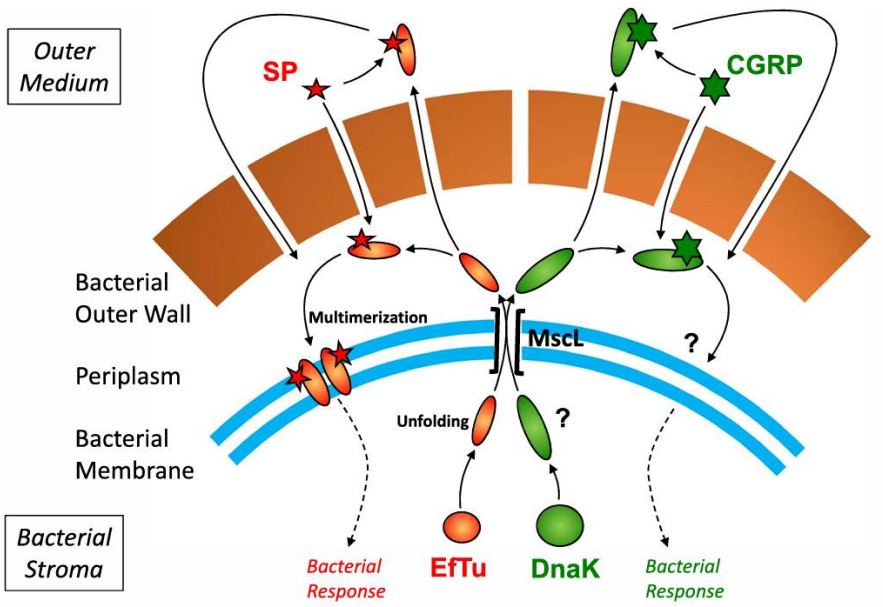


***Figure 21** : **Modèle du mécanisme d'action proposé de la Substance P (SP) et du CGRP** chez Staphylococcus epidermidis. Les senseurs Ef-Tu et DnaK seraient tous les deux exportés à travers les canaux mécanosensibles de large conductance MscL (**Racine et al., 2020**).*

4- Le CGRP

Au niveau cutané, la SP est souvent colocalisée avec le CGRP qui est également libéré par les terminaisons nerveuses afférentes de type C. Ce neuropeptide de 37 acides aminés appartient à la même famille que la calcitonine, l'adrénomédulline et l'amyline et possède deux isoformes, α et β, le premier étant majoritaire sur la peau (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Racine *et al.*, 2020**). De la même façon que la SP, le CGRP est impliqué dans

l'inflammation neurogène mais également dans la perception et la modulation de la douleur (**Iyengar *et al.*, 2017**). Ce neuropeptide est un vasodilatateur puissant, qui va être capable de moduler le système immunitaire et de potentialiser la perméabilité vasculaire et la formation d'œdèmes causés par la SP et la NKA (**Roosterman *et al.*, 2006**).

Des travaux réalisés par **N'Diaye *et al.* (2016b)** sur *S. aureus* et *S. epidermidis* ont démontré que le CGRP est capable de stimuler la virulence de cette dernière avec un seuil d'activité de 10^{-12} M, ce qui rentre dans la gamme de concentrations physiologiques du neuropeptide. Une exposition de la lignée HaCaT, ainsi que du modèle RHE, à une souche de *S. epidermidis* traitée au CGRP entraîne une augmentation de la cytotoxicité de la bactérie ainsi qu'une stimulation de la sécrétion d'IL-8 et de cathélicidine LL-37. Aucune modification dans l'expression de facteurs de virulence n'a été observée mais des changements de propriété de surface, avec une augmentation de l'hydrophobicité, se sont accompagnés d'une réduction des capacités d'invasion et de formation de biofilm de la bactérie (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). Ces résultats pourraient ainsi démontrer une transition de *S. epidermidis* vers un mode de virulence aiguë après exposition au neuropeptide (**Racine *et al.*, 2020**). Par des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits de membrane de *S. epidermidis*, migration sur gel SDS-Page et identification par spectrométrie de masse, la présence d'une unique protéine de liaison au CGRP, correspondant à la protéine chaperonne DnaK, a été mise en évidence. Celle-ci serait, à l'instar d'Ef-Tu, exportée par le canal MscL dans le milieu extérieur (**Figure 21**) et ferait également partie de la catégorie des « moonlighting proteins » (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). Le mécanisme d'action précis du CGRP sur les bactéries et l'implication de la protéine DnaK sont encore en cours d'investigation.

Le CGRP étant le neuropeptide utilisé au cours de ces travaux de thèse, il fait l'objet du Chapitre 3 qui lui est entièrement dédié et détaillera les données de la littérature à son sujet ainsi que les hypothèses concernant son interaction avec DnaK. Pour cette raison, il n'est donc pas abordé en détails dans cette partie.

5- Autres facteurs eucaryotes et bactériens

Depuis les travaux pionniers de Lyte et son équipe ainsi que l'émergence du concept d'Endocrinologie Microbienne, le spectre de molécules eucaryotes possédant des effets

sur la physiologie et la virulence bactérienne n'a fait que s'élargir (**Augustyniak *et al.*, 2021**). Outre les hormones de stress initialement étudiées, les microorganismes détectent également des facteurs immunomodulateurs, de même que d'autres hormones et neuropeptides. Ainsi, plusieurs médiateurs immunitaires tels que les interleukines IL-1, IL-2, IL-6, le TNFα ou bien encore le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) sont capables de promouvoir la croissance bactérienne (**Lesouhaitier *et al.*, 2009**). Une étude de **Wu *et al.* (2005)** a montré que l'interféron-γ se lie à la protéine OprF, présente dans la membrane externe de *P. aeruginosa*, et entraîne l'induction du QS et de l'expression de la lectine PA-I. Ce résultat illustre bien la manière dont les pathogènes opportunistes vont détecter l'activation des défenses immunitaires et y répondre en renforçant leur virulence (**Wu *et al.*, 2005**). Les dynorphines, des peptides opioïdes impliqués dans la douleur et la réponse au stress, sont aussi susceptibles de s'accumuler en cas d'inflammation et d'impacter la virulence bactérienne. Chez *P. aeruginosa*, cela se traduit par une activation du QS de la bactérie, de même qu'un effet dose-dépendant sur la production de pyocyanine et une virulence sur le modèle *C. elegans*. Le mécanisme de réponse reste encore à élucider mais des hypothèses font état de l'implication du régulateur MvfR et du système à deux composants ParRS en tant que potentiels senseurs bactériens des dynorphines (**Zaborina *et al.*, 2007 ; Wright *et al.*, 2017 ; Lesouhaitier *et al.*, 2019**). Chez *Helicobacter pylori* cette fois-ci, des études ont montré les effets dose-dépendants de deux hormones présentes dans le tractus gastro-intestinal. Ainsi, **Yamashita *et al.* (1998)** et **Chowers *et al.* (1999)** ont mis en évidence que la somatostatine et la gastrine vont respectivement inhiber et stimuler la croissance de la bactérie. La présence d'un senseur bactérien présentant une similarité fonctionnelle avec le sous-type 2 du récepteur humain à la somatostatine, ainsi que l'implication du GMPc et de l'AMPc dans la transduction du signal, viennent en partie expliquer ces résultats (**Yamashita *et al.*, 1998 ; Lesouhaitier *et al.*, 2019**). Un impact du 17-ß estradiol a aussi été mis en avant chez deux souches de *Lactobacillus crispatus*, une espèce majeure du microbiote vaginal. Ainsi l'hormone favorise la production de biosurfactant et l'adhésion bactérienne aux cellules vaginales VK2/E6E7 mais possède aussi des effets propres à l'une ou l'autre des souches comme une augmentation de l'agrégation, une altération de

la morphologie et de la fluidité membranaire et une modification des propriétés de surface (**Clabaut *et al.*, 2021a, 2021b**).

Une multitude d'autres peptides présents au niveau cutané, de même que leurs interactions avec le microbiote, restent à explorer. L'α-MSH et le POMC, ainsi que leurs récepteurs, sont produits par la peau (**Slominski *et al.*, 2000**) et ont déjà démontré une activité antimicrobienne et antifongique contre *S. aureus* et *C. albicans*. Chez cette dernière, l'α-MSH semble interférer avec des mécanismes de régulation essentiels de la levure par augmentation de l'AMPc intracellulaire (**Cutuli *et al.*, 2000 ; Catania *et al.*, 2006**). Le NPY, le VIP ou encore le galanin-like peptide (GALP) sont aussi décrits dans la littérature pour leurs activités antimicrobiennes (**Vouldoukis *et al.*, 1996 ; Hansen *et al.*, 2006 ; El Karim *et al.*, 2008 ; Holub *et al.*, 2011 ; Augustyniak *et al.*, 2012**) bien que celles-ci correspondent généralement à des concentrations non physiologiques. Au vu des résultats similaires obtenus initialement sur les NPs et la SP, ces peptides méritent donc de plus amples études.

Un autre aspect du concept de l'Endocrinologie Microbienne reste encore peu exploré : il s'agit de la capacité des microorganismes à produire des hormones/neurotransmetteurs ou des molécules qui vont mimer leurs effets. Cela a d'abord été démontré pour la sérotonine et le GABA (**Mazzoli and Pessione, 2016**), mais des études ont aussi mis en avant que des bactéries qu'on peut retrouver sur la peau telles que *S. epidermidis*, *C. acnes* ou encore des *Corynebacterium* sont capables de synthétiser et produire de l'histamine ou du glutamate (**Allaker *et al.*, 1986 ; Yokoi *et al.*, 2011 ; Persicke *et al.*, 2015**). Une équipe a également montré que *E. coli* synthétise la protéase ClpB qui présente une homologie conformationnelle avec l'α-MSH. Libérée dans l'intestin, cette protéine bactérienne peut transloquer à travers la barrière intestinale et diffuser dans le sang. De là, elle va interférer avec le rôle endogène de l'hormone en induisant la production d'anticorps IgG présentant une réaction croisée avec l'α-MSH et en influençant la prise alimentaire (**Tennoune *et al.*, 2014; Fetissov *et al.*, 2019**). Un tel phénomène n'a pas encore été décrit pour la peau mais il s'avère que certains superantigènes bactériens présentent une homologie avec des protéines cutanées comme la kératine et pourraient donc être impliqués dans des maladies de la peau (**Racine *et al.*, 2020**). De façon encore plus intéressante car très sous-explorée,

environ 16 protéines virales différentes, présentant une grande similarité de séquence avec les hormones humaines et les neurohormones dont l'insuline, les facteurs de croissance des fibroblastes 19 et 21, l'inhibine et l'endothéline, ont été identifiées par approche bioinformatique (**Huang *et al.*, 2019**). Le virome cutané serait donc également impliqué dans cette communication bidirectionnelle avec l'hôte (**Racine *et al.*, 2020**).

Ainsi, la peau abrite le deuxième plus grand microbiote du corps humain et constitue un organe neuroendocrinien majeur contenant un réseau dense de terminaisons nerveuses et de capillaires. Ces derniers, en plus des kératinocytes, fibroblastes, mélanocytes, cellules dendritiques et cellules endothéliales, libèrent une grande diversité d'hormones et de neurohormones. Ces molécules, bien que peu stables, sont renouvelées en permanence et les variations locales de leur concentration sont le reflet de l'activité neurophysiologique et des troubles éventuels de l'hôte (**Racine *et al.*, 2020**). Les quelques exemples mentionnés dans ce Chapitre 2 font état d'un impact direct des catécholamines, des NPs, de la SP et du CGRP sur le microbiote cutané et ce, à des concentrations de l'ordre du nano- ou du micromolaire. Il apparait ainsi que la physiologie et la virulence des bactéries de la peau sont contrôlés par la détection des molécules eucaryotes libérées dans le microenvironnement en tant que modulateurs endocriniens ou neuroendocriniens. La sensibilité des microorganismes à ces molécules nécessite la présence de senseurs. Les neuropeptides ne pouvant généralement pas traverser librement la membrane bactérienne, ils nécessitent soit la présence de ces derniers dans la membrane, soit des transporteurs permettant une reconnaissance directe à l'intérieur du cytoplasme bactérien. Une particularité de ces senseurs est qu'ils sont souvent sensibles aux agonistes/antagonistes des récepteurs eucaryotes, démontrant ainsi des profils pharmacologiques similaires. Le décryptage des mécanismes d'action des hormones pourrait donc permettre à la communauté scientifique d'identifier de nouvelles cibles bactériennes d'intérêt thérapeutique dans diverses maladies (**Lesouhaitier *et al.*, 2009 ; Lesouhaitier *et al.*, 2019**).

Chapitre 3 – Calcitonin Gene-Related Peptide

La fin des années 1970 a été marquée par un important changement de paradigme lorsque des chercheurs ont observé que, chez les eucaryotes, il était possible de produire plusieurs ARN messagers (ARNm), correspondant à des protéines distinctes, à partir d'une séquence génomique unique. C'est au moment de cette découverte qu'Amara et Rosenfeld ont réalisé des expériences de transplantation en série de carcinomes médullaires de la thyroïde chez le rat, et ont constaté que cela entraînait une diminution marquée de la biosynthèse de la calcitonine. Celle-ci était liée à des modifications spécifiques de la voie de synthèse de l'ARNm correspondant qui résultaient en la production d'un nouvel ARNm, encore inconnu. Ce mécanisme, dit d'épissage alternatif, aboutit ainsi à deux ARNm distincts à partir du même gène : l'un codant pour la calcitonine, majoritairement exprimée dans la thyroïde, et l'autre pour l'α-CGRP, dont l'expression prédomine dans l'hypothalamus (**Rosenfeld *et al.*, 1981; Amara *et al.*, 1982**). Quelques années après, la même équipe a découvert l'existence d'un autre ARNm issue d'un gène apparenté, identifié dans le cerveau et la thyroïde de rat, et codant pour le précurseur d'un peptide ne différant de l'α-CGRP que par un seul acide aminé : le β-CGRP (**Amara *et al.*, 1985**). En parallèle, le CGRP fut également isolé, pour la première fois, chez des patients atteints de carcinomes médullaires de la thyroïde (**Morris *et al.*, 1984**).

I- Généralités sur le CGRP

Le CGRP est un neuropeptide de 37 acides aminés faisant partie de la même famille que la calcitonine, l'amyline ainsi que l'adrénomédulline et l'adrénomédulline 2, cette dernière étant également connue sous le nom d'intermédine (**Russo and Hay, 2023**). Il est retrouvé aussi bien dans le SNC que le SNP (**Rosenfeld *et al.*, 1983**) et est libéré par deux sites majeurs impliqués dans la synthèse de neuropeptides : le ganglion trigéminal (**Mason *et al.*, 1984**) et les ganglions des racines dorsales de la moelle épinière (**Gibson *et al.*, 1984**).

À l'origine, il a été démontré que le CGRP agit sur le SNC en stimulant sélectivement la branche sympathique noradrénergique de celui-ci (**Fisher *et al.*, 1983**) avant que ne lui soit accordée une importante activité vasodilatatrice, prouvée notamment par

administration intradermique de doses de l'ordre du femtomolaire chez l'Homme et l'animal (**Brain *et al.*, 1985 ; Kawasaki *et al.*, 1988**). Cet effet modulateur du tonus vasculaire est également retrouvé dans la circulation cérébrale (**Hanko *et al.*, 1985**) et il apparaît que le CGRP possède un rôle protecteur dans les conditions physiologiques et pathologiques impliquant le système cardiovasculaire et la cicatrisation des plaies (**Brain and Grant, 2004 ; Russell *et al.*, 2014**). Majoritairement libéré au niveau des terminaisons nerveuses de type C et Aδ, le CGRP est régulièrement colocalisé avec la SP et est impliqué dans les voies de la douleur (**Maggi, 1995 ; Russell *et al.*, 2014**). La recherche d'antagonistes de ce neuropeptide dans le traitement de la migraine fait d'ailleurs l'objet de nombreuses études (**Russell *et al.*, 2014**). La présence du CGRP dans les nerfs périvasculaires de l'organisme renforce le lien avec le système sanguin. De manière générale, la concentration plasmatique du CGRP reste faible et provient plutôt de traces résultant de l'activité des neurones sensoriels périvasculaires. Il apparaît ainsi que les principaux effets biologiques du CGRP s'exercent localement, dans la paroi du vaisseau, à proximité de son site de libération (**Russell *et al.*, 2014**). Enfin, ce peptide n'est pas uniquement localisé dans les tissus nerveux puisqu'il apparaît qu'il est retrouvé au niveau des cellules endothéliales (**Ozaka *et al.*, 1997 ; Cai *et al.*, 2008**) et qu'il est produit par les cellules immunitaires telles que les lymphocytes (**Bracci-Laudiero *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2002**) et les cellules mononucléées sanguines périphériques (**Linscheid *et al.*, 2004**) ainsi que par les kératinocytes (**Hou *et al.*, 2011**). Comme décrit plus loin dans ce chapitre, le CGRP possède un rôle aussi bien anti- que pro-inflammatoire, en fonction des conditions, et va notamment être impliqué dans le phénomène d'inflammation neurogène (**Brain, 1997 ; Russell *et al.*, 2014**).

II- Structure et biosynthèse

Le CGRP possède deux isoformes, α et β, exprimés par deux gènes distincts présents sur le chromosome 11 chez l'Homme : le gène CALCA code ainsi pour la calcitonine, la katacalcine et l'α-CGRP, tandis que le gène CALCB code pour le β-CGRP, qui ne diffère de la forme α que de 3 acides aminés chez l'humain (**Figure 22**) (**Russell *et al.*, 2014 ; Russo and Hay, 2023 ; Sánchez *et al.*, 2023**). **Russo et Hay (2023)** soulève la question de savoir si le peptide précurseur de la calcitonine, la pro-calcitonine, devrait également être considéré comme un membre de cette famille de peptides. Il semblerait en effet qu'il

agisse comme un agoniste partiel du récepteur au CGRP et qu'il soit impliqué dans le phénomène de septicémie et dans certaines pathologies inflammatoires.

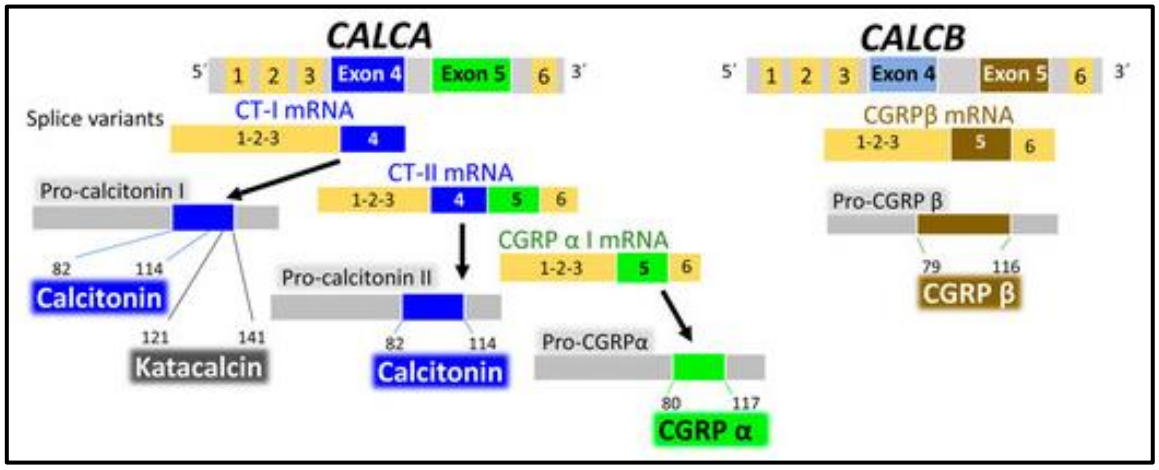


Figure 22 : Epissage alternatif des gènes CALCA et CALCB. *CALCA permet d'obtenir la calcitonine, la katacalcine et l'isoforme α du CGRP tandis que CALCB ne donne que l'isoforme β du CGRP (**Sánchez et al., 2023**).*

Il a d'abord été considéré que l'α-CGRP est la principale forme présente dans le SNC et le SNP, tandis que le β-CGRP se trouve plutôt dans le SNE (**Mulderry *et al.*, 1988 ; Schütz *et al.*, 2004**). Il semblerait cependant que les deux isoformes puissent être retrouvés dans le tractus gastro-intestinal et le SNC. Ils possèdent des activités presque indiscernables et, bien qu'ils soient différentiellement régulés, il existe un chevauchement de leur expression. Cela rend donc la compréhension de la contribution physiologique relative d'un isoforme par rapport à l'autre plus complexe (**Hay and Walker, 2017 ; Russo and Hay, 2023**). L'α-CGRP est la forme la plus étudiée et la plus largement utilisée dans les études scientifiques. De ce fait, comme dans la plupart des publications sur le sujet, le terme CGRP sera ici utilisé sans distinction particulière entre les deux isoformes, à moins que cela soit spécifiquement pertinent.

La forme mature (**Figure 23**) de l'α-CGRP s'obtient après clivage de son pro-peptide de 121 acides aminés et comporte quatre domaines, similaires à ceux du β-CGRP. Les sept premiers résidus ($CGRP_{1-7}$) de l'extrémité N-terminale constituent le premier domaine et forment un anneau maintenu par un pont disulfure. Cette structure serait responsable de l'activation des récepteurs au CGRP. Un des principaux antagonistes du CGRP, régulièrement mentionné dans la littérature, et noté $CGRP_{8-37}$, provient d'ailleurs du clivage de ces résidus (**Chiba *et al.*, 1989**). Le deuxième domaine ($CGRP_{8-18}$) forme une

hélice α tandis que le troisième ($CGRP_{19-27}$) est constitué de torsions de brins β et γ. Le quatrième et dernier domaine ($CGRP_{28-37}$) contient une extrémité C-terminale qui comporte un groupement amide, provenant d'une modification post-traductionnelle nécessaire à la liaison aux récepteurs et à l'activité biologique de la molécule. Ainsi, la présence d'une immunoréactivité au CGRP, ou la détection de son ARNm dans un tissu, ne correspondent pas nécessairement à la présence d'une forme entièrement modifiée et fonctionnelle de la molécule. Néanmoins, l'enzyme peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase (PAM), responsable de l'amidation d'une grande partie des protéines de l'organisme, est présente dans de nombreux types cellulaires (**Conner *et al.*, 2002 ; Russell *et al.*, 2014 ; Russo and Hay, 2023**). Enfin, les régions $CGRP_{28-37}$ et $CGRP_{8-18}$ sont requises pour permettre une liaison de haute affinité, la première étant en contact direct avec le récepteur tandis que la deuxième peut établir des contacts supplémentaires et de stabiliser la conformation des résidus $CGRP_{28-37}$. Une revue de **Watkins *et al.* (2013)** revient sur la relation structure-activité ainsi que sur les acides aminés clés pour la liaison et l'activation des récepteurs du CGRP.

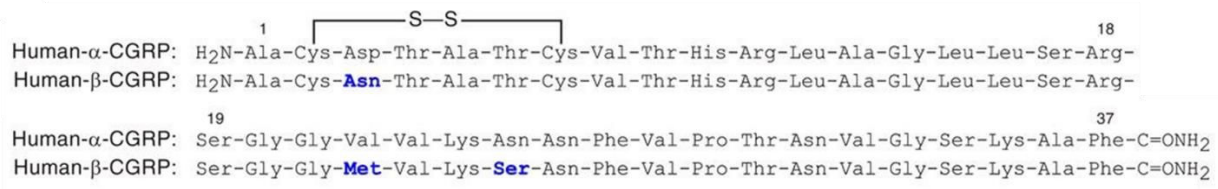


***Figure 23* : Séquences en acides aminés de l'α- et du β-CGRP humain.** *L'emplacement du pont disulfure, ainsi que les trois acides aminés qui diffèrent entre les deux isoformes (bleu), sont indiqués (adapté de **Russell et al., 2014**).*

Après clivage, le CGRP est stocké dans des vésicules qui sont transportée le long de l'axone neuronal pendant des heures, voire des jours pour les axones les plus longs. Une fois arrivées dans les terminaisons nerveuses sensoriels, et après dépolarisation neuronale, le neuropeptide est libéré par un processus d'exocytose calcium-dépendant (**Russell *et al.*, 2014 ; Russo and Hay, 2023**). A ce niveau, le CGRP et tous les neuropeptides se distinguent par leur capacité à réaliser ce que l'on nomme la transmission volumique. Il s'agit de la distribution par diffusion de ces molécules dans le liquide extracellulaire, et le liquide céphalorachidien, sur une distance relativement importante (**Russo and Hay, 2023**). En effet, en contraste avec les neurotransmetteurs

qui sont surtout sécrétés dans la fente synaptique, les neuropeptides peuvent aussi être libérés par le corps cellulaire et les varicosités (renflements) des axones (**Russo and Hay, 2023**). Combiné au fait que ce sont des centaines de vésicules, contenant de nombreuses molécules, qui sont libérées en l'espace de quelques secondes à partir d'un neurone, cela confère un champ d'action large au CGRP.

Initialement décrit et étudié en tant que neuropeptide car abondamment exprimé par les neurones sensoriels, le CGRP est également libéré par une variété de cellules non neuronales. Celles-ci comprennent les cellules neuroendocrines et endocrines de l'organisme telles que les cellules C de la thyroïde, les épithéliums des poumons et des voies respiratoires, les cellules endocrines des muqueuses de l'intestin grêle, les cellules chromaffines surrénaliennes, les îlots pancréatiques et les cellules de Merkel dans la peau. Enfin, outre ces sources endocrines et neuronales, le CGRP est aussi synthétisé et sécrété par les adipocytes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les globules blancs, les fibroblastes cardiaques et les cellules parenchymateuses du foie (**Russo and Hay, 2023**). La diversité des sources possibles de ce peptide, certaines exprimant le CGRP uniquement en conditions inflammatoires ou de stress (**Russo and Hay, 2023**), permet d'expliquer la variété de processus physiologiques dans lesquels il est impliqué et qui sont décrits plus loin dans ce Chapitre.

III- Régulation

La régulation de la synthèse de CGRP fait encore l'objet d'études mais il semblerait qu'elle soit stimulée en cas de lésions nerveuses. Il existe ainsi un lien direct entre la libération du facteur de croissance nerveuse NGF, nécessaire à la mise en place et au maintien de la fonction des nerfs matures, et la synthèse de CGRP (**Donnerer *et al.*, 1992 ; Park *et al.*, 2010 ; Russell *et al.*, 2014**). Il semblerait également que la synthèse du peptide soit plus importante dans les tissus inflammés (**Donnerer and Stein, 1992**) et soit influencée par des substances impliquées dans la régulation de la pression artérielle telles que l'angiotensine II et la NE (**Russell *et al.*, 2014**). Enfin, l'acide rétinoïque, les glucocorticoïdes et la vitamine D répriment, quant à eux, l'expression du CGRP (**Russo and Hay, 2023**).

1- Régulation transcriptionnelle

La transcription du gène CALCA est stimulée par les voies de signalisation de l'AMPc et des MAPKs qui sont activées ou réprimées en fonction des signaux extracellulaires. Elle repose ainsi sur deux séquences régulatrices, une proximale (CRE/RRE, de -255 à -72 paires de bases) et une distale (HLH/Oct, à -1 kilobase), situées en amont du promoteur du gène (**Figure 24**). Comme décrit plus loin dans ce Chapitre, le CGRP agit par l'intermédiaire de RCPGs et sa fixation entraîne donc une augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire. La séquence régulatrice proximale est justement un activateur inductible, entre autres, par le NGF et la voie de signalisation de l'AMPc. Cette dernière conduit à une cascade de réactions activant des facteurs qui exercent leur action sur CRE/RRE. En parallèle, l'AMPc va également activer la voie MAPK qui va agir sur CRE/RRE mais également sur la séquence régulatrice distale HLH/Oct. Cette dernière est responsable de l'expression génique spécifique du CGRP dans certains types cellulaires et va lier un hétérodimère composé de deux facteurs de transcription : le upstream stimulating factor (USF1 et USF2) et la protéine forkhead FoxA2. La voie MAPK étant aussi activée par des cytokines (TNF-α et IL-1β), les signaux inflammatoires perçus par la cellule contribue à la transcription du gène CALCA (**Russo and Hay, 2023**).

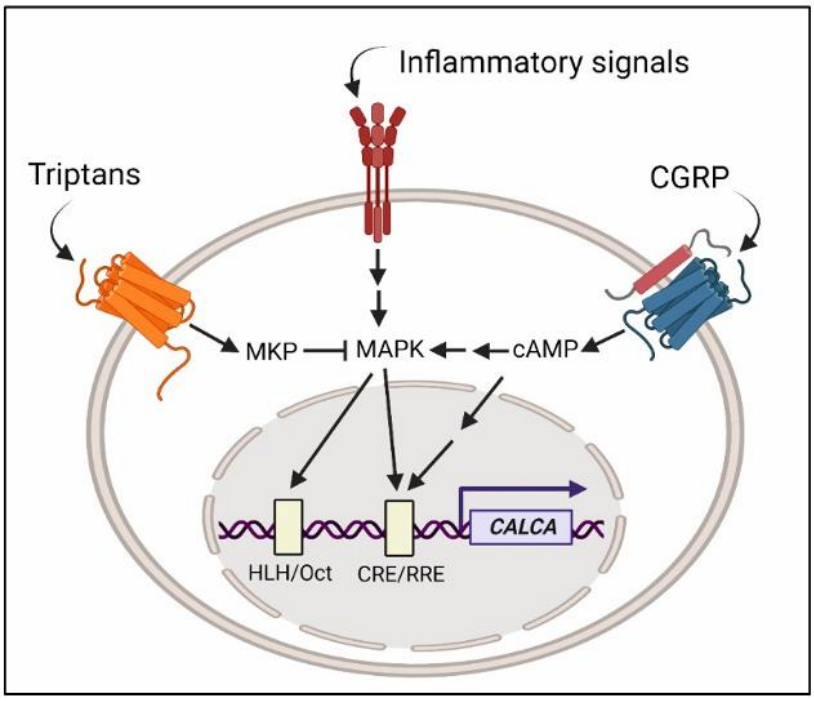


Figure 24* : *Régulation de l'expression du gène CALCA. *La transcription du gène CALCA est stimulée par les voies de signalisation AMPc et MAPK, qui sont activées ou réprimées*

*par des signaux extracellulaires, et vont agir sur les séquences régulatrices HLH/Oct et CRE/RRE. Les triptans, des médicaments destinés au traitement de la migraine, agissent via des RCPGs qui vont inhiber MAPK et réduire son activité (**Russo and Hay, 2023**).*

Un élément important à relever est qu'il semblerait que le CGRP est capable de réaliser une boucle de rétroaction positive afin de stimuler sa propre expression (**Zhang *et al.*, 2007**). Les éléments régulateurs de la transcription de CALCB n'ont, pour l'instant, pas encore été identifiés mais il apparaît que les deux gènes semblent être sujets à des régulations épigénétiques (**Russo and Hay, 2023**).

2- Clairance

Grâce à des expériences reposant sur l'incubation du CGRP de différentes espèces avec des enzymes purifiées ou en cocktail, ainsi que des lysats de tissus ou des fluides (plasma, liquide céphalorachidien), plusieurs enzymes responsables de la dégradation du peptide ont été identifiées. Parmi elles, on retrouve l'endopeptidase neutre, une tryptase, l'enzyme dégradant l'insuline (IDE), la plasmine, la thrombine, la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP2), la trypsine et l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE). Plusieurs sites de clivages ont été identifiés à l'intérieur de la séquence du peptide (**Russo and Hay, 2023**). La demi-vie du peptide est ainsi d'environ 7 minutes dans le plasma (**Kraenzlin *et al.*, 1985**) mais semble être plus longue dans la peau où son action peut durer plusieurs heures chez des modèles animaux (**Brain *et al.*, 1985 ; Brain and Williams, 1988**). Cependant, l'amidation de l'extrémité carboxyle protège le peptide de la dégradation, augmentant ainsi sa demi-vie et lui permettant de se propager jusqu'à des cibles se situant au-delà de son site de sécrétion initial (**Edvinsson *et al.*, 2018**). Enfin, il semblerait que la réabsorption du CGRP par les terminaisons nerveuses et son élimination par les reins et le foie participent à la clairance du peptide, bien que les données à ce sujet restent limitées. La majorité des études porte sur la dégradation de l'α-CGRP, ou ne précise pas la forme utilisée, mais une comparaison entre les isoformes a montré qu'ils sont tous les deux clivés par la MMP2 (**Fernandez-Patron *et al.*, 2000 ; Russo and Hay, 2023**).

IV- Fonctions physiologiques

1- Au niveau cutané

Le CGRP, est l'un des neuropeptides les plus abondants au niveau cutané et est souvent colocalisé avec la SP et la somatostatine (**Gibbins *et al.*, 1987**). Même si une étude de **Hou *et al.* (2011)**, réalisée sur différentes cultures de kératinocytes humain et animal, indique que l'expression de l'ARNm du β-CGRP semble prédominer, il est largement admis dans la littérature que c'est la forme α-CGRP qui est majoritairement présente dans la peau. Les nerfs possédant une immunoréactivité au CGRP sont retrouvés en association avec les kératinocytes, mélanocytes, mastocytes, cellules de Merkel et cellules de Langerhans, ainsi qu'en association avec les muscles lisses et les vaisseaux sanguins (**Roosterman *et al.*, 2006 ; Kim and Granstein, 2021**). Il a été montré que le CGRP stimule la prolifération des cellules HaCaT (**Yu *et al.*, 2009**) et que l'exposition de kératinocytes de rats au CGRP et à la SP stimule leur production de NGF et de médiateurs inflammatoires, tels que l'IL-6 et le TNF-α (**Shi *et al.*, 2013**), avec une activation des MAPKs p38 et ERK1/2 dans les deux cas. De plus, il apparaît que la stimulation par ces neuropeptides entraîne également une augmentation de l'expression de leurs récepteurs et de leur propre sécrétion par les kératinocytes, ce qui suggère de possibles effets autocrines ou paracrines permettant d'amplifier leur signalisation (**Shi *et al.*, 2013**). Les mélanocytes étant anatomiquement associés aux axones présents dans la peau, formant même des zones de contact de type synapse, la libération de CGRP stimule leur prolifération via la voie de l'AMPc (**Hara *et al.*, 1996**). Il semblerait également qu'après exposition à la molécule, les kératinocytes sécrètent des facteurs capables de moduler la croissance, la synthèse de mélanine ainsi que le nombre et la longueur des dendrites chez ces mêmes mélanocytes (**Toyoda *et al.*, 1999**). Ce dernier effet, en particulier, pourrait être influencé par la libération de plusieurs facteurs par les kératinocytes tels que l'endothéline-1, le facteur de croissance basique des fibroblastes (FGF-β), l'α-MSH et la prostaglandine E2, suite à l'exposition au CGRP (**Kim and Granstein, 2021**). Certaines maladies cutanées, telles que la dermatite atopique et le psoriasis, donnent lieu à une différenciation anormale de l'épiderme, une infiltration de cellules inflammatoires et une augmentation de l'innervation cutanée. Cette dernière est notamment associée à une libération accrue de neuropeptides, dont le CGRP, qui va

d'autant plus influencer l'hyperprolifération des kératinocytes et l'épaisseur de l'épiderme. Il a d'ailleurs été démontré qu'*in vitro*, le CGRP favorise la division des cellules souches épidermiques humaines (**Dong *et al.*, 2010**). Combiné à une augmentation de l'expression des composants du récepteur au CGRP chez les kératinocytes atopiques, il semblerait que la molécule joue un rôle clé dans la modulation de la morphogénèse et de la régénération cutanée (**Roggenkamp *et al.*, 2013 ; Russell *et al.*, 2014**).

La découverte du potentiel vasodilatateur du CGRP par **Brain *et al.* (1985)** a été mise en évidence sur la peau par injection intradermique de la molécule, induisant ainsi une dilatation microvasculaire. Il a ainsi été suggéré, qu'en plus de la SP et de la NKA, le CGRP serait un des principaux peptides intervenant dans l'inflammation neurogène et pourrait, en complément de la vasodilatation par influx nerveux classique, avoir un impact sur l'apparition des rougeurs au visage (**Brain and Grant, 2004**). Pour rappel, l'inflammation neurogène correspond à l'ensemble des réponses inflammatoires et microvasculaires causées par la libération de neuropeptides au niveau des terminaisons nerveuses sensorielles périphériques (**Benemei *et al.*, 2009 ; Russell *et al.*, 2014**). La SP étant un promoteur de la perméabilité vasculaire et le CGRP un vasodilatateur extrêmement puissant, la libération de ces peptides entraîne la formation d'œdème, l'augmentation du flux sanguin et le recrutement local de cellules inflammatoires (**Russell *et al.*, 2014 ; Choi and Di Nardo, 2018**). Chez le lapin, la co-injection de CGRP avec des médiateurs tels que l'histamine, la bradykinine, les leucotriènes B4 ou encore l'IL-1, potentialise d'autant plus la formation locale d'œdème et l'accumulation de neutrophiles (**Brain and Williams, 1985 ; Buckley *et al.*, 1991**). Ce neuropeptide est considéré comme un important régulateur du système immunitaire, un point qui sera à nouveau abordé plus loin dans ce Chapitre avec quelques exemples, et qui se traduit également au niveau cutané (**Figure 25**) (**Granstein *et al.*, 2015 ; Kim and Granstein, 2021**). Ainsi, dans le contexte de la peau, il a été montré que le CGRP va par exemple favoriser l'immunité de type Th2 en agissant au niveau des cellules de Langerhans (**Ding *et al.*, 2008**) et peut moduler la fonction des DCs et des LT dans un modèle murin d'hypersensibilité de contact (**Mikami *et al.*, 2011**).

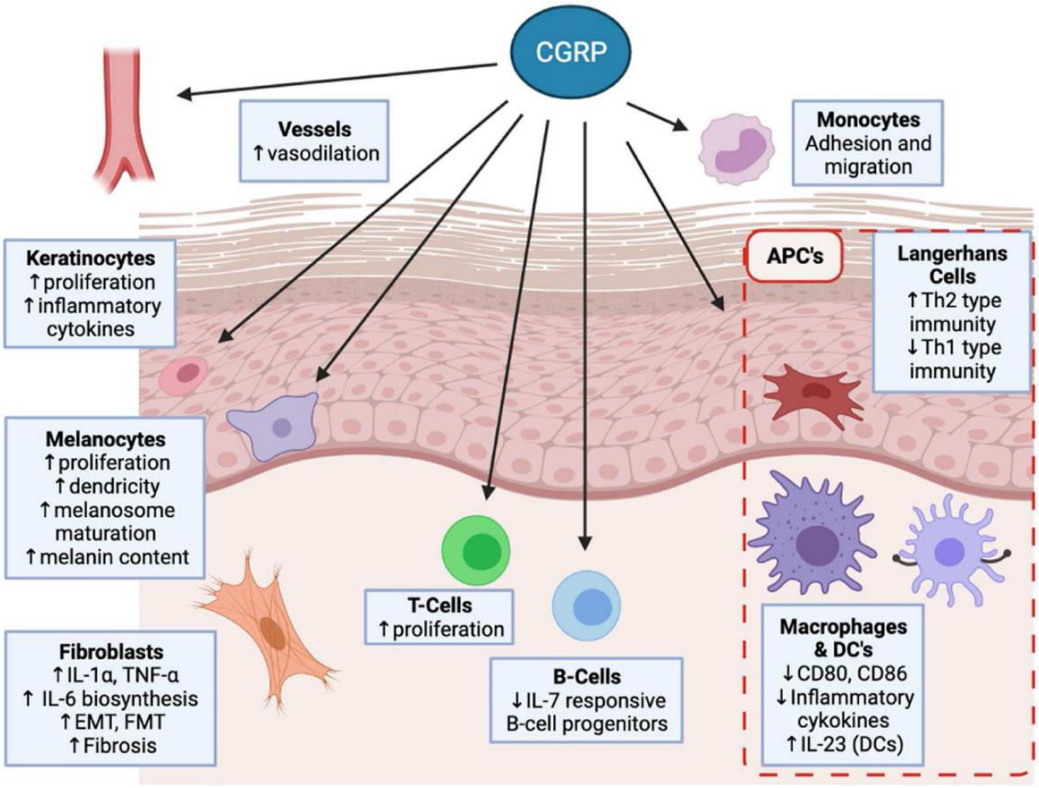


Figure 25 *:* ***Effets du CGRP sur la peau et les vaisseaux sanguins.*** *Le CGRP agit sur les monocytes, les macrophages, les cellules de Langerhans, les cellules dendritiques, les LT, les LB, les cellules endothéliales, les muscles lisses vasculaires et les neutrophiles. De même, il possède une action sur les cellules cutanées telles que les kératinocytes, les mélanocytes et les fibroblastes.* ***EMT*** *: transition épithélio-mésenchymateuse ;* ***FMT*** *: transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes ;* ***APC*** *: cellule présentatrice d'antigène ;* ***LC*** *: cellule de Langerhans ;* ***DC*** *: cellule dendritique (adapté de* ***Kim and Granstein, 2021****).*

Il semblerait enfin que la molécule joue un rôle dans la réparation des tissus et la cicatrisation des plaies. Ainsi, **Toda *et al.* (2008)** ont démontré que des souris délétées du gène codant pour le CGRP (CGRP KO) présentent une déficience dans les processus de fermeture des plaies et d'angiogenèse. Un effet similaire a été obtenu en utilisant l'antagoniste $CGRP_{8-37}$ et il semblerait que l'action du CGRP sur la cicatrisation ne passe pas uniquement par son activité vasodilatatrice mais également par l'augmentation de l'expression des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Cela a déjà été démontré sur la lignée de kératinocytes HaCaT chez laquelle le CGRP régule l'expression des VEGF via la voie de signalisation ERK1/2 MAPKs (**Yu *et al.*, 2006**). Dans une autre étude de **Mishima *et al.* (2011)**, il a été mis en évidence que le CGRP améliore la revascularisation dans un modèle murin d'ischémie (arrêt de la circulation) des

membres postérieurs. Dans ce cas, les souris CGRP KO montrent une altération de la récupération du flux sanguin, une réduction de la densité des capillaires et une diminution de l'expression de facteurs de croissance angiogéniques tels que le CD31, le VEGF-A, le FGF et le facteur de croissance transformant β (TGF-β) dans le tissu ischémique. En plus de favoriser la revascularisation, le CGRP permettrait également de limiter les réactions inflammatoires indésirables (**Zhang *et al.*, 2010 ; Russell *et al.*, 2014**). L'implication du CGRP (mais également de la SP) dans les blessures liées aux brûlures a fait l'objet d'une revue par **Gherardini *et al.* (2009)**. Il semblerait, en effet, que ces neuropeptides jouent un rôle dans l'extravasation plasmatique après lésion thermique chez le rat (**Siney and Brain, 1996**) et ils ont également été détectés à des taux plasmatiques élevés chez des patients hospitalisés pour des brûlures (**Onuoha and Alpar, 2001**).

2- Autres niveaux

Les données de la littérature convergent toutes pour attribuer au CGRP un rôle multifactoriel au sein de l'organisme, avec une implication particulièrement marquée dans la nociception. La présence du peptide, et de ses récepteurs, dans les différentes structures du SNC formant « l'axe de la douleur » (allant de la moelle épinière au cortex cérébrale) en est la preuve. Une revue de **Iyengar *et al.* (2017)** reprends d'ailleurs l'ensemble des informations sur le rôle du CGRP dans la transmission et la modulation de la douleur. En particulier, il est admis que le CGRP contribue à la sensibilisation centrale, une augmentation de la perception de la douleur par modulation de la signalisation neuronale. Cela s'effectue par des mécanismes pré- et post-synaptiques durant lesquels le peptide va se lier à ses récepteurs afin de pouvoir, respectivement, activer les canaux à Ca^{2+} ou augmenter la signalisation glutamatergique au niveau des synapses (**Russo and Hay, 2023**). Le rôle du CGRP dans la migraine, ainsi que la recherche d'antagonistes pour bloquer son activité, font également l'objet de nombreuses publications (**Ho *et al.*, 2010 ; Bigal *et al.*, 2013 ; Russo, 2015 ; Durham, 2016 ; Iyengar *et al.*, 2017 ; Edvinsson *et al.*, 2018**). Ce neuropeptide et ses récepteurs sont en effet retrouvés dans le système trigémino-vasculaire, un élément du SNC essentiel dans la physiopathologie de cette maladie, et il semblerait que la concentration en CGRP dans le sang soit plus élevée au moment des crises de migraine (**Goadsby *et***

***al.*, 1990 ; Eftekhari *et al.*, 2010 ; van Dongen *et al.*, 2017 ; Hay and Walker, 2017**). La perfusion d'α-CGRP chez des personnes souffrant de la maladie peut d'ailleurs déclencher des symptômes imitant une crise de migraine aiguë (**Hay and Walker, 2017 ; Edvinsson *et al.*, 2018**). Il existe plusieurs études cliniques réalisées chez l'humain qui démontrent l'efficacité de molécules antagonistes capables de bloquer l'activité du CGRP, ainsi que d'anticorps monoclonaux dirigés contre le peptide ou un de ses récepteurs, pour la prévention et le traitement de cette maladie (**Olesen *et al.*, 2004 ; Ho *et al.*, 2008 ; Dodick *et al.*, 2014 ; Bigal *et al.*, 2015 ; Sun *et al.*, 2016 ; Hay and Walker, 2017 ; King *et al.*, 2019**). Enfin, le CGRP semble avoir des implications comportementales dans l'anxiété, la peur et l'aversion à la nourriture et à la lumière, ces dernières étant concomitantes avec les réponses à la douleur (**Russo and Hay, 2023**).

En dehors du SNC, le CGRP est libéré par les neurones présents en périphérie sur des cibles allant des vaisseaux sanguins aux cellules immunitaires. Le peptide peut ainsi agir de manière autocrine et paracrine pour stimuler les cellules gliales et les neurones, qui vont à leur tour libérer des molécules de signalisation comme l'oxyde nitrique et des cytokines pour stimuler davantage la synthèse et la libération du CGRP. Il en résulte ainsi une boucle de rétroaction positive contribuant à la sensibilisation périphérique et à l'exacerbation de la douleur (**Russo and Hay, 2023**).

Comme mentionné précédemment, le CGRP est un des plus puissants vasodilatateurs microvasculaires connus, 10 fois plus que les prostaglandines (PGE) et 10 à 100 fois plus que l'acétylcholine et la SP (**Brain *et al.*, 1985 ; Russell *et al.*, 2014**). Il possède également une durée d'action plus longue puisque des injections de l'ordre du picomolaire au niveau de l'avant-bras de sujets sains provoque l'apparition d'érythèmes pour une durée allant jusqu'à 5-6 heures, contre 1-3 heures pour la SP, le VIP, la PGE_2, la prostacycline et l'histamine (**Brain *et al.*, 1986**). Les activités cardiovasculaires du CGRP, ainsi que son implication dans l'hypertension, font déjà l'objet de plusieurs publications et revues (**Brain and Grant, 2004 ; Deng and Li, 2005 ; Smillie and Brain, 2011 ; Kee *et al.*, 2018 ; Argunhan and Brain, 2022**). Localement, le CGRP libéré par les neurones sensoriels périvasculaires active des voies de signalisation dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (VSMC) afin de provoquer leur relaxation. Pour ce faire, le peptide peut lier directement ses récepteurs et activer la voie de l'AMPc et l'ouverture

des canaux K^+ ; ou bien activer des récepteurs présents sur les cellules endothéliales pour libérer de l'oxyde nitrique. Ce dernier entraîne la production de GMPc par les VSMC, ce qui provoque également leur relâchement. Au niveau systémique, le CGRP va avoir des effets protecteurs contre l'hypertension et l'hypertrophie cardiaque et vasculaire, et va également moduler l'inflammation et promouvoir la cicatrisation des plaies, comme évoqué dans la partie précédente sur la peau. Malgré son action puissante sur le système vasculaire, le CGRP ne semble pas jouer un rôle central dans le contrôle homéostatique de la pression artérielle. Il aurait un rôle davantage « compensatoire » permettant de répondre à des conditions pathologiques afin de rétablir des fonctions cardiovasculaires normales (**Brain and Grant, 2004 ; Russo and Hay, 2023**).

Le CGRP est aussi présent dans les voies respiratoires et ses récepteurs sont exprimés sur les cellules de l'artère pulmonaire ainsi que certaines cellules épithéliales et les cellules lymphoïdes innées. Le neuropeptide est également exprimé localement dans les cellules neuroendocrines pulmonaires. Il va pouvoir influencer la sécrétion de fluide par les canaux CFTR et stimuler la production de mucus et la prolifération des cellules basales, ce qui lui confère un rôle protecteur des voies respiratoires contre les infections et les lésions épithéliales. Cependant, combiné à sa capacité à moduler les réponses immunitaires et son implication dans certaines pathologies pulmonaires (l'asthme par exemple), il semblerait que les effets du CGRP peuvent également s'avérer être délétères dans certains cas (**Atanasova and Reznikov, 2018 ; Russo and Hay, 2023**).

Les deux isoformes du CGRP sont sécrétés dans le tractus gastro-intestinal soit par les neurones entériques, soit par ceux issus de la moelle épinière, qui vont innerver aussi bien les vaisseaux sanguins, que les couches de muscles et les muqueuses (**Russo and Hay, 2023**). Parmi les actions les plus notables du CGRP à ce niveau, on retrouve une augmentation de la motilité intestinal (péristaltisme), pour faciliter le mouvement de son contenu, et un impact sur la sécrétion d'eau et d'ions. Par son action vasodilatatrice, le CGRP provoque aussi une augmentation du flux sanguin dans les muqueuses de l'estomac exerçant ainsi une action protectrice (**Ohno *et al.*, 2008 ; Evangelista, 2009**). Plus récemment, celle-ci a été étendue à la production de mucus par les cellules caliciformes, ce qui renforce davantage la barrière intestinale et contribue à la protection contre les colites (**Yang *et al.*, 2022**). Il apparaît enfin qu'en plus de moduler

l'inflammation dans le tractus gastro-intestinal (**Russo and Hay, 2023**), le CGRP peut influencer l'équilibre entre les bactéries commensales et pathogènes, une étude ayant notamment montré son impact positif sur la défense contre l'infection à *Salmonella* (**Lai *et al.*, 2020**).

Le CGRP étant libéré par les fibres nerveuses sensorielles présentes au niveau de la moelle osseuse, du thymus, de la rate et des ganglions lymphatiques, son rôle dans l'immunité ne fait aucun doute. Présentant des activités aussi bien anti- que pro-inflammatoires, ce neuropeptide est également sécrété par les cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes, macrophages, *etc.*) qui, pour beaucoup, possèdent ses récepteurs (**Assas *et al.*, 2014 ; Russo and Hay, 2023**). Le CGRP va ainsi réguler leur activité, par exemple en inhibant la présentation d'antigènes par les cellules de Langerhans (**Hosoi *et al.*, 1993**), en régulant le comportement des LB, en altérant la sécrétion de cytokines et l'adhésion à la fibronectine des LT, en modulant l'activité des DCs ou encore en provoquant la dégranulation des mastocytes pour libérer des médiateurs inflammatoires (**Shepherd *et al.*, 2005 ; Kim and Granstein, 2021 ; Russo and Hay, 2023**). Dans la moelle osseuse, le CGRP va agir sur l'hématopoïèse en augmentant le nombre de granulocytes, monocytes et lymphocytes, ce qui pourrait contribuer à la réponse au stress et/ou aux réponses anti-inflammatoires (**Suekane *et al.*, 2019**). Plus récemment, **Gao *et al.* (2021)** ont mis en évidence que le CGRP entraîne la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques en réponse au facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF) et qu'il va directement promouvoir leur migration par l'intermédiaire de la voie de l'AMPc.

Enfin, d'autres rôles du CGRP incluent son implication au niveau du système reproducteur, du métabolisme et de la prise alimentaire, ainsi que des muscles et de la lipolyse (**Russo and Hay, 2023**). Les différents éléments mentionnés dans cette partie sont résumés sur la **Figure 26**.

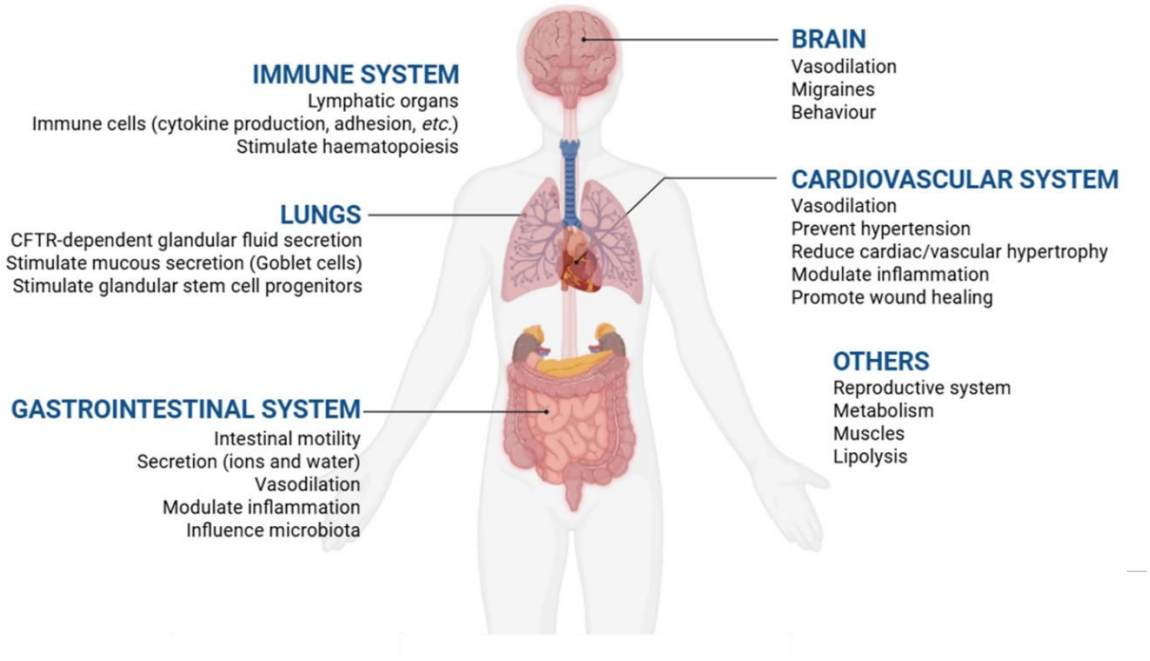


***Figure 26** : **Schéma récapitulatif des effets du CGRP** (https://BioRender.com ; réalisé à partir de la revue de **Russo and Hay, 2023**).*

V- Récepteurs

1- Récepteurs eucaryotes

L'identification et la caractérisation du récepteur au CGRP a longtemps représenté un certain défi du fait de ses particularités par rapport à ce qui a déjà pu être décrit dans le Chapitre 2 pour d'autres neuropeptides.

1. CLR/RAMP1

Il a d'abord été observé que la liaison du CGRP est modulée par la présence de guanine et que l'activation de son récepteur, quel qu'il soit, entraîne une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire. Ces deux éléments ont donc rapidement conduit à l'hypothèse selon laquelle l'action du CGRP s'effectue par liaison à un RCPG (**Russo and Hay, 2023**). C'est ainsi que, dans la première moitié des années 1990, a été mis en évidence le Calcitonin receptor-like receptor (CLR). Il s'agit d'un membre de la classe B des RCPGs, possédant sept domaines transmembranaires, et présentant 56% de similarité de séquence avec le récepteur de la calcitonine (CTR), cette dernière partageant elle-même des acides aminés communs avec le CGRP (**Fluhmann *et al.*, 1995 ; Aiyar *et al.*, 1996 ; Edvinsson *et al.*, 2018**). Ce n'est cependant que plus tard qu'il a été découvert qu'afin d'atteindre la surface cellulaire et de s'insérer dans la membrane pour lier le CGRP, CLR

nécessite la présence d'une protéine accessoire, la Receptor Activity-Modifying Protein 1 (RAMP1) (**Figure 27**) (**McLatchie *et al.*, 1998 ; Edvinsson *et al.*, 2018**).

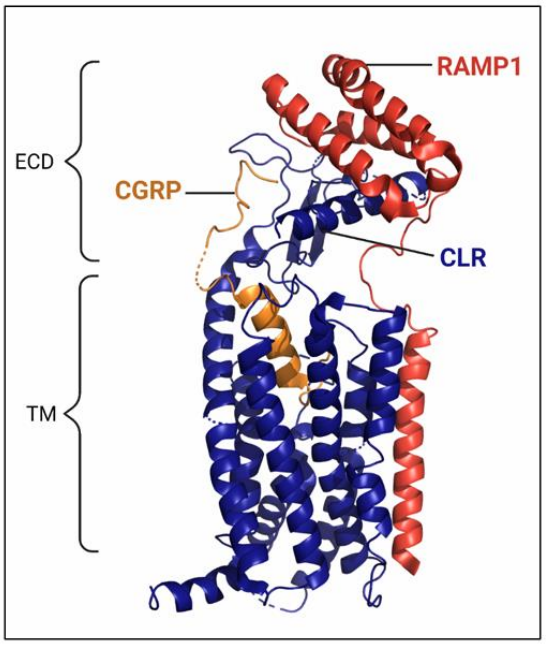


***Figure 27** : **Modèle structural du récepteur CLR/RAMP1 lié au CGRP. ECD** : domaine extracellulaire ; **TM** : domaine transmembranaire (**Russo and Hay, 2023**).*

Les RAMPs sont de petites protéines possédant une longue extrémité N-terminale d'environ 100 acides aminés, un unique domaine transmembranaire, et une courte extrémité C-terminale de 10 acides aminés (**Russell *et al.*, 2014**). Elles ont la capacité de modifier la pharmacologie et la fonctionnalité des RCPGs ainsi que de contrôler leur transport et leur glycosylation. A ce jour, trois d'entre elles sont connues : RAMP1, RAMP2 et RAMP3 (**McLatchie *et al.*, 1998 ; Edvinsson *et al.*, 2018**). Exprimées seuls, les RAMPs sont présentes au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, majoritairement sous forme d'homodimères. Au contraire, lorsqu'elles sont coexprimées avec CLR, elles transloquent dans la membrane plasmique et se stabilisent sous forme de complexes hétérodimériques avec le CLR par l'intermédiaire d'interactions non covalentes (**Hilairet *et al.*, 2001 ; Russell *et al.*, 2014**). Le domaine de liaison au CGRP se situant à l'interface entre CLR et RAMP1, la co-expression des deux protéines est nécessaire pour la transduction du signal et des études ont confirmé une corrélation entre la localisation de CLR, RAMP1 et la présence de CGRP dans les tissus (**Chakravarty *et al.*, 2000 ; Edvinsson *et al.*, 2018 ; Hendrikse *et al.*, 2019**). Ce complexe CLR/RAMP1 est donc reconnu en tant que récepteur de haute affinité au CGRP dans la

littérature et représente la cible principale dans le développement de traitements contre la migraine (**Poyner *et al.*, 2002 ; Hay and Walker, 2017 ; Russo and Hay, 2023**). En complément, la dimérisation de CLR et de RAMP2 crée un récepteur hautement sensible à l'adrénomédulline (récepteur AM1), un peptide apparenté au CGRP, tandis que la liaison à RAMP3 confère un second récepteur de l'adrénomédulline (récepteur AM2) mais qui présente également une certaine sélectivité pour le CGRP (**Russell *et al.*, 2014**). La régulation de la dimérisation des RAMPs avec le CLR en cas de co-expression de plusieurs isoformes n'est pas encore entièrement connue mais il a été suggéré que les RAMPs peuvent entrer en compétition pour cette interaction (**Russell *et al.*, 2014**) et il s'avère que dans les cellules qui coexpriment à la fois RAMP2 et RAMP1, c'est cette dernière qui va préférentiellement se colocaliser avec le CLR pour former le récepteur au CGRP (**Bühlmann *et al.*, 1999**).

Une troisième et dernière protéine, la CGRP-receptor component protein (RCP) (**Luebke *et al.*, 1996**), est également requise pour former un récepteur fonctionnant de manière optimale. Il s'agit d'une petite protéine (17 kDa) hydrophile, associée à la membrane et ne présentant que peu d'homologie avec d'autres protéines connues (**Russell *et al.*, 2014**). Le blocage de la synthèse de RCP n'a aucun effet sur la capacité du CGRP à se lier à son récepteur mais atténue considérablement la conversion de l'ATP en AMPc, confirmant ainsi que cette protéine aide le récepteur à se coupler aux protéines G. Combiné au fait qu'il existe une interaction directe entre RCP et un des domaines intracellulaires de CLR, et que les deux protéines peuvent co-immunoprécipiter, cela confirme que cette association est importante pour favoriser la transduction du signal (**Evans *et al.*, 2000 ; Egea and Dickerson, 2012 ; Russell *et al.*, 2014 ; Edvinsson *et al.*, 2018 ; Russo and Hay, 2023**).

En ce qui concerne le mécanisme de liaison du CGRP au récepteur CLR/RAMP1, il semblerait que l'extrémité C-terminale du peptide se lie au domaine extracellulaire du récepteur. Cela permet de positionner la partie N-terminale du CGRP afin qu'elle puisse également se lier aux boucles extracellulaires et aux faisceaux transmembranaires du récepteur, déclenchant ainsi un changement de conformation et une activation de ce dernier (**Russo and Hay, 2023**). Bien que les RAMPs établissent un contact direct avec le ligand, il semblerait également qu'elles modulent de manière allostérique la

conformation et/ou la dynamique de CLR pour permettre la reconnaissance du CGRP (**Pioszak and Hay, 2020**).

2. CTR/RAMP1

Le Calcitonin receptor (CTR) lie, en principe, la calcitonine. À la suite des premières expériences réalisées pour caractériser ce récepteur, il est apparu que le complexe CTR/RAMP1 et ceux qui lui sont apparentés (CTR/RAMP2 et CTR/RAMP3) peuvent également lier l'amyline, se répandant ainsi dans la littérature sous les noms de récepteur AMY_1 pour Amylin subtype 1 receptor, AMY_2 et AMY_3 respectivement (**Christopoulos *et al.*, 1999 ; Muff *et al.*, 1999 ; Poyner *et al.*, 2002**). Il est connu depuis des années que le CGRP peut lier et activer, même à des concentrations de l'ordre du picomolaire/nanomolaire, le récepteur AMY_1. Le manque d'études approfondies sur le sujet ne permet cependant pas de mesurer entièrement l'importance d'AMY_1 dans la biologie du CGRP (**Hay and Walker, 2017**). Des études moléculaires détaillées sur la liaison du CGRP ont montré de fortes similitudes entre AMY_1 et le récepteur CLR/RAMP1 (**Booe *et al.*, 2015 ; Gingell *et al.*, 2016 ; Hay and Walker, 2017**). Il existe une grande diversité dans cette famille de récepteur du fait du polymorphisme et des variants d'épissage alternatif de CTR, qui donne lieu aux sous-types de AMY_1, AMY_2 et AMY_3. Trois de ces variants humains ont été identifiés et caractérisés pharmacologiquement (**Albrandt *et al.*, 1995 ; Egerton *et al.*, 1995 ; Tilakaratne *et al.*, 2000**). Il semblerait que le CGRP et l'amyline interagissent avec chacun d'entre eux, une fois qu'ils sont liés à RAMP1, mais ces récepteurs peuvent être plus ou moins efficacement activés en fonction du ligand. En effet, chez l'humain, le variant Δ47CT(a), auquel il manque 47 acides aminés à l'extrémité N-terminale, combiné avec RAMP1 forme un récepteur $AMY_{1(a)}$ qui est davantage activé par le CGRP que l'amyline (**Qi *et al.*, 2013 ; Hay and Walker, 2017**). L'impact de ces différents variants CTR en termes physiologique est encore en cours d'étude mais ils pourraient avoir leur importance dans l'activité d'autres peptides que le CGRP, la calcitonine et l'amyline (**Russo and Hay, 2023**).

3. Voies de transduction du signal

La liaison du CGRP sur ces récepteurs entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation et le recrutement ultérieur de nombreux autres effecteurs en aval (**Figure 28**).

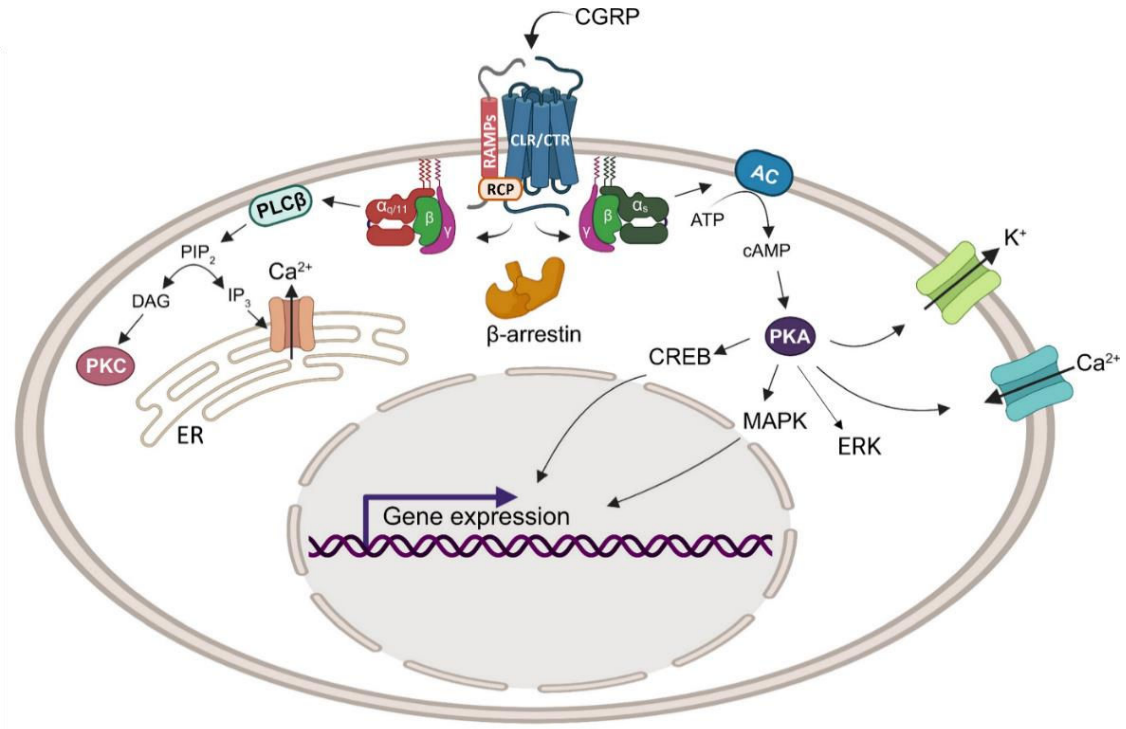


Figure 28 *:* ***Voies de signalisation du CGRP*** *via les récepteurs CLR/RAMPs ou CTR/RAMPs (adapté de* ***Russo and Hay, 2023****).* ***PLCβ*** *: phospholipase C ;* ***PIP₂*** *: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ;* ***DAG*** *: diacylglycérol ;* ***IP₃*** *: inositol triphosphate ;* ***PKC*** *: protéine kinase C ;* ***ER*** *: réticulum endoplasmique ;* ***ATP*** *: adénosine triphosphate ;* ***AC*** *: adénylate cyclase ;* ***cAMP*** *: adénosine monophosphate cyclique ;* ***PKA*** *: protéine kinase A ;* ***CREB*** *: cAMP response element-binding protein ;* ***MAPK*** *: mitogen-activated protein kinases ;* ***ERK*** *: extracellular signal-regulated kinases.*

La voie la plus connue passe par l'activation de la sous-unité Gα couplée au RCPG et donc l'activation de l'adénylate cyclase et l'augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire. Celui-ci active à son tour la PKA qui va phosphoryler de multiples cibles dont des canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}), des kinases régulées par signal extracellulaire (ERK), des MAPKs ou des facteurs de transcription, tels que la cAMP Response Element-Binding protein (CREB). Il existe une autre voie de signalisation médiée par la sous-unité Gαq/11, impliquant l'activation de la PLC-β1, clivant le PIP_2 en IP_3 et DAG. L'IP_3 se lie ensuite à son récepteur sur le réticulum endoplasmique, provoquant la libération de calcium dans le cytoplasme. Le DAG peut activer la PKC qui, à son tour, phosphoryle des protéines en aval. Enfin, il existe des preuves suggérant des voies de signalisation indépendantes des protéines G qui nécessitent la translocation de protéines d'échafaudage telles que les β-arrestines vers le récepteur activé (**Russell *et al.*, 2014 ; Edvinsson *et al.*, 2018 ; Russo and Hay, 2023**). Dans de nombreux cas,

l'activation d'une ou plusieurs de ces voies de signalisation ne peut pas être spécifiquement attribuée aux récepteurs CLR/RAMP1 ou AMY_1. Cela provient du fait que les études sur modèles cellulaires *in vitro* semblent indiquer que les deux récepteurs activent des effecteurs similaires mais ces hypothèses ne sont généralement pas confirmées par des analyses moléculaires qui permettraient de déterminer précisément le récepteur impliqué (**Hay and Walker, 2017 ; Russo and Hay, 2023**).

4. Régulation post-stimulation

L'activation des RCPGs est généralement suivie d'une association avec des G protein-coupled receptor kinases (GRKs) qui phosphorylent les résidus sérine et thréonine sur la partie intracellulaire du récepteur. Cela induit le recrutement de β-arrestines, des protéines essentielles pour atténuer la signalisation cellulaire passant par les RCPGs, et qui vont médier la désensibilisation, l'internalisation et le trafic intracellulaire de ces récepteurs (**Russo and Hay, 2023**). Les PKA et PKC peuvent également effectuer des phosphorylations produisant le même effet (**Drake *et al.*, 1999, 2000 ; Pin and Bahr, 2008**). Une stimulation transitoire par le CGRP induit l'internalisation du récepteur CLR/RAMP1 dans des endosomes, d'où il peut être rapidement recyclé vers la membrane plasmique si nécessaire. Alors qu'on pensait initialement que les RCPGs internalisés étaient inactifs, il semblerait qu'ils soient tout de même capables de promouvoir la signalisation, même une fois dans les endosomes. En revanche, l'exposition chronique au CGRP déclenche un processus qui achemine les récepteurs vers les lysosomes afin d'assurer leur dégradation. L'orientation préférentielle vers l'une ou l'autre de ces voies serait dépendante de la concentration en CGRP mais, celle-ci étant difficile à déterminer pour un site donné, il est impossible à ce jour de savoir comment cela se traduit en termes d'effets physiologiques. Dans le cas du récepteur AMY_1, il semblerait que la régulation après exposition au CGRP se fasse différemment puisque ce récepteur résiste mieux à l'internalisation et la question de la phosphorylation ou du recrutement de β-arrestines dans ce cas se pose encore. Davantage d'études sont nécessaires à ce sujet mais ces différences de régulation entre les deux principaux récepteurs, CLR/RAMP1 et AMY_1, décrits à ce jour pourraient être un mécanisme permettant d'ajuster finement les effets du CGRP en fonctions des cellules et des circonstances physiologiques (**Hilairet *et al.*, 2001 ; Cottrell *et al.*, 2007 ; Edvinsson *et al.*, 2018 ; Russo and Hay, 2023**).

5. Localisation

Approfondir les connaissances sur l'expression et la localisation des récepteurs eucaryotes décrits ci-dessus est essentiel pour comprendre leur importance dans la biologie du CGRP, ainsi que pour mesurer l'efficacité et les effets secondaires éventuels de tout médicament ciblant ce système peptidique (**Hay and Walker, 2017**). La plupart des données de la littérature à ce sujet proviennent d'études utilisant des formes radiomarquées du peptide ou des antagonistes de ses récepteurs. Collectivement, ces études démontrent que, tout comme le peptide en tant que tel, les récepteurs du CGRP sont retrouvés aussi bien au niveau du SNC que dans les tissus périphériques chez divers modèles animaux (**Van rossum *et al.*, 1997 ; Hay and Walker, 2017 ; Russo and Hay, 2023**). Ainsi, les sites comportant une forte densité de récepteurs incluent plusieurs structures cérébrales (cervelet, noyau accumbens, substance noire) ainsi que la moelle épinière, la rate, les oreillettes (cœur) et le canal déférent (testicules). En parallèle, les organes et tissus qui présentent la plus haute affinité de liaison au CGRP sont le cerveau, le cœur, le foie, la rate, les muscles squelettiques, les poumons et les lymphocytes (**Russo and Hay, 2023**). Pour en revenir au contexte cutané en particulier, le récepteur CLR est également retrouvé dans la peau humaine, sur les kératinocytes et fibroblastes, ainsi que sur les muscles lisses et les cellules endothéliales présents dans le derme (**Hagner *et al.*, 2002 ; Albertin *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2011**). La nature dimérique des récepteurs rajoute une couche de complexité supplémentaire pour discuter de leur localisation mais il semblerait qu'il existe globalement une bonne corrélation entre la présence de CLR, CTR, RAMP1 et le CGRP (**Hendrikse *et al.*, 2019 ; Russo and Hay, 2023**).

2- Récepteur bactérien

L'Endocrinologie Microbienne étudie la réponse des microorganismes aux hormones et neurohormones produites par leur hôte. Le Chapitre 2 a été entièrement consacré à cette thématique, décrivant ainsi les interactions entre les catécholamines, les NPs et la SP avec diverses espèces bactériennes. Une étude de **N'Diaye *et al.* (2016b)**, également évoquée précédemment, a mis en évidence que le CGRP est tout aussi capable d'impacter la virulence de *S. epidermidis*. Au vu de la charge et de la structure de la molécule, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'elle ne peut pas diffuser à travers la

membrane et que son action pourrait, de la même manière que pour les autres neurohormones, passer par un senseur bactérien (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). C'est ainsi qu'une expérience de co-immunoprécipitation a permis d'identifier la protéine chaperonne DnaK à partir d'extraits de membrane de *S. epidermidis*. DnaK appartient à la famille des protéines de réponse au choc thermique Hsp70 et est également considérée comme une « moonlighting protein », la littérature lui ayant attribué de multiples rôles, autres que celui de chaperonne (**Amblee and Jeffery, 2015**). Elle est notamment impliquée dans l'adaptation au stress et à l'environnement chez les staphylocoques et peut être exposée à la surface des bactéries afin de servir de récepteur pour les cellules endothéliales (**Hirschhausen *et al.*, 2010**). DnaK possède également une homologie partielle avec la protéine RCP qui fait partie du récepteur eucaryote au CGRP (**N'Diaye *et al.*, 2017**). Il semblerait ici que DnaK, et le senseur Ef-Tu de la SP avec lequel elle est capable d'interagir, soient tous les deux exportés dans le milieu extracellulaire via les canaux MscL et rentreraient de ce fait en compétition (**Racine *et al.*, 2020**). Cela expliquerait l'effet partiellement antagoniste observé sur la cytotoxicité de *S. epidermidis* après exposition à une combinaison de SP et de CGRP (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). L'utilisation du chlorure de gadolinium(III), un inhibiteur des canaux MscL, permet par extension d'inhiber l'effet du CGRP sur la cytotoxicité de *S. epidermidis* (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). Il est à noter que la protéine DnaK (73 kDa) a une taille plus importante qu'Ef-Tu (43 kDa) et que la limite d'exclusion de masse des canaux MscL n'est pas la même chez toutes les espèces bactériennes. Ainsi, on peut supposer que chez *S. epidermidis* ce canal est suffisamment grand pour permettre le passage de DnaK et d'Ef-Tu, mais qu'il est plus petit chez *S. aureus* et ne laisse passer que ce dernier, ce qui pourrait expliquer pourquoi *S. epidermidis* est sensible aux deux peptides alors que *S. aureus* ne réagit qu'à la SP (**Racine *et al.*, 2020**). Il faut également remarquer que les « moonlighting proteins » sont probablement soumises à des modifications post-transcriptionnelles et que celles-ci peuvent varier selon les espèces, les souches, voire selon l'état physiologiques des bactéries, ce qui pourrait expliquer la variabilité des réponses observées (**Feuilloley *et al.*, 2024**).

Pour conclure sur ce chapitre, le CGRP est un neuropeptide multifonctionnel possédant de nombreux effets physiologiques et participant au maintien de l'homéostasie dans

l’ensemble de l’organisme. Une attention particulière a été portée ici sur son implication dans la physiologie de la peau, notamment par ses effets directs sur le fonctionnement des cellules cutanées, la vasodilatation, l’inflammation neurogène et la cicatrisation. Une des caractéristiques principales du CGRP, qui peut s’étendre aux autres membres issus de la même famille de protéines, est la complexité de son récepteur. Etant constitué d’un RCPG (CLR ou CTR) ainsi que des protéines accessoires RAMP1/2/3 et RCP, les différentes combinaisons possibles entre ces éléments entraînent une complexité pharmacologique et un chevauchement entre les activités biologiques de ce peptide (**Russo and Hay, 2023**), notamment avec la calcitonine et l’amyline.

Revue : Interaction of skin-born mediators with the cutaneous microbiota and beyond

Contexte de la revue

Les microorganismes cutanés se développent dans un microenvironnement où les hormones, neurohormones et peptides de défense sont présents en abondance. De ce fait, ils ont développé des stratégies pour détecter les facteurs de l'hôte et adapter ainsi leur physiologie et/ou leur virulence. Plusieurs hormones ont déjà été étudiées dans ce contexte (catécholamines, NPs, SP, CGRP). Cela a conduit à l'identification de protéines, telles que le facteur d'élongation ribosomal Ef-Tu, la protéine chaperonne DnaK ou encore l'enzyme AmiC, qui pourraient agir en tant que senseur bactérien de ces molécules eucaryotes. La revue ci-dessous reprend les éléments évoqués dans l'Introduction et discute également des questions encore en suspens dans le domaine de l'Endocrinologie Microbienne, ainsi que les défis qui y sont associés.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in
Endocrine and Metabolic Research

Reviews

Interaction of skin-born mediators with the cutaneous microbiota and beyond

Marc G. J. Feuilloley[1,2], Emilie Hadjiev[1] and Lanyo J. Amegnona[1]

Cutaneous microorganisms are growing in a microenvironment where skin hormones and neurohormones are present in abundance. These molecules are markers of the host physiology, and microorganisms have developed strategies for detecting host factors that can represent a threat for their survival. Until now, our knowledge of these mechanisms is limited to bacteria, although the skin microbiota also includes an abundance of yeasts, fungi, viruses, and even archaea. Several human hormones and neurotransmitters, including substance P, calcitonin gene-related peptides, natriuretic peptides, catecholamines, and even estradiol have been studied in this context. This was leading to the identification of original proteins, such as the thermo-unstable ribosomal elongation factor, the chaperone DnaK, or the enzyme AmiC, which have been developed by bacteria and have dual functions, in the cytoplasm where they were originally identified and in the bacterial membrane where they act as sensors for host factors. These sensors, designed as moonlighting proteins for their dual functions, are submitted to structural reorganizations and probably post-translational modifications. The occurrence of epigenetic mechanisms in the regulation of moonlighting proteins activity is a source of major complications since similar processes are activated during bacteria adaptation to the host physiology and even storage. Cutaneous bacterial endocrinology is a wide and complex emerging scientific field that requires a deep knowledge of both human and microbial physiology and careful experimental procedures.

Addresses
[1] UR4312 Communication Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses, University of Rouen Normandy, France
[2] Expertise Center Cosmetomics@URN, University of Rouen Normandy, France

Corresponding author: Feuilloley, Marc G.J. (marc.feuilloley@univ-rouen.fr)

Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research 2024, **37:**100545

This review comes from a themed issue on **Microbial Endocrinology**

Edited by **Marc G.J. Feuilloley** and **Olivier Lesouhaitier**

For complete overview of the section, please refer the article collection - Microbial Endocrinology

Available online 22 August 2024

https://doi.org/10.1016/j.coemr.2024.100545

2451-9650/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Keywords
Substance P, CGRP, Natriuretic peptides, Catecholamines, Estradiol, Bacterial sensors, Moonlighting proteins, Skin-bacteria communication.

Introduction

Skin is the largest neuroendocrine organ of the human body [1] and hosts the second largest microbiota in terms of size and diversity [2]. It has been demonstrated that hormones and neurotransmitters are capable of directly affecting the virulence of skin bacteria, which today led to the concept of "Cutaneous Bacterial Endocrinology" [3]. Here, we will review not only what is known but also some of the major questions and sometimes limitations, in regard of this new scientific field and more generally in "Microbial Endocrinology".

Effect of substance P and calcitonin gene-related peptide on cutaneous bacteria

Substance P, the main cutaneous neuropeptide released by type-C sensory terminals, is capable of stimulating the virulence of bacterial species isolated from healthy skin, such as *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, or *Staphylococcus epidermidis* [4,5]. In these studies, the bacteria were exposed to the peptide during their growth phase and were then collected and rinsed before being deposited on cultured keratinocytes (HaCaT cells) or reconstituted human epidermis. Virulence and cell death was quantified by assay of lactate dehydrogenase released following membrane disruption and mitochondrial respiratory activity measurement using the Methyl Thiazolyl Tetrazolium Assay (MTT) test. This effect is observed at nanomolar concentrations and is very specific since the reverse substance-P peptide, *i.e.* the C-N opposite substance-P peptidic sequence, has no effect, as does neurokinin A, the natural ligand for substance-P receptors in humans. Substance P has no effect on the growth of the bacteria but stimulates biofilm formation as well as adhesion to keratinocytes. In the skin, substance P is often coreleased with another neuropeptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP). Tested on *S. aureus* and *S. epidermidis*, this peptide also has no effect on bacterial growth. Surprisingly, it also has no effect on the virulence of *S. aureus*, whereas it is capable of increasing the virulence of *S. epidermidis* by 4, inducing an increase in the release of IL8 by exposed keratinocytes [6]. The response threshold of *S.*

epidermidis to CGRP is very low and of the pico-molar order. The speed of reaction of bacteria to substance P and CGRP as well as the structure of these peptides, which makes them incapable of freely crossing a membrane, has led to postulate the existence of bacterial membrane receptors. These receptors were sought by an immunoprecipitation technique on protein extracts of bacterial membranes using beads coupled to antibodies directed against the peptides studied. The retained proteins were then identified by Matrix Assisted Mass Spectrometry - Time of Flight (MALDI-TOF)/TOF mass spectrometry and nano-Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS). The ligand of substance P was identified as the thermo-unstable ribosomal elongation factor (EfTu) and that of CGRP, the chaperone DnaK, a protein of the Hsp70 heat shock family [4–6]. The EfTu protein has no sequence or structural similarity to the substance P NK1 receptor in humans [7]. On the other hand, it has been observed that this protein, which interacts with ribosomes in a stoichiometric ratio, is produced in bacteria in large excess (4–14 times) [8,9]. These observations suggested that the EfTu may have other functions, and indeed, it has been shown to serve as an adhesin in the proinflammatory response induced by *Lactobacillus johnsonii* [10], as a pathogen-associated molecular pattern in *Agrobacterium tumefaciens* [11], an adhesin for fibronectin in *Mycoplasma pneumoniae*, and *Acinetobacter baumanii* [12,13], a binding protein for factor H and plasminogen in *Pseudomonas aeruginosa* [14], and a receptor for plasminogen in *Bacillus anthracis* [15]. Thus, the EfTu would have 2 different functions: one in the bacterial cytoplasm in association with ribosomes and another in the membrane as a receptor for extracellular proteins or peptides. In fact, EfTu is part of a family of proteins, called *"Moonlighting proteins"* because of their ability to perform two unrelated functions, one in the bacterial cytoplasm and the other in the membrane [16]. The same is true of DnaK, which is a chaperone in the cytoplasm and is exported to the membrane where it binds CGRP [6,7], but its further mechanism of action remains unknown. DnaK has sequence homology with a subunit of the eukaryotic receptor for CGRP, the CGRP receptor component protein [7] and was also identified as a receptor for endothelial cells in *S. epidermidis* [17]. Moonlighting proteins such as EfTu and DnaK have in common that they have distinct roles in the cytoplasm and in the membrane where they are transported when the bacterium is stressed. In general, they combine into multimers but have neither an export signal nor a specific structure [16]. An increase in the binding of EfTu and DnaK to the bacterial membrane was observed after exposure to substance P or CGRP, and electrophysiological study showed that EfTu and DnaK could be exported across the bacterial membrane by a broad conductance mechanosensitive channel of the MscL family [18]. In fact, knockdown of the *mscl* gene, such as blocking these channels with a chemical inhibitor (GdCl3), inhibits the response of bacteria to substance P and CGRP [6]. At the same time, it was demonstrated that substance P would increase the binding of EfTu to liposomes formed from phospholipids from the membrane of *B. cereus* [19]. Bioinformatics modeling revealed that substance P would induce unfolding of the EfTu, its export into the bacterial periplasm through MscL channels, and then its integration into the membrane in the form of octamers [19]. The mode of action of DnaK would also involve its export through the same MscL channels [3].

Effect of natriuretic peptides and catecholamines on cutaneous bacteria

In the skin, cutaneous bacteria are exposed to other neurohormones such as natriuretic peptides or catecholamines.

Natriuretic peptides can be released at the vicinity of skin bacteria associated to the hair follicle, particularly at the level of the bulge that contains an abundance of capillary vessels and nerve terminals. The effect of atrial natriuretic peptide (ANP) and C-type natriuretic peptide (CNP) on biofilm formation by *S. aureus* and *S. epidermidis* was particularly studied by Gannesen et al. [20]. It was remarked that the effects of these peptides was clearly temperature-dependent. At 37 °C in mono-species biofilms, natriuretic peptides stimulated biofilm formation by *S. epidermidis* but had an inhibitory action on *S. aureus*. However, the mean surface temperature of the skin is about 33 °C [21], and at this temperature, natriuretic peptides have an opposite effect and inhibit the biofilm formation activity of *S. epidermidis*. As bacteria live in community in the natural environment, natriuretic peptides were tested on binary biofilms formed by both *S. aureus* and *S. epidermidis*. In basal conditions, *S. aureus* is dominant in regard of *S. epidermidis*, but natriuretic peptides modified this equilibrium and increased the competitiveness of *S. epidermidis* in comparison to *S. aureus*. A similar approach was used to investigate the effect of ANP and CNP in mixed biofilms formed by *S. aureus* and *Cutibacterium* (former *Propionibacterium*) *acnes* [22]. There was again an influence the temperature had on the modulation of bacteria biofilm formation by natriuretic peptides. However, another environmental parameter, oxygen availability, also played a key role. The more striking results was that ANP and CNP provided a competitive advantage to *Cutibacterium acnes* toward *S. aureus* in binary biofilms. As this effect was essentially observed at 37 °C, a temperature that is only measured on the skin surface in inflammatory conditions, it was suggested that the natriuretic peptide should act by promoting biofilm development by the less virulent bacterium (*C. acnes*) in this condition. The receptor for natriuretic peptides was not characterized until now in these bacterial species, but it was demonstrated that in another bacterium, namely *P. aeruginosa*, this receptor is the amidase AmiC,

which is also considered as a moonlighting protein [23]. Orthologs of AmiC are also expressed in *C. acnes* and *S. aureus* [22].

Sympathetic nerve terminals are abundant in the skin, and noradrenalin is one of the major cutaneous neurotransmitters [24,25]. However, cutaneous bacteria can be also exposed to adrenalin originating from blood and capillary vessels, which, as previously mentioned, are particularly abundant around the hair follicle. The concept of endocrine microbiology originates from the observation of the effect of catecholamines on *Escherichia coli* [26], but until now, their impact on cutaneous bacteria was only studied on *C. acnes*. *C. acnes* includes bacteria with very different physiology and requirements [27], and while some strains are clearly associated to acne, other are found exclusively on normal skin and should be protecting the skin from pathogen microorganisms. The effect of catecholamines was studied both on an acneic strain, such as *C. acnes* RT4, and on a nonacneic strain (*C. acnes* RT6) [28]. Catecholamines had no effect on their growth but stimulated biofilm formation by the acneic strain RT4. The effect on the nonacneic strain RT6 was minor. Catecholamines did not modify the intrinsic cytotoxic activity of *C. acnes* on cultured sebocytes but increased sebocytes lipogenesis, particularly in response to noradrenalin, suggesting a potential role of the bacteria as a relay between stress and acnes. The catecholamines receptor protein, QseC, has been characterized in *E. coli* [29], but this protein is not encoded in the genome of *C. acnes*. However, a protein showing homology with QsecC but corresponding to two QseC sequences associated head-to-head, and probably resulting from gene duplication, was found [28]. As QseC, this protein designated as KdpD is a membrane associated histidine kinase and is acting as an osmosensitive K+ channel. *C. acnes* KdpD showed by bioinformatics a high affinity to catecholamines [28]. KdpD is also encoded in the *E. coli* genome, but a binding of adrenalin or noradrenalin on *E. coli* KdpD was never described.

Impact of estradiol on lactobacilles

None of the studies realized until now on steroid hormones, including testosterone, estradiol, progesterone, or pregnenolone, revealed an effect of those hormones on cutaneous bacteria, except in a very peculiar microbiota, the vaginal microbiota. Between puberty and menopause, this microbiota is almost exclusively formed of *Lactobacillus*, but after menopause, *Lactobacillus* is replaced by cutaneous bacteria [30]. This is associated to multiple disorders (pain, itching …) and even diseases [31]. Estradiol was then tested on *Lactobacillus crispatus*, the major vaginal bacterial species [32]. As *C. acnes*, *L. crispatus* is a large species that includes very diverse strains, and this study was realized on two distant strains: CIP and V6 [33,34]. Estradiol has no effect on the growth kinetics of both *L. crispatus* strains. In contrast to CIP, *L. crispatus* V4 showed high aggregation potential, and estradiol promoted this phenotype. Estradiol induced deep changes in cell-surface polarity and acid/base behavior in V4 but had limited impact on CIP surface properties. Conversely, estradiol markedly affected the membrane dynamic of the CIP strain, whereas it was without effect on the V4 strain. However, both strains also had similar responses to estradiol, showing a reduction the mean size, an increase of biosurfactant production, and a higher adhesion to vaginal cells after exposure to the steroid. These observations suggest that 17β-estradiol should be essential in *Lactobacillus* vaginal implantation. For the effects of 17β-estradiol appearing coherent with a signal transduction process, a sensor was investigated by bioinformatics in the CIP-strain genome. This potential sensor, showing high affinity to estradiol (−7.8 kcal/mol) was found as the membrane lipid rafts associated SPFH-domain-containing protein [33].

Complexity and challenges of microbial endocrinology

Bacterial endocrinology, including cutaneous facet, is nowadays an established research field, although the large majority of hormones and neurohormones expressed in the skin remain to be investigated in regard of their potential impact on microorganisms. However, this is not the more fundamental question.

Taking a step back, the first question is if we can actually talk of "Microbial Endocrinology" or should be more restrictive and only refer to "Bacterial Endocrinology". Indeed, many neuropeptides including substance P, CGRP, neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, or galanin-related peptides have antimicrobial activity, generally at high nonphysiological concentrations, against microorganisms including fungi of the genus *Candida* [35,36]. However, that is not indicating that those molecules take part to the dialog with the microbiota. In addition, it is admitted that we are only able to grow a small part of the microbial species [37], and some microorganisms, such as identified in the bladder or blood, have been only described by their genomic signature or sometimes morphology [38,39]. This biological dark matter, that also includes archaea that are estimated to 4.2% of the cutaneous microbiota [40], remains nowadays inaccessible to any experimental study on interactions with host communication molecules.

A second key-point is the permanence of the bacterial sensitivity to human neuroendocrine factors. Indeed, the close relationships between microbiota and the host physiology is the central argument supporting the functional interest for bacteria to express sensors for eukaryotic communication molecules, including moonlighting

proteins. However, bacteria rapidly adapt to their environment and downregulate any unnecessary protein. This question was particularly investigated in pathogens capable of multiplying in different hosts and was leading to the concept of "*Bacterial Polymorphism*" [41]. Major differences in terms of adherence, replication potential, toxins expression, or iron metabolism have been reported between hosts in the same bacterial species such as in *Salmonella*, *Listeria*, *Acinetobacter*, or *Neisseria*. Similarly, a comparison of the spontaneous biofilm formation activity realized over strains of *S. aureus* origination from the environment or recently collected from the skin of human volunteers also revealed the existence of large differences between the two groups (*unpublished industrial report*). Some of those adaptive processes are supported by punctual mutations leading to phenotypic variations [42], a phenomenon that was also observed in the commensal microbiota [43].

However, short-term adaptation processes can be of epigenetic origin and not associated to detectable mutations. This is leading to another interrogation linked to the protocols used for studying the response of bacteria to neurohormones. Indeed, in all studies, bacteria were exposed to the hormone during their growth phase and subsequently rinsed before being allowed to interact with the eukaryotic cells. Neuropeptides are generally poorly stable; in addition, because of their short generation time, many bacterial generations occurred during the explosion period. Then, bacteria collected at the end of the exposure period are not those initially exposed to the hormone, which in addition was probably at least partially degraded during incubation. That is suggesting that the expression of bacterial sensors for human factors results from epigenetic processes. In this regard, it is interesting to note that in bacteria, moonlighting proteins such as EfTu or DnaK are submitted to post-translational modifications including acetylation, trimethylation, phosphorylation, or proline hydroxylation [44,45], and these modifications should be essential for association to the bacterial membrane after EfTu translocation and acquisition of the environmental sensor activity such as substance-P detection [19,46]. This phenomenon can dramatically complexify the study of bacterial endocrinology since; in addition, deep-freezing and freeze-drying techniques, regularly used to store bacterial strains, can provoke by themselves epigenetic and phenotypic variations in the absence of detectable mutations [47,48]. That could explain the differences of response to host factors frequently observed between old library strains and recently collected bacteria. Then, the potential impact of the storage conditions on the capacity of bacterial strains to detect host factors should be consequently considered with the greatest attention.

Conclusion

Microbial endocrinology and bacterial cutaneous endocrinology are very pioneering research topics and, as all scientific fields of this type, require to be investigated very carefully. To plagiarize a joke from a great Microbiologist and good friend, Pr. Michaël S. Dubow, who passed away in 2021, the gene encoding for EfTu is *tuf*, and tough that's hard!

Funding

The author is grateful to the European Union (FEDER), French Ministry of Research, Region Normandie, and Evreux Porte de Normandie for funding.

Editorial Disclosure Statement

Given the role as Guest Editor, Marc G.J. Feuilloley had no involvement in the peer review of the article and has no access to information regarding its peer-review. Full responsibility for the editorial process of this article was delegated to Olivier Lesouhaitier.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The author would like to thanksupported Cosmetic Valley, the world's leading perfumery, and cosmetics network for supporting this work.

References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

* of special interest
** of outstanding interest

1. ** Roosterman D, *et al.*: **Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ**. *Physiol Rev* 2006, **86**: 1309–1379.
A reference review on skin neuroendocrinology and neuropeptides in skin.

2. ** Grice EA, Segre JA: **The skin microbiome**. *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:244–253.
One of the first mapping of the skin microbiota following regions and skin properties.

3. ** Racine P-J, *et al.*: **Dialog between skin and its microbiota: emergence of cutaneous bacterial endocrinology**. *Exp Dermatol* 2020, **29**:1–11.
Key article describing the concept of cutaneous bacterial endocrinology, *i.e.* interkingdom communication between the cutaneous microbiota and skin cells.

4. * Mijouin L, *et al.*: **Effects of a skin neuropeptide (Substance P) on cutaneous microflora**. *PLoS One* 2013, **8**, e78773.
Authors demonstrate for the first time that Substance P, the major neurohormone produced in skin, can modulate the virulence of *Bacillus cereus* following specific binding to the thermo-unstable ribosomal elongation factor EfTu.

5. * N'Diaye A, *et al.*: **Effect of Substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence: implication for skin homeostasis**. *Front Microbiol* 2017, **8**:15.
Authors are extending the concept of bacterial endocrinology to different skin commensal Gram-positive bacterial species.

6. * N'Diaye AR, *et al.*: **Skin-bacteria communication: involvement of the neurohormone calcitonin gene related peptide (CGRP) in the regulation of *Staphylococcus epidermidis* virulence**. *Sci Rep* 2016, **6**, 35379.
Authors show for the first time that CGRP, a neurohormone released with Substance P in skin, can specifically promote *S. epidermidis* virulence after binding to the chaperone protein DnaK.

7. * N'Diaye A, *et al.*: **Substance P and calcitonin gene related peptide (CGRP): key regulators of cutaneous microbiote homeostasis**. *Front Endocrinol* 2017, **8**:1–7.
Authors provide a comparison of Substance P and CGRP bacterial sensors (EfTu and DnaK, respectivel) with their eukaryotic counterparts.

8. Jacobson GR, Rosenbusch JP: **Abundance and membrane association of elongation factor Tu in *E. coli***. *Nature* 1976, **261**:23–26.

9. Beck BD: **Polymerization of the bacterial elongation factor for protein synthesis, EF-Tu**. *Eur J Biochem* 1979, **97**:495–502.

10. Granato D, *et al.*: **Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins**. *Infect Immun* 2004, **72**:2160–2169.

11. Zipfel C, *et al.*: **Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation**. *Cell* 2006, **125**:749–760.

12. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB: **Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae***. *Mol Microbiol* 2002, **46**:1041–1051.

13. Dallo SF, *et al.*: **Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, outer membrane vesicles, and fibronectin**. *Sci World J* 2012, 128705.

14. Kunert A, *et al.*: **Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein**. *J Immunol* 2007, **179**:2979–2988. 2007.

15. Chung MC, *et al.*: ***Bacillus anthracis* interacts with plasminogen to evade C3b-dependent innate immunity**. *PLoS One* 2011, **6**, e18119.

16. ** Amblee V, Jeffery CJ: **Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface**. *PLoS One* 2015, **10**, e0130575.
Authors explain the concept and specificities of "Moonlighting protein" and provide a listing of this family of molecules in eukaryotes and prokaryotes.

17. Hirschhausen N, *et al.*: **A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor**. *Cell Microbiol* 2010, **12**:1746–1764.

18. * Berrier C, Garrigues A, Richarme G, Ghazi A: **Elongation Factor Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli* during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel MscL**. *J Bacteriol* 2000, **182**:248–251.
A precursor but largely ignored article where the roles of EfTu and DnaK in *E. coli* physiology have been investigated for the first time.

19. ** N'Diaye AR *et al.*: Mechanism of action of the moonlighting protein EfTu as a Substance P sensor in *Bacillus cereus*. Sci Rep 9:1304.Authors are unraveling a large part of the mechanism of action of EfTu as Substance P bacterial sensor from its export through MscL channels to its re-association to the membrane.

20. * Gannesen AV, *et al.*: **The new role of human natriuretic peptides: regulation of monospecies and binary biofilms formation of skin *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus***. *Microbiology* 2018, **87**:597–609.
Authors show that natriuretic peptides potentially released in skin can differently modulate the biofilm formation activity of *S. epidermidis* and *S. aureus*.

21. White MD, Bosio CM, Duplantis BN: **Nano FE: human body temperature and new approaches to constructing temperature-sensitive bacterial vaccines**. *Cell Mol Life Sci* 2011, **68**:3019–3031.

22. * Gannesen AV, *et al.*: **Regulation of monospecies and mixed biofilms formation of skin *Staphylococcus aureus* and *Cutibacterium acnes* by human natriuretic peptides**. *Front Microbiol* 2018, **9**:2912.
Authors show that natriuretic peptides can reverse the dominance of two cutaneous bacteria, *S. aureus* and *C. acnes*, in biofilm formation and suggest a potential function in response to inflammation.

23. * Rosay T, *et al.*: ***Pseudomonas aeruginosa* expresses a functional human natriuretic peptide receptor ortholog: involvement in biofilm formation**. *mBio* 2015, **6**, e01033. -15.

24. Gibbins IL: **Autonomic pathways to cutaneous effectors**. In *The autonomic nervous system. Autonomic innervation of the skin*. Edited by Morris JL, Gibbins IL, Amsterdam: Taylor & Francis Harwood Academic Publisher; 1997:1–56.
The first article showing that in *P. aeruginosa*, natriuretic peptides can interact with a specific sensor, AmiC, and modulate the biofilm formation activity essential for pathogenicity.

25. Donadio V, *et al.*: **Skin sympathetic adrenergic innervation: an immunofluorescence confocal study**. *Ann Neurol* 2006, **59**:376–381.

26. * Lyte M: **Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century**. *Trends Microbiol* 2004, **12**:14–20.
The key and fundamental review by the author of the concept of microbial endocrinology, *i.e.* bacteria – eukaryotic cells interkingdom communication.

27. * Borrel V, *et al.*: **Adaptation of acneic and non acneic strains of *Cutibacterium acnes* to sebum-like environment**. *MicrobiologyOpen* 2019, **8**, e00841.
Authors show that the different strains of *C. acnes* associated to skin have heterogeneous surface properties and proteomic profiles which are also dependent of growth conditions.

28. * Borrel V, *et al.*: **Acne and stress: impact of catecholamines on *Cutibacterium acnes***. *Front Med* 2019, **6**:155.
Authors show that *C. acnes* could act as a relay between stress and acne through induction of inflammation after binding of catecholamines.

29. ** Sperandio V, Torres AG, Kaper JB: **Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli***. *Mol Microbiol* 2002, **43**:809–821.

30. Mendling W: **Vaginal microbiota**. *Adv Exp Med Biol* 2016, **902**:86–93.
The demonstration that *E. coli* express a membrane protein, QseC, which is acting as specific catecholamines bacterial receptor.

31. Farage MA, Maibach HI: **Morphology and physiological changes of genital skin and mucosa**. *Curr Probl Dermatol (Basel)* 2011, **40**:9–19.

32. Freitas AC, *et al.*: **Increased richness and diversity of the vaginal microbiota and spontaneous preterm birth**. *Microbiome* 2018, **6**:117.

33. * Clabaut M, *et al.*: **Effect of 17β-estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain**. *Sci Rep* 2021, **11**:7133.
Authors show for the first time that estradiol can modulate the binding of *L. crispatus* to vaginal cells and suggest a potential sensor protein.

34. * Clabaut M, *et al.*: **Variability of the response of human vaginal *Lactobacillus crispatus* to 17β-estradiol**. *Sci Rep* 2021, **11**, 11533.
Authors show that, in spite of surface properties differences, the effect of estradiol on *L. crispatus* is preserved in very distant strains allowing a generalization of the observation.

35. El Karim IA, Linden GJ, Orr DF, Lundy FT: **Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites**. *J Neuroimmunol* 2008, **200**:11–16.

36. Holub BS, *et al.*: **Effects of galanin message-associated peptide and neuropeptide Y against various non-albicans *Candida* strains**. *Int J Antimicrob Agents* 2011, **38**:76–80.

37. Martiny AC: **High proportions of bacteria are culturable across major biomes**. *ISME J* 2019, **13**:2125–2128.

38. Wolfe AJ, *et al.*: **Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder**. *J Clin Microbiol* 2012, **50**:1376–1383.

39. Demirci M, Saribas AS, Siadat SD, Kocazeybek BS: **Blood microbiota in health and disease**. *Front Cell Infect Microbiol* 2023, **13**, 1187247.

40. * Probst AJ, Auerbach AK, Moissl-Eichinger C: **Archaea on human skin**. *PLoS One* 2013, **8**, e65388.
A key article revealing for the first time that archaea are members of the human cutaneous microbiota.

41. Bäumler A, Fang FC: **Host specificity of bacterial pathogens**. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013, **3**:a010041.

42. Rossignol G, *et al.*: **Phenotypic variation in the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032**. *Res Microbiol* 2009, **160**:337–344.

43. * Lieberman TD: **Detecting bacterial adaptation within individual microbiomes**. *Phil Trans R Soc B* 2022, **377**, 20210243.
Authors describe the complex relations of bacteria in microbiomes and their continuous adaptation the host and microenvironment.

44. Vila-Sanjurjo A: Modification of the ribosome and the translational machinery during reduced growth due to environmental stress**.** In: *Cellular and moclecular Biology of E. coli, Salmonella, and the enterobacteriaceae, EcoSal plus* 2013, Lovett ST Ed., Am. Soc. Microbiol., pp 1-15.

45. Rigo MM, *et al.*: **Host expression system modulates recombinant Hsp70 activity through post-translational modifications**. *FEBS J* 2020, https://doi.org/10.1111/febs.15279.

46. Hadjiev *et al.*: Le microbiote cutané au clair de la lune et des étoiles. In: Biologie cutanée CoBiP2022 2023, Haftek M Ed, Matrix Ed, pp 31-40.

47. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS: **Practice and prospects of microbial preservation**. *FEMS Microbiol Lett* 2013, **339**:1–9.

48. Jałowiecki L, *et al.*: **Effect of the freeze-drying process on the phenotypic diversity of *Pseudomonas putida* strains isolated from the interior of healthy roots of *Sida hermaphrodita*: phenotype microarrays (PMs)**. *Cryobiology* 2020, **96**:145–151.

Further reading

1. * Rasmussen T, Rasmussen A: **Chapter 4 : bacterial mechanosensitive channels**. In *Membrane protein complexes: structure and function*. Edited by Harris JR, Boekema EJ, *Subcellular biochemistry,* **87**. Springer Nature Singapore; 2018:83–116.
A reference review on the structure and functions of bacterial membrane mechanosensors.

OBJECTIF DE LA THÈSE

Plusieurs études ont démontré que les bactéries sont capables de détecter un large éventail de molécules de communication et de défense d'origine eucaryote. La peau étant un organe neuro-immuno-endocrinien majeur, de nombreuses hormones et neurohormones y diffusent en permanence, exposant ainsi le microbiote cutané aux facteurs de l'hôte. À la suite de premiers résultats démontrant la sensibilité des bactéries de la peau à la SP, et étant donné la colocalisation entre les deux neuropeptides, le CGRP a fait l'objet d'une étude pour évaluer son impact sur la physiologie et la virulence des staphylocoques cutanés. Ainsi, les travaux de Awa N'Diaye (Thèse 2016) ont montré que le CGRP impact la cytotoxicité, la formation de biofilm et les propriétés de surface de *S. epidermidis* et donc sa capacité à provoquer l'inflammation et la sécrétion de peptides de défense après infection de la lignée de kératinocytes HaCaT. Le mécanisme d'action du CGRP est encore en cours d'étude, mais ces premiers résultats révèlent que le neuropeptide pourrait bien intervenir dans la régulation du microbiote cutané.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans la continuité de cette découverte et ont pour but de poursuivre l'exploration des effets potentiels du CGRP sur la flore bactérienne cutanée. Pour cela, cette étude s'est basée sur un panel de souches isolées de la peau, ainsi que divers paramètres physiologiques ou associés à la virulence, et a permis de mettre en lumière de nouveaux éléments contribuant à mieux comprendre les effets du CGRP sur la composante microbienne de la peau.

Suite à une partie « Matériels et Méthodes », les « Résultats » seront présentés sous la forme de deux articles scientifiques, suivi d'une partie « Résultats complémentaires » qui se focalise sur *P. fluorescens*. Le premier article a été rédigée dans le format du journal « *Research in Microbiology* » et présente les données obtenues sur une souche nouvellement isolée du cuir chevelu d'un volontaire sain, *B. licheniformis* MIC004. Le deuxième article, dans le format « *Microbiology* », vient compléter ces résultats en s'intéressant à l'impact du CGRP sur trois espèces commensales cutanées, *S. capitis*, *M. luteus* et *C. acnes*. Suite à une « Discussion » globale sur l'ensemble des résultats, le manuscrit de thèse se termine enfin par une « Conclusion » et les perspectives qui découlent de ces travaux.

MATÉRIELS & MÉTHODES

I- Souches bactériennes, milieux et conditions de culture

Le nom de l'ensemble des souches bactériennes cutanées sélectionnées pour cette étude, la matrice à partir de laquelle elles ont été isolées, ainsi que les références qui leurs sont associées sont présentés dans le **Tableau 2** :

Tableau 2** : **Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Souche bactérienne	Matrice	Référence
Bacillus licheniformis MIC004	Peau humaine, cuir chevelu	**Collection CBSA**
Pseudomonas fluorescens MFP05	Peau humaine, omoplate	**Hillion *et al.*, 2013**
Micrococcus luteus MFP06	Peau humaine, fosse antécubitale droite	**Hillion *et al.*, 2013**
Staphylococcus capitis MFP08	Peau humaine, omoplate	**Hillion *et al.*, 2013**
Cutibacterium acnes ribotype 4 (RT4) HL045PA1 /HM-516	Peau humaine, nez, souche acnéique	**Fitz-Gibbon *et al.*, 2013**
Cutibacterium acnes ribotype 6 (RT6) HL110PA3/HM-554	Peau humaine, nez, souche non acnéique	**Fitz-Gibbon *et al.*, 2013**

Les souches *Bacillus licheniformis* MIC004, *Micrococcus luteus* MFP06 et *Staphylococcus capitis* MFP08 ont été cultivées en milieu Tryptic Soy Broth (30 g/L TSB, Merck Millipore) tandis que *Pseudomonas fluorescens* MFP05 a été cultivée en milieu Luria Bertani (LB) composé de 10 g/L de tryptone (Thermo Fisher Scientific), 5 g/L d'extrait de levure (Thermo Fisher Scientific) et 5 g/L de NaCl (Thermo Fisher Scientific). Les souches de *Cutibacterium acnes*, dont les noms sont abrégés en RT4 516 et RT6 554, ont été cultivées en milieu Reinforced Clostridial Medium (RCM) dont la composition est la suivante : 13 g/L d'extrait de levure (Thermo Fisher Scientific), 10 g/L de polypeptone peptone (BD Difco), 5 g/L de NaCl (Thermo Fisher Scientific), 3 g/L d'acétate de sodium (NORMAPUR®, VWR), 1 g/L d'amidon (Sigma-Aldrich), 0,5 g/L de L-cystéine hydrochloride (Sigma-Aldrich) et 5 g/L de glucose (Sigma-Aldrich). Les milieux gélosés, en dehors du Tryptic Soy Agar (40 g/L TSA, Merck Millipore), ont été réalisés par ajout de 15 g/L d'agar (Merck Millipore). L'ensemble des milieux a été stérilisé à 121°C pendant 15 minutes par autoclavage.

Toutes les souches, mis à part *C. acnes*, ont d'abord été remises en culture en aérobiose, sur milieu gélosé (TSA ou LB agar), et incubées à la température appropriée pendant 1 à 2 jours en fonction de la vitesse de croissance de chaque bactérie. Ainsi, dans

l'ensemble des manipulations décrites ci-dessous, les bactéries ont été cultivées à 37°C, les seules exceptions concernant *P. fluorescens* et *M. luteus* qui ont été incubées respectivement à 28°C et 30°C. Les précultures ont été ensemencées, à partir d'une seule colonie, dans des tubes Falcon™ contenant 5 mL de milieu de culture (TSB ou LB), sous agitation orbitale à 180 rpm (rotations par minute), pendant une nuit. Les cultures ont par la suite été réalisées par inoculation, à une densité optique à 580nm (DO_{580nm}) de 0,08, dans des tubes remplis de 10 mL de milieu (TSB ou LB). Elles ont ensuite été incubées en aérobie, à la température appropriée, sous agitation orbitale à 180 rpm, jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance de chaque souche.

Dans le cas de *C. acnes*, les souches ont été remises en culture sur un milieu RCM agar et incubées en conditions anaérobie, dans un système BD GasPack™ (Becton Dickinson) ou une station de travail en anaérobiose A35 (Don Whitley Scientific, Bingley, Royaume-Uni), à 37°C pendant 5 jours. Chaque préculture a été ensemencée à partir de plusieurs colonies, dans des tubes Falcon™ contenant 15 mL de milieu RCM (tube plein, sans O_2), à 37°C et en condition statique pendant 2 jours. Les cultures ont ensuite été réalisées par inoculation à une DO_{580nm} de 0,08 dans 15 mL de milieu (tube plein, sans O_2), puis incubées en étuve statique à 37°C jusqu'à la fin de la phase exponentielle de croissance.

II- Peptide

Le peptide utilisé au cours de cette étude est l'isoforme α du Calcitonin Gene-Related Peptide (α-CGRP, numéro CAS 90954-53-3), de formule $C_{163}H_{267}N_{51}O_{49}S_2$, et d'un poids moléculaire de 3789,33 daltons. Il a été commandé auprès de la société TOCRIS (Catalog No. 3012) et mis en suspension dans de l'eau ultrapure stérile (18,2 MΩ) avant d'être aliquoté à une concentration de stockage de 10^{-4} M et conservé à -20°C. Pour l'ensemble des manipulations, le peptide a par la suite été dilué dans le milieu de culture, au moment de l'inoculation, à une concentration finale de 10^{-6} M pour être en accord avec l'étude précédente de **N'Diaye *et al.* (2016b)**.

III- Séquençage et analyses bioinformatiques de *B. licheniformis* MIC004

La souche *B. licheniformis* MIC004, nouvellement isolée à la suite de l'écouvillonnage du cuir chevelu d'un volontaire sain au Centre de Santé Sabouraud (Hôpital Saint-Louis AP-

HP, Paris, France), a fait l'objet d'un séquençage de son génome. Pour cela, l'ADN génomique a été extrait à partir d'une culture à l'aide du kit « GenJET Genomic DNA purification kit » (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) selon les recommandations du fournisseur. Une quantification des échantillons obtenus a été réalisée avec un fluoromètre QuBit 4.0 et le kit « ds-DNA high-sensitivity » (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis). Le séquençage a été effectué sur la plateforme Illumina MiSeq (UR4312 CBSA, Université de Rouen Normandie, Evreux, France) à l'aide du kit « Reagent v3 » (Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis) en suivant les recommandations du fabricant. Les données brutes obtenues ont été nettoyées avec Trimmomatic v.0.39 (**Bolger *et al.*, 2014**) et la qualité des fragments a été vérifiée en utilisant FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). L'assemblage du génome et le contrôle qualité de celui-ci ont été effectués respectivement via Unicycler v.0.5.0 (**Wick *et al.*, 2017**) et Quast v.5.0.2 (**Gurevich *et al.*, 2013**). Cela a permis l'identification de la présence de deux plasmides, nommés pL1 (9113 paires de bases ou pb) et pL2 (25 414 pb), qui a par la suite été confirmée via PlasmidID v.1.6.5 (https://github.com/BU-ISCIII/plasmidID). Une première analyse effectuée sur fastANI v.1.34 (**Jain *et al.*, 2018**), et permettant de calculer l'Average Nucleotide Identity (ANI) de l'isolat MIC004, a démontré que cette souche possède 99,92% de similarité avec la souche de référence *B. licheniformis* ATCC14580^{T}.

Une autre analyse, cette fois-ci de Multi-Locus Sequence Typing (MLST), a été réalisée à partir des données disponibles pour 265 isolats de *B. licheniformis* dans la base de données PubMLST (https://pubmlst.org/), en utilisant MLST v.2.23.0 (https://github.com/tseemann/mlst). L'analyse de six gènes de ménage (*adk*, *ccpA*, *recF*, *rpoB*, *spoOA* et *sucC*) a révélé la présence d'un nouvel allèle pour le gène *recF*, assignant ainsi un nouveau Sequence Type (ST59) à la souche *B. licheniformis* MIC004. En parallèle, l'annotation fonctionnelle (Bakta v.1.9.3 ; **Schwengers *et al.*, 2021**), la recherche de clusters de gènes responsables de la biosynthèse de métabolites secondaires (AntiSMASH v.7.1.0 ; **Blin *et al.*, 2021**) ainsi que l'identification de potentiels gènes de virulence/résistance aux antibiotiques (PanVita ; **Rodrigues *et al.*, 2023**) ont également été réalisées. Enfin, des représentations circulaires du chromosome, ainsi que des deux

plasmides de la souche *B. licheniformis* MI004, ont été obtenues via pyCirclize v.1.9.0 (https://github.com/moshi4/pyCirclize).

IV- Physiologie bactérienne

1- Suivi de croissance

Un suivi de croissance a été réalisé, en présence et en absence de 10^{-6} M de CGRP, pour l'ensemble des souches. Dans le cas de *B. licheniformis* MIC004, *P. fluorescens* MFP05, *M. luteus* MFP06 et *S. capitis* MFP08, les cultures ont été inoculées à une DO_{580nm} initiale de 0,08, dans 200 µL de milieu (TSB ou LB) et dans une plaque 96 puits en polystyrène à fond plat (Thermo Fisher Scientific). Elles ont ensuite été incubées dans un lecteur de microplaque multimodal thermostaté (Bioscreen C Oy Growth Curves Ab Ltd., Turku, Finlande ou Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse), à la température appropriée, pendant 24 à 48h (pour *M. luteus*), et sous rotation constante. La DO_{580nm} a été mesurée automatiquement par l'appareil toutes les 15 minutes sur la durée d'incubation. Dans le cas de *C. acnes* RT4 516 et RT6 554, les bactéries ont été cultivées en anaérobiose, dans des conditions statiques et du milieu RCM avec ou sans CGRP à 10^{-6} M, puis étalées à plusieurs reprises sur milieu gélosé pendant une période d'incubation de 72 h à 37 °C. Un comptage du nombre de colonies obtenues après 24 h d'incubation des boîtes de Pétri a permis de calculer le nombre d'UFC/mL (Unité Formant Colonie/mL) pour chaque point. Toutes les courbes de croissance ont ensuite été déterminées à partir de trois expériences indépendantes.

2- Formation de biofilm en condition statique

1. Par la technique de coloration au Cristal Violet

L'étude de la formation de biofilm par *B. licheniformis* MIC004 et *P. fluorescens* MFP05 a été réalisée dans des microplaques 96 puits en polystyrène à fond plat (Thermo Fisher Scientific). Pour cela, après une préculture d'une nuit, les bactéries ont été cultivées dans 200 µL de milieu TSB ou LB (avec ou sans CGRP à 10^{-6} M), à la température appropriée et dans une étuve statique. A la fin du temps d'incubation, le milieu de culture a été retiré et les puits ont été lavés deux fois avec de l'eau physiologique stérile (EPS ; 9 g/L de NaCl, Thermo Fisher Scientific ; pH 7) afin d'éliminer toutes traces de milieu et de cellules planctoniques. Les biofilms ont ensuite été colorés avec une solution de Cristal Violet (Sigma-Aldrich) à 0,1%, pendant 15 minutes et à température ambiante. Après

avoir effectué 3 rinçages minimum avec de l'eau ultrapure (18,2 MΩ), la plaque a été séchée à 37°C pendant 30 minutes puis le Cristal Violet a été resolubilisé avec une solution d'acide acétique (Merck Millipore) à 30%. Une mesure de DO à 595 nm a été effectuée sur un lecteur de microplaque multimode (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse) et les résultats ont ensuite été représentés à partir de 3 expériences indépendantes.

2. Par la technique de microscopie confocale à balayage laser

Les biofilms de l'ensemble des souches présentées dans le **Tableau 2** ont été formés en plaque 24 puits en verre à fond plat et à parois noires (Sensoplate, Greiner Bio One, Allemagne), conçues pour l'observation au microscope confocal à balayage laser. Les cultures bactériennes ont été réalisées par ensemencement à DO_{580nm} de 0,08 dans 10 mL (TSB ou LB) ou 15 mL (RCM) de milieu de culture, incubation à la température appropriée, en aérobie ou anaérobie (pour *C. acnes)*, sous agitation orbitale à 180 rpm ou en statique (pour *C. acnes*), jusqu'à atteindre la fin de la phase exponentielle de croissance. Par la suite, les cultures ont été centrifugées à 7500 x g pendant 10 minutes à température ambiante et deux lavages avec 5 mL d'EPS ont été réalisés dans les mêmes conditions de centrifugation pour enlever toutes traces de milieu de culture. La DO_{580nm} a été ajustée à 0,1 en EPS puis 300 µL de suspension ont été ensemencés dans la plaque. Celle-ci a ensuite été incubée à la température appropriée pour chaque souche, en présence d'O_2 ou en BD GasPack™ (pour *C. acnes*), et dans une étuve statique pendant 2 heures afin de permettre l'adhésion initiale des bactéries. Suite à cela, l'eau physiologique a été remplacée par 0,5 mL ou 1 mL (pour *C. acnes*) du milieu de culture approprié (avec ou sans CGRP à 10^{-6} M) et la plaque a été incubée pour 22 h, 46 h (pour *M. luteus*) ou 70 h supplémentaires (pour *C. acnes*). Les puits de la plaque ont ensuite été rincés deux fois avec 300 µL d'EPS puis le biofilm a été marqué avec 5 µM de SYTO™ 9 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) pendant 15 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. Le SYTO™ 9 a été remplacé par 300 µL d'EPS et la coloration a été fixée par ajout d'une goutte de ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

L'ensemble des observations a été effectué à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser LSM710 (Zeiss, Allemagne) en utilisant l'objectif x63 à immersion à l'huile. Les

biofilms ont été visualisés par détection de la fluorescence du SYTO™ 9 à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 485 nm et 495-550 nm respectivement. En tout, ce sont 7 prises de vues par puits qui ont été réalisées dans toute l'épaisseur du biofilm avec un pas de 0,65 µM, puis les images tridimensionnelles ont été reconstituées à l'aide du logiciel Zen 2.1 (Zeiss, Allemagne). L'adhésion initiale, ainsi que le biovolume bactérien ($\mu m^3/\mu m^2$), l'épaisseur moyenne (µm) et le coefficient d'hétérogénéité du biofilm mature ont été déterminés à l'aide des logiciels ImageJ (**Schneider *et al.*, 2012**) et Comstat2 (www.comstat.dk ; **Heydorn *et al.*, 2000 ; Vorregaard, 2008**).

3- Test de susceptibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques de *B. licheniformis* MIC004, exposée ou non à 10^{-6} M de CGRP, a été étudiée en milieu Mueller Hinton (MH, Becton Dickinson) selon les recommandations du Comité Européen pour les Essais de Sensibilité aux Antimicrobiens (EUCAST) pour l'année 2023. Pour cela, les bactéries ont été inoculées à une concentration initiale de 5 x 10^5 UFC/mL dans 200 µL de milieu TSB, avec ou sans 10^{-6} M de CGRP, et dans une plaque 96 puits en polystyrène à fond plat (Thermo Fisher Scientific). Huit antibiotiques ont été testés, sur la base des listes standard et complémentaire de l'EUCAST pour le genre *Bacillus* : Norfloxacine, Ciprofloxacine, Clindamycine, Méropénem, Linézolide, Vancomycine, Erythromycine et Rifampicine. Tous les antibiotiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich et mis en solution dans le solvant approprié et selon les recommandations du fournisseur. La gamme de concentration a été réalisée par dilution en série afin d'être comprise entre 64 µg/mL et 0,125 µg/mL pour tous les antibiotiques, à l'exception de la Clindamycine (256 µg/mL à 0,5 µg/mL). Les plaques ont été incubées à 37°C, pendant 24 h, dans une étuve statique. À la fin de l'expérience, 25 µl de résazurine (Thermo Fisher Scientific) à 0,5 % ont été ajoutés aux puits et la plaque a été incubée pendant 2 heures supplémentaires, à température ambiante, pour permettre la coloration. Les cellules viables apparaissent ainsi en rose, tandis que les puits n'ayant donné lieu à aucune croissance bactérienne restent bleus. Les résultats ont été représentés à partir de 3 expériences indépendantes.

V- Étude de la virulence sur la lignée cellulaire HaCaT

1- Culture des kératinocytes HaCaT

Dans cette étude, la lignée cellulaire HaCaT (Cell Line Services, Eppelheim, Allemagne) a été choisie pour évaluer la virulence de *B. licheniformis* MIC004 et *P. fluorescens* MFP05. Il s'agit d'une lignée continue de kératinocytes aneuploïdes spontanément transformés provenant de la peau humaine adulte. Les cellules ont été cultivées dans des flasques Nunc™ EasYFlasks™ de 25 mL (Nunclon™ Delta Surface, Thermo Fisher Scientific) contenant 10 mL de milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X (DMEM 1X, Gibco) avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, MP Biomedicals) et 1% d'un mélange d'antibiotiques (Pénicilline et Streptomycine). Les flasques ont été incubées à 37°C, en étuve statique, avec un apport continu de 5% de CO_2. Une fois les kératinocytes arrivés à confluence (entre 80% et 100% de cellules formant une monocouche sur la surface de la flasque), des passages ont été réalisés. Pour cela, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées délicatement avec 5 mL d'une solution Phosphate Buffer Saline 1X (PBS 1X, Dutsher). Elles ont ensuite été décollées par traitement enzymatique avec 2 mL de trypsine (Sigma-Aldrich) et incubation à 37°C, 5% de CO_2, pendant 15 minutes. L'action de l'enzyme a été stoppée par l'ajout d'un volume équivalent de milieu DMEM complet (avec SVF et antibiotiques) et la suspension cellulaire a été centrifugée à 1500 rpm, pendant 2 minutes. Le culot obtenu a été resuspendu dans du DMEM complet et les cellules ont été réensemencées avec un ratio 1 : 10 dans une nouvelle flasque. Cette opération a été réalisée deux fois par semaine, à 3 jours d'intervalle.

2- Numération des cellules HaCaT

Afin de pouvoir ensemencer des plaques 24 puits à une concentration cellulaire précise, permettant de réaliser les différents tests décrits ci-dessous, un dénombrement des HaCaT sur cellule de Neubauer a été réalisé. Des cellules ayant atteint 80% de confluence, dans une plaque 24 puits, ont été rincées avec 1 mL de tampon PBS 1X puis décollées par ajout de 200 µL de trypsine dans 6 puits. Après incubation à 37°C pendant 5 minutes, la réaction a été stoppée avec 200 µL de milieu DMEM complet et les suspensions ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 2 minutes. Le culot a ensuite été resuspendu dans 1 mL de milieu et 10 µL ont été déposés sur la cellule de comptage

avant observation au microscope optique, objectif x100. En tout, 5 grands cadres ont été comptés et la concentration cellulaire a été déterminée grâce au calcul suivant :

$$Nombre\ de\ cellules\ par\ mL = \frac{\text{Nombre de cellules dans 5 cadres x 10 000}}{5} \text{x dilution éventuelle}$$

Le résultat obtenu a permis, par la suite, d'ajuster la concentration en bactéries nécessaire pour effectuer les infections à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 50 (soit cinquante cellules bactériennes pour une cellule humaine).

3- Etude de cytotoxicité

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique stable présente dans de nombreux types cellulaires. Si les kératinocytes perdent leur intégrité membranaire, la LDH est libérée dans le milieu de culture. Son activité peut alors être quantifiée par une réaction enzymatique couplée pendant laquelle la LDH catalyse la conversion du lactate en pyruvate, via la réduction du NAD+ en NADH, qui est ensuite utilisé pour réduire le sel de tétrazolium INT en formazan (**Figure 29**). Par mesure spectrophotométrique à 490 nm, il est ainsi possible de mesurer la formation de formazan (couleur rouge), qui est proportionnelle à la quantité de LDH libérée dans le milieu, et permet donc une mesure indirecte du taux de mortalité cellulaire.

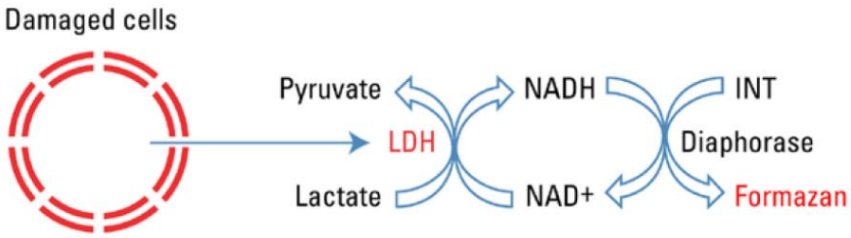


Figure 29 : Schéma de la réaction obtenue lors de l'utilisation du kit de cytotoxicité CyQUANT™.

Les cellules HaCaT ont été cultivées en plaques 24 puits (Nunclon™ Delta Surface, Thermo Fisher Scientific) jusqu'à atteindre 80% de confluence. Le jour de la manipulation, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées délicatement avec 1 mL de PBS 1X afin d'enlever toute trace de milieu DMEM complet. L'infection a été réalisée à une MOI 50 avec 1 mL de bactéries (témoins et traitées avec 10^{-6} M de CGRP) récupérées en fin de phase exponentielle, lavées à l'EPS, et resuspendues dans du milieu DMEM seul, sans SVF ni antibiotiques. Les plaques ont été incubées pendant 16 h, à

37°C, en présence de 5% de CO_2. Des dosages de la quantité de LDH libérée par les cellules ont été réalisés à 2 h et 16 h d'incubation, avec le kit « CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay » (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) et selon les instructions du fournisseur. Le témoin positif, correspondant à 100% de lyse cellulaire, a été obtenu par ajout du tampon de lyse fourni par le kit tandis que le témoin négatif a consisté en l'ajout de milieu DMEM seul. Les pourcentages relatifs de cytotoxicité ont ensuite été calculés par rapport à ces témoins. Plusieurs tests indépendants ont été réalisés pour *B. licheniformis* MIC004 et *P. fluorescens* MFP05. Des contrôles utilisant uniquement les bactéries ont montré que les souches MIC004 et MFP05 ne produisent pas de métabolites interférant avec le test LDH (*données non présentées*).

4- Dosage de l'interleukine 8 (IL-8)

La réponse inflammatoire des cellules HaCaT, à la suite de l'infection avec *P. fluorescens* MFP05, a été évaluée par dosage de la libération d'IL-8 à l'aide du kit « Human IL-8 ELISA Kit » (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Après 2 h ou 16 h d'infection, à une MOI 50, avec la bactérie prétraitée ou non avec 10^{-6} M de CGRP, 200 µL de surnageant de culture ont été prélevés dans chaque puits et stockés à -20°C. Le dosage a ensuite été effectué selon les recommandations du fournisseur et a permis, grâce à la réalisation d'une gamme d'étalonnage fournie par le kit, de calculer la quantité d'IL-8 libérée. Plusieurs expériences indépendantes ont été réalisées.

VI- Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide d'un test de student (https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/). Les moyennes et l'Erreur Standard de Mesure (SEM) ont été calculées et représentées graphiquement.

VII- Etude transcriptomique

1- Analyse des transcriptomes bactériens

Pour évaluer l'impact du CGRP sur la transcription des gènes bactériens, les souches *B. licheniformis* MIC004, *M. luteus* MFP06, *S. capitis* MFP08, *C. acnes* RT4 516 et *C. acnes* RT6 554 ont fait l'objet d'une analyse transcriptomique. Pour cela, les bactéries ont été cultivées (avec et sans 10^{-6} M de CGRP) dans les conditions appropriées pour chaque espèce (décrites précédemment) jusqu'en fin de phase exponentielle. La quantité de

cellules bactériennes a été ajustée dans un intervalle allant de 10^6 à 10^8 cellules et les culots récupérés par centrifugation à 7500 x g, pendant 10 minutes, ont été conservés à -80°C en attendant d'être envoyés, pour le séquençage, chez la société Genewiz.

Brièvement, et d'après les informations transmises par le prestataire, les ARN totaux ont été extraits à partir des culots de bactéries (témoins et traitées avec 10^{-6} M de CGRP) à l'aide du kit « RNeasy Plus Mini kit » (Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur. Une quantification a été réalisée au fluoromètre Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et l'intégrité des ARN a été vérifiée avec un appareil 5600 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, Californie, Etats-Unis). Les ARN ribosomaux ont été déplétés à l'aide du kit « NEBNext rRNA Depletion Kit for Bacteria » (NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis) puis les librairies de séquençage ont été préparées avec le kit « NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina » (NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis) en suivant les recommandations du fournisseur. Après vérification de la qualité des librairies (« DNA Kit » ; Agilent 5600 Fragment Analyzer) et de la concentration (Fluoromètre Qubit 4.0 ; Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis), le séquençage a été réalisé sur un appareil Illumina NovaSeq en utilisant une configuration de lectures appariées de 2 x 150 pb.

Le traitement des données de séquençage obtenues a été réalisé avec le soutien du Dr. Amine Boukerb (UR4312 CBSA, Université de Rouen Normandie, Evreux, France). Brièvement, les données brutes ont été alignées sur le fichier d'annotation GTF (General Transfert Format) de la souche MIC004, obtenu sur Bakta (voir point III- Analyses bioinformatiques), à l'aide du logiciel Hisat2 v.2.2.1 (**Kim *et al.*, 2019**). Après avoir trié et indexé les données (SAMtools v.1.21 ; **Danecek *et al.*, 2021**), une quantification du nombre de lectures pour chaque gène a été réalisée à l'aide de featureCounts dans l'outil subread v.2.1.1 (**Liao *et al.*, 2014**), en utilisant le même fichier d'annotation GTF. Les données obtenues ont ensuite été importées sur le logiciel R v.4.3.1 (https://www.R-project.org.) et l'analyse a été poursuivie avec l'outil DESeq2 v.1.42.1 (**Love *et al.*, 2014**). Une quantification de l'expression différentielle de chaque gène a été réalisée en comparant les échantillons témoins (bactéries seules) aux échantillons traités (bactéries exposées à 10^{-6} M de CGRP). Les gènes présentant un Fold Change (FC) supérieur à 1,5 et une p-value ajustée inférieure à 0,05 ont été considérés comme étant

différentiellement exprimés de manière significative. Le nom des protéines codées par chaque gène a été récupéré dans la base de données NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Les résultats proviennent de trois expériences indépendantes.

2- Analyse du transcriptome des cellules HaCaT

Pour évaluer l'impact du CGRP sur le processus infectieux de *B. licheniformis* MIC004, une analyse transcriptomique a été réalisée sur les ARNm totaux des cellules HaCaT seules et après infection avec la bactérie. Les cellules ont été infectées à une MOI 50 et dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (voir V-3- Etude de cytotoxicité). Après 2 h d'infection, le surnageant a été retiré et 200 µL de trypsine (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés dans tous les puits de la plaque. Deux périodes d'incubation de 5 minutes, en étuve statique (37°C et 5% de CO_2) ont été entrecoupées d'un mélange rapide, par flux et reflux, de chaque puits afin de décoller le maximum de cellules. La réaction enzymatique a été stoppée par ajout d'un volume équivalent de milieu DMEM complet et les suspensions ont été récupérées dans un tube Falcon™ puis centrifugées une première fois, à 2000 rpm pendant 5 minutes, et à 4°C. La majorité du surnageant a été enlevée avant de réaliser une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. En parallèle, la quantité de cellules HaCaT récupérées a été comptée par dépôt de 10 µL de suspension sur cellule de Neubauer afin d'être certain de se situer dans un intervalle de 10^4 à 10^6 cellules. Les culots ont été conservés à -80°C en attendant d'être envoyés pour séquençage. Un témoin consistant à effectuer la même opération, mais en incubant les cellules HaCaT uniquement avec du milieu DMEM seul, a également été réalisé.

Les ARN totaux ont été extraits à partir des culots (HaCaT seules ou HaCaT infectées avec des bactéries témoins et traitées au CGRP) à l'aide du kit « RNeasy Mini kit » (Qiagen, Hilden, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur. Une quantification a été réalisée au fluoromètre Qubit 4.0 (Life Technologies, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) et l'intégrité des ARN a été vérifiée avec le « RNA Kit » de l'appareil 5300 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, Californie, Etats-Unis). Les ARN ribosomaux ont été déplétés à l'aide des kits « NEBNext rRNA Depletion Kit for Bacteria » et « NEBNext rRNA Depletion Kit for Human/Mouse/Rat » (NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis) puis les librairies de séquençage ont été préparées à l'aide du kit « NEBNext Ultra II

Directional RNA Library Prep Kit » (NEB, Ipswich, Massachusetts, Etats-Unis) en suivant les recommandations du fournisseur. Après vérification de la qualité des librairies (« NGS Kit » ; Agilent 5300 Fragment Analyzer) et de la concentration (Fluoromètre Qubit 4.0 ; Invitrogen, Carlsbad, Californie, Etats-Unis), le séquençage a été réalisé sur un appareil Illumina NovaSeq X Plus en utilisant une configuration de lectures appariées v1.5 de 2 x 150 pb.

Pour le traitement des données de séquençage, les données brutes ont été alignées sur le génome humain de référence GRCh38 (NCBI Genome, accès le 3 avril 2025) en utilisant STAR v.2.7.11b (https://github.com/alexdobin/STAR) et en conservant les paramètres par défaut. Après avoir trié et indexé les données (SAMtools v.1.21 ; **Danecek *et al.*, 2021**), une quantification du nombre de lectures pour chaque gène a été réalisée à l'aide de featureCounts dans l'outil subread v.2.1.1 (**Liao *et al.*, 2014**). Les données obtenues ont ensuite été importées sur le logiciel R v.4.3.1 (https://www.R-project.org.) et l'analyse a été poursuivie avec l'outil DESeq2 v.1.42.1 (**Love *et al.*, 2014**). Une quantification de l'expression différentielle des gènes a été réalisée en comparant les échantillons de cellules HaCaT seules ou infectées avec *B. licheniformis* MIC004 prétraitées ou non avec 10^{-6} M de CGRP. Les gènes présentant un FC supérieur à 1,5 et une p-value ajustée inférieure à 0,05 ont été considérés comme étant différentiellement exprimés de manière significative. Le nom des protéines codées par chaque gène a été récupéré dans la base de données NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Ces résultats proviennent de trois expériences indépendantes.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Contexte de l'Article 1

Les travaux précédents ont démontré que des neurohormones humaines, telles que les catécholamines, les NPs et la SP sont capable d'agir sur la physiologie et la virulence des bactéries de la peau (**Racine *et al.*, 2020**). Dans ce contexte, il a été mis en évidence que le CGRP stimule la virulence d'une souche cutanée de *S. epidermidis* (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). Cette molécule étant présente en quantité importante dans la peau, et particulièrement au niveau des follicules pileux, il a été décidé d'évaluer son impact sur la souche *Bacillus licheniformis* MIC004, nouvellement isolée à partir du cuir chevelu d'un volontaire sain. Grâce à des approches de séquençage, de physiologie bactérienne et de culture cellulaire, nous avons mis en évidence que *B. licheniformis* possède un profil typique d'un microorganisme commensal, avec une absence de toxines ou de gènes de résistance aux antibiotiques dans son génome, ainsi qu'une faible cytotoxicité. Bien que le CGRP ne semble pas influer sur ces paramètres ou sur la physiologie de la bactérie, et n'induit aucune modification de l'expression des gènes chez notre isolat, une étude transcriptomique réalisée sur la lignée cellulaire HaCaT, après infection par *B. licheniformis*, a montré que le neuropeptide renforce encore davantage l'activité pro-inflammatoire de la bactérie et, potentiellement, sa capacité à altérer l'intégrité des kératinocytes. La diversité de métabolites secondaires codés dans le génome de *B. licheniformis* MIC004 pourrait expliquer que malgré l'absence d'effet sur la transcription, le CGRP puisse tout de même influer sur la production de ces composés, donnant ainsi une nouvelle piste vers des mécanismes d'action qui restent encore à identifier.

Article 1 : Identification of a scalp associated *Bacillus licheniformis* strain with unexpected Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sensitivity

Identification of a scalp associated *Bacillus licheniformis* strain with unexpected Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sensitivity

Hadjiev Emilie B.D.[a], Boukerb Amine M.[a,b], Ismail Rached[a,c], Barreau Magalie[a,b], Hajem Neila [d], Chevalier Sylvie[a,b], Feuilloley Marc G.J.[a,c*]

[a]-Research Unit 4312 Bacterial Communication and Anti-infectious Strategies, University of Rouen Normandy, 55 rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France.
[b] Univ Rouen Normandie, Evreux Health Safety Platform (PS2E), F-76000 Rouen, France.
[c] Expertise Center Cosmetomics@URN, University of Rouen Normandy, 55 rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France.
[d] Sisley Paris, 32 avenue de Béthunes, 95310 St Ouen l'Aumône.

Abbreviations: CDSs, coding DNA sequences; CGRP, calcitonin gene-related peptide; GFPP, geranylfarnesyl diphosphate; HPP, hexaprenyl diphosphate; MIC, minimum inhibitory concentration; MIBiG, minimum information about a biosynthetic gene cluster; MOI, multiplicity of infection; NRPS, nonribosomal peptide synthetase; NRPS-PKS, non-ribosomal peptide synthetases and polyketide synthases; RiPPs, ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides; RNAseq, complete mRNAs sequencing; T3PKS, type III polyketide synthase

* Corresponding author: Marc G.J. Feuilloley, UR4312 CBSA, University of Rouen Normandy, 55 rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France.
E-mail address: marc.feuilloley@univ-rouen.fr

Short title: New CGRP sensitive *Bacillus licheniformis* strain

Keywords:
Microbial diversity
Host-bacteria communication
Bacterial physiology
Microbial endocrinology
Transcriptomic

ABSTRACT

A *Bacillus licheniformis* strain, MIC004, collected on the scalp of a healthy volunteer, was characterized by complete genome sequencing and, since Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) has key roles in this environment, the response of the bacterium to CGRP was investigated through physiological and transcriptomic approaches. Typical *B. licheniformis* toxins are not encoded in this strain whose physiological profile suggests a commensal behavior. Its growth, biofilm formation activity, antibiotic susceptibility and cytotoxicity in HaCaT keratinocytes were not modulated by CGRP. However, under the effect of the neuropeptide, *B. licheniformis* MIC004 could trigger an inflammatory response susceptible to affect keratinocytes and epidermal cohesion. Data revealed that CGRP is not acting as a transcriptional regulator in *B. licheniformis* MIC004, but the genome of this strain encodes for gene clusters involved in the synthesis of metabolites with potential high bioactivity in keratinocytes.

1. Introduction

It has been shown that different skin-associated bacterial species, including *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Cutibacterium acnes*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* are sensitive to hormones and neurohormones released locally into the skin [1]. Investigating microbial endocrinology, the physiological impact of human neurohormones on bacteria, is complex since there is no predictive or *in silico* model. Some of those factors, such as Substance P, are active on a large range of microbial targets. Conversely, until now, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) was only shown capable to modulate the physiology of *Staphylococcus epidermidis* [2].

CGRP is a 37 amino acids peptide essentially released in the skin by C-type sensory nerve terminals. Two isoforms of CGRP, α- and β-, are generated by alternative splicing, but α-CGRP is the predominant form in the skin [3]. In eukaryotes, CGRP is acting through a complex receptor system made of two subunits, the "calcitonin receptor-like receptor" (CLR) and the "receptor activity-modifying protein" (RAMP), but a third molecule the "receptor component protein" (RCP) is necessary to form a fully functional CGRP receptor [4] and the chaperone protein DnaK, identified as the CGRP sensor in *S. epidermidis* is an ortholog of the RCP subunit in eukaryotes [5]. CGRP is the most potent vasodilatory neuropeptide currently known [6] and, in the skin, it is involved in neurogenic inflammation, pruritus and pain [4]. However, CGRP is also produced in abundance in the scalp skin and micro-vessels. At this level, it should play a key role in chronic migraine [7], scalp pruritus [8] and even in a rare headache disorder entitled cephalgia alopecia [9]. The absence of effect of CGRP on all the other skin strains tested until now is puzzling since its sensor molecule, the chaperone protein DnaK, is a ubiquitous molecule expressed in all bacterial species [10]. However, bacteria are known to rapidly adapt to their environment and as bacterial sensors for host neurohormones are generally "moonlighting proteins" susceptible to multiple rearrangements and probably post-translational modifications [11], CGRP sensitive microorganisms should be more present in regions where CGRP is particularly abundant, such as the scalp.

In the present study, we took advantage of our access to a library of recently collected scalp bacterial strains and the identification of a new strain of *Bacillus licheniformis* MIC004 from the scalp of a healthy volunteer to investigate the potential effect of CGRP. *B. licheniformis* is not a typical scalp associated microorganism, but as we did previously by selecting *Bacillus cereus* for the study of the effect of SP on cutaneous bacteria [12], its high metabolism makes it a favorable experimental model to investigate variations of virulence. *B.*

licheniformis is a Gram-positive endospore forming mesophilic bacterium of the *Bacillus subtilis* group from telluric origin but that can also survive and adapt to the human skin [13]. Usually regarded as harmless, *B. licheniformis* is occasionally involved in foodborne diseases associated to its production of lichenysin A, a heat-stable cyclic lipopeptide with surfactant and cytotoxic potential [14], and of keratinase, an enzyme of major industrial interest particularly for poultry waste processing [15]. This bacterium has also been associated with rare ocular opportunistic infections [16] and sepsis in immunocompromised patients [17]. Cutaneous infections due to *B. licheniformis*, including erysipelas [18] and abscesses [19-20] were also reported. The complete genome of the *B. licheniformis* strain MIC004 was sequenced by Next-Generation Sequencing and compared to other relative strains by a Multi-Locus Sequence Typing analysis (MLST). The impact of CGRP on the growth kinetics, biofilm formation activity, cytotoxicity and resistance to antibiotics of this bacterium was investigated. Finally, total mRNAs expressed by the bacterium after treatment with CGRP and by HaCaT keratinocytes exposed to control or CGRP-treated bacteria were recovered and analyzed.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strain and culture conditions

Bacillus licheniformis MIC004 was isolated by swabbing from the scalp of a volunteer at the Centre de Santé Sabouraud (Saint-Louis hospital AP-HP, Paris, France) under clinical control and after agreement of the hospital ethic committee. Bacteria were grown in Tryptic Soy Broth (TSB, Merck Millipore) on a rotary shaker (180 rpm) at 37 °C. Growth was monitored by spectrophotometry at 580 nm. For physiological studies, bacteria were collected at the end of the exponential growth phase. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP, CAS number 90954-53-3) was obtained from TOCRIS (Catalog No. 3012; Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom). The peptide, diluted in sterile water, was added at the beginning of the culture at a concentration of 10^{-6} M. This concentration was selected in coherence with previous studies conducted on *S. epidermidis* and *S. aureus* [2]. Bacterial growth monitoring was performed using a Tecan Microplate Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). An inoculum was added into 96-well-flat-bottomed plates (Thermo Fisher Scientific) to an initial OD_{580} = 0.08 and in the presence or absence of CGRP 10^{-6} M. Plates were incubated at 37 °C, under constant shaking and optical density was determined automatically every 15 minutes during 24 h. Growth curves were determined over three independent experiments.

2.2 Whole genome sequencing and analysis

The genomic DNA of *B. licheniformis* MIC004 was extracted from an overnight culture using the GenJET Genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and quantified on a QuBit 4.0 fluorometer with the ds-DNA high-sensitivity kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The obtained high-quality genomic DNA was sequenced using a MiSeq instrument (Illumina, Inc., San Diego, California, USA) with paired-end and barcode strategy according to the Illumina DNA prep protocol (Illumina, Inc., San Diego, California, USA). The libraries were normalized, pooled, then loaded onto the Miseq Reagent Kit v3. Cluster generation and paired-end sequencing with dual-index reads was performed in a 2 × 301 bp format.

The sequencing resulted in an output of paired-end read sets containing 3,127,988 reads. The quality of the reads was checked using FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Raw-reads were low-quality and adapter trimmed using Trimmomatic v.0.39 [21], and genome assembly achieved de novo with Unicycler v.0.5.0 [22]. Then, assembly quality control was done with Quast v.5.0.2 [23] and resulted in 33 contigs, a GC content of 46.2 %, with an N50 value of 362,147 bp. Unicycler identified two circular contigs, most likely a plasmid (9,113 bp) and a mega-plasmid (25,414 bp) that were confirmed by PlasmidID v.1.6.5 [24]. The completeness of the assembled genome was checked using CheckM v1.2.2 [25], indicating 98.82 % completeness at the species level, with 0 % contamination. To assess the genomic relatedness of our isolate, Average Nucleotide Identity (ANI) was calculated by fastANI v.1.34 [26] and placed MIC004 genome at 99.92 % similarity to type-strain *Bacillus licheniformis* ATCC14580^{T}. Then, we used NCBI-genome-download tool v.0.3.3 [27] to download all available genome sequences related to *B. licheniformis* from GenBank (accessed on November 14th, 2024) in order to screen for phylogenomic-close samples and identify their respective sources.

Sequence type identification was performed using MLST v.2.23.0 [28] and the use of the PubMLST website (https://pubmlst.org/ [29]), and a new *recF* allele was identified, giving a new ST for MIC004. Bakta v.1.9.3 [30] was used for functional annotation which provided comprehensive gene and functional annotation including coding sequences, ribosomal RNA genes, and tRNA genes. Circular representations of the obtained chromosome and both plasmids were obtained using pyCirclize v.1.9.0 [31]. AntiSMASH v.7.1.0 [32] was used to retrieve gene clusters responsible for secondary metabolite biosynthesis. Finally, virulence and antibiotic resistance genes were screened using PanVita [33].

2.3 Biofilm Formation studies

B. licheniformis MIC004 biofilm formation was studied on hydrophobic (polystyrene) and hydrophilic (glass) surfaces.

For studies on hydrophobic surfaces, bacteria were grown in 96-well-flat-bottomed plates (Thermo Fisher Scientific) under static conditions in TSB culture medium for 24 h at 37 °C, with or without CGRP 10^{-6} M. At the end of the incubation period, microplates were rinsed twice with physiological water (9 g/L NaCl, Thermo Fisher Scientific, pH 7), then biofilms were stained with 0.1 % crystal violet (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at room temperature. After washing three times with water, the plate was dried at 37 °C for 30 minutes. Crystal violet was then resuspended with 30 % acetic acid (Merck Millipore) and OD was measured at 595 nm using a Tecan Microplate Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Three independent assays were performed.

For studies on hydrophilic surfaces, biofilms were grown in 24-well plates with flat glass bottoms (Sensoplate, Greiner Bio-One, Germany). After 5 h of culture, control and CGRP-treated bacteria were harvested by centrifugation (7500 x g, 10 minutes) and washed twice with sterile physiological water to remove all traces of medium and free peptide. A volume of 300 µL of bacterial suspension, adjusted at $OD_{580} = 0.1$ in sterile physiological water, was transferred to the wells of the plates and incubated for 2 h, at 37 ° C, to allow primary adhesion. Physiological water was then replaced with 500 µL fresh medium, with or without CGRP 10^{-6} M, and the plates were incubated for 22 h under static conditions. At the end of the incubation time, the wells were washed twice with sterile physiological water and the biofilms were stained with 5 µM SYTO™ 9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for 15 minutes at room temperature. Stained samples were fixed with ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Biofilms were observed with a Zeiss LSM710 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Germany) equipped with a 63x oil immersion objective. Bacteria were detected by monitoring SYTO™ 9 fluorescence with excitation and emission wavelengths of 485 nm and 495-550 nm, respectively. Images were taken at 0.65 µM intervals throughout the entire depth of the biofilm. Three-dimensional (3D) imaging data were visualized and processed with Zen 2.1 software (Zeiss, Germany).

2.4 Antibiotics susceptibility studies

The antibiotic susceptibility of *B. licheniformis* MIC004 exposed or not to CGRP 10^{-6} M was studied in Mueller Hinton Broth (MH, Becton Dickinson) according to the European

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2023 recommendations to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). An inoculum of control and treated bacteria was added into 96-well-flat-bottomed plates (Thermo Fisher Scientific) to an initial concentration of 5.10^5 CFU/mL. Eight antibiotics were tested, based on the standard and complementary lists of the EUCAST for *Bacillus* spp.: Norfloxacin, Ciprofloxacin, Clindamycin, Meropenem, Linezolid, Vancomycin, Erythromycin and Rifampicin. All antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich. Concentrations ranged from 64 µg/mL to 0.125 µg/mL for all antibiotics except for Clindamycin (256 µg/mL to 0,5 µg/mL). The plates were incubated at 37 °C for 24 h. At the end of the experiment, 25 µL of 0.5 % resazurin (Thermo Fisher Scientific) were added to the wells and the plate was incubated for 2 more hours, at room temperature, to allow coloration. Three independent assays were performed.

2.5 Cytotoxicity studies

The cytotoxic potential of control and CGRP (10^{-6} M) treated *B. licheniformis* MIC004 was determined by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release into the medium by human HaCaT keratinocytes. LDH is a stable cytosolic enzyme released by eukaryotic cells during lysis and is a marker of cell death. The human HaCaT keratinocyte cell line (Cell Line Services, Eppelhein, Germany) was grown in DMEM 1X (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) containing 10 % of Fetal Bovine Serum (MP Biomedicals), and 1 % antibiotic cocktail (Penicillin/Streptomycin). Cells were cultivated in Nunc™ EasYFlasks™ (Nunclon™ Delta Surface, Thermo Fisher Scientific) at 37°C, in a 5 % CO_2 atmosphere and the medium was changed twice a week. For all assays, cells were seeded in 24-well plates treated for tissue culture (Nunclon™ Delta Surface, Thermo Fisher Scientific), used at 80 % confluence, and washed with a phosphate buffer saline (PBS) 1X solution (Dutsher) on the day of the experiment. At the beginning of the assay, bacteria grown in the absence or presence of CGRP (10^{-6} M) were harvested (7500 x g, 10 minutes), washed in sterile physiological water, and used to infect HaCaT cells at a Multiplicity Of Infection (MOI) of 50:1 in DMEM medium without Fetal Bovine Serum and antibiotics. The amount of LDH release was determined after 2 h and 16 h of incubation using the CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Control studies using bacteria alone showed that *B. licheniformis* MIC004 does not produce metabolites interfering with the assays (*data not shown*). At least four independent experiments were performed.

2.6 Statistical analysis

Statistical significance was evaluated with unpaired (two samples) two-tailed t tests. Means and the Standard Error of the Mean (SEM) were calculated and plotted.

2.7 Bacterial transcriptomic study

Total RNA was extracted from frozen *B. licheniformis* MIC004, exposed or not to CGRP 10^{-6} M, using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and following the manufacturer's instructions. RNA quantity was measured using a Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and RNA integrity was assessed using a 5600 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

rRNA were depleted using the NEBNext rRNA Depletion Kit for Bacteria (NEB, Ipswich, MA, USA). Strand-specific RNA sequencing libraries were prepared with the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina following the manufacturer's instructions (NEB, Ipswich, MA, USA). Briefly, enriched RNA was fragmented at 94 °C for 8 minutes. First-strand and second-strand cDNA synthesis followed, with dUTP incorporation in the second strand to maintain strand specificity. cDNA fragments were adenylated at their 3'ends, ligated to indexed adapters, and enriched via limited-cycle PCR. The dUTP in the second strand prevented its amplification, ensuring strand specificity.

Library quality was verified using a DNA Kit on the Agilent 5600 Fragment Analyzer, and concentration was determined with a Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The sequencing libraries were multiplexed, clustered onto a flow-cell, and sequenced on an Illumina NovaSeq instrument using a 2x150 bp paired-end configuration.

Raw reads were aligned to the GTF annotation of MIC004 obtained from Bakta (see above) using Hisat2 v.2.2.1 [34]. Aligned reads were sorted and indexed using SAMtools v.1.21 [35]. Gene-level quantification was performed with featureCounts within subread tool v.2.1.1 [36], using the same GTF annotation file, and parameters set to count only uniquely mapped reads in a strand-specific manner.

Raw read counts were imported into DESeq2 v.1.42.1 [37] within R v.4.3.1 [38]. Differential gene expression analysis was conducted by comparing control MIC004 samples (n=3) against samples from MIC004 exposed to CGRP 10^{-6} M (n=3). Genes with an absolute fold change greater than 1.5 and an adjusted p-value below 0.05 were considered significantly differentially expressed.

Encoded proteins were retrieved from the NCBI Gene data bank.

2.8 HaCaT keratinocytes transcriptomic study

Total RNA was extracted from frozen cell pellets of HaCaT cells alone and HaCaT cells exposed to *B. licheniformis* MIC004 treated or not with CGRP 10^{-6} M, using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and following the manufacturer's instructions. RNA quantity was measured with a Qubit 4.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and RNA integrity was assessed using an RNA Kit on the Agilent 5300 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

rRNA depletion was performed using the NEBNext rRNA Depletion Kit for Bacteria and the NEBNext rRNA Depletion Kit for Human/Mouse/Rat (NEB, Ipswich, MA, USA). RNA sequencing libraries were prepared using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina, as described in the previous section. Briefly, enriched RNA was fragmented at 94 °C for 15 minutes, followed by first-strand and second-strand cDNA synthesis. dUTP was incorporated into the second strand to maintain strand specificity. cDNA fragments were end-repaired, adenylated at the 3' ends, and ligated to universal adapters, followed by index addition and library enrichment via limited-cycle PCR.

Library quality was validated using the NGS Kit on the Agilent 5300 Fragment Analyzer, and concentration was determined with a Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The sequencing libraries were multiplexed, loaded onto a flow cell, and sequenced on an Illumina NovaSeq X Plus instrument using a 2×150 bp paired-end (PE) v1.5 configuration, following the manufacturer's instructions.

Raw reads were aligned to the human reference genome GRCh38 (NCBI Genome, accessed April 3, 2025) using STAR v.2.7.11b [39] with default parameters. The genome index was built using the GRCh38 primary assembly FASTA and the *Homo_sapiens.* GRCh38.108.chr.gtf annotation file obtained from Ensembl. Aligned reads were sorted and indexed using SAMtools v.1.21 [35]. Gene-level quantification was performed with featureCounts within subread tool v.2.1.1 [36], using the same GTF annotation file, and parameters set to count only uniquely mapped reads in a strand-specific manner.

Raw read counts were imported as previously into DESeq2 v.1.42.1 [37] within R v.4.3.1 [38]. Differential gene expression analyses were conducted by comparing samples from HaCaT cells alone or HaCaT cells infected with *B. licheniformis* MIC004, pretreated or not (n=3) with CGRP 10^{-6} M. Genes with an absolute fold change greater than 1.5 and an adjusted p-value below 0.05 were considered significantly differentially expressed.

Encoded proteins were retrieved from the NCBI Gene data bank.

3. Results

3.1 B. licheniformis MIC004 genomic sequence characterization

Sequencing of the *Bacillus licheniformis* MIC004 genome revealed a 4.02 Mb chromosomal sequence along with two plasmids. Chromosome sequence analysis presented 46.7 % GC content and an N50 of 362 Kbp. It contained 4288 protein coding DNA sequences (CDS) representing a coding density of 88.6 % (**Figure 1**). A first plasmid, designated as pL1, of 9.11 Kb presenting a GC content of 41.7 % and a coding density of 86.9 % was identified (**Figure 2A**). ID analysis indicated 95.7 % identity and 91 % coverage to the closest pBs004 plasmid from *B. licheniformis* strain P8_B2 of telluric origin [40]. A second plasmid of 25.41 Kb, noted pL2, was also found (**Figure 2B**). It showed a GC content of 41.5 % and a coding density of 79.4 %. This plasmid is novel and of unknown origin.

The draft genome sequences have been deposited on DDBJ/ENA/GenBank under accession number JAXOGB000000000. Genome screening confirmed the absence of known toxin-encoding genes and antibiotic resistance determinants in this strain. However, genes involved in the biosynthesis of small bioactive peptides with diverse biological activities were identified. These include diketopiperazines [41], small cyclic peptides, thiopeptides [42], complex antimicrobial peptides, lanthipeptides, and a lassopeptidic compounds typically produced via ribosomal synthesis and post-translational modifications [43, 44].

The antiSMASH v8.0.1 analysis of *B. licheniformis* strain MIC004 revealed a diverse and functionally rich secondary metabolome, comprising 12 Biosynthetic Gene Clusters (BGCs). The genome encodes multiple classes of biosynthetic systems, including three distinct NRPS (NonRibosomal Peptide Synthetase) or NRPS-like clusters, three terpene-related clusters, and several RiPPs (Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides), suggesting modular flexibility and biosynthetic versatility. One notable feature is the presence of a betalactone cluster (Region 7.2), a biosynthetic system more commonly associated to specialized antimicrobial compounds. While betalactones are well-described in some Firmicutes, their specific role in *B. licheniformis* MIC004 remains uncharacterized, hinting at potential for novel β-lactone derivatives. The NRPS clusters (Regions 5.1 and 16.1) lack close similarity to known MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) entries, indicating non-canonical peptide scaffolds. Region 16.1 includes NRP-metallophore annotation, suggesting involvement in metal ion acquisition or detoxification key traits for environmental resilience or competition. Three RiPP clusters were detected: an azole-containing RiPP (Region 2.1), a lanthipeptide class II (Region 3.1), and a lassopeptide (Region

3.2). These ribosomally synthesized systems are known for producing stable, bioactive molecules often involved in antimicrobial defense. The absence of core peptide predictions in some of these clusters suggests novel structural features or regulatory elements. The terpene and terpene-precursor clusters (Regions 1.2, 4.1, 7.1) contain prenyltransferases capable of generating FPP (Farnesyl diphosphate), GGPP (Geranylgeranyl diphosphate), GFPP (Geranylfarnesyl diphosphate) and HPP (Hexaprenyl diphosphate), consistent with the biosynthesis of mono-, sesqui-, and diterpenes. Some of these regions also encode polyprenyl synthetases and hydrolases, implying extended pathway complexity. One terpene cluster (Region 7.1) is notable for including genes linked to transport and tailoring, potentially supporting production and export of bioactive volatiles. Unlike many Actinobacteria or Proteobacteria, *B. licheniformis* MIC004 shows no canonical hybrid NRPS-PKS (Non-Ribosomal Peptide Synthetases and Polyketide Synthases) systems, reinforcing a modular, streamlined approach to secondary metabolism. However, the presence of T3PKS (Type III Polyketide Synthase, Region 15.1) supports biosynthesis of small polyketide-like molecules, possibly with aromatic or phenolic functions. Most clusters show no high-confidence similarity to MIBiG-referenced pathways, underscoring the novelty of this strain's biosynthetic capacity. This absence of homology, combined with the diversity of biosynthetic logics (RiPPs, NRPS, terpenes, betalactones), suggests that *B. licheniformis* MIC004 could be a rich source of cryptic or orphan natural products. Overall, the biosynthetic landscape of strain MIC004 reflects ecological adaptability and evolutionary experimentation, positioning it as a promising chassis for natural product discovery.

Multi-Locus Sequence Typing (MLST) analysis was conducted on 265 *B. licheniformis* isolates from PubMLST, based on the sequences of six housekeeping genes (*adk*, *ccpA*, *recF*, *rpoB*, *spoOA*, and *sucC*) (**Figure 3**). The results identified two major phylogenetic clusters within the species. *B. licheniformis* MIC004, assigned to a unique sequence type (ST59) due to the presence of a novel *recF* allele, was found to be related to three other sequence types. No common geographic or ecological origin was identified among these strains.

3.2 CGRP does not impact the growth kinetics and biofilm production of Bacillus licheniformis MIC004

The effect of CGRP 10^{-6} M on the growth of *B. licheniformis* MIC004 in TSB medium was evaluated by monitoring over 24 h. CGRP had no effect on *B. licheniformis* MIC004 over the entire growth phase (**Figure 4**). The generation time of the bacteria was of 63.1 ± 3.7 and 64.8 ± 4.4 min for control and CGRP-treated *B. licheniformis*, respectively.

Biofilms grown on polystyrene surface were evaluated by the crystal violet technique and OD measurement at 595 nm. Results were expressed as a percentage of variation of the control (*i.e*. bacteria grown in the absence of CGRP). *B. licheniformis* MIC004 biofilms formed by control and CGRP-treated bacteria did not show any significant differences (**Figure 5A**). Furthermore, representative 3D micrographs of *B. licheniformis* biofilms obtained by confocal laser scanning microscopy after SYTO^{TM} 9 nucleic acid-staining showed no modification of the biofilm structure (**Figure 5B**). In both cases, *B. licheniformis* MIC004 formed a very heterogenous, aerial biofilm with cells dispersed in the matrix. Therefore, as on polystyrene (hydrophobic surface), exposure of *B. licheniformis* MIC004 to CGRP during the culture and biofilm maturation did not impact biofilm formation on glass (hydrophilic surface).

3.3 CGRP does not impact the resistance to antibiotics and cytotoxicity of Bacillus licheniformis MIC004 on HaCaT cells

The potential impact of CGRP on the antibiotic susceptibility of *B. licheniformis* MIC004 was evaluated based on the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2023) standard and complementary list using Norfloxacin, Ciprofloxacin, Clindamycin, Meropenem, Vancomycin, Erythromycin, Linezolid and Rifampicin (**Figure 6A**). MIC values of control and CGRP-treated bacteria are presented in **Table 1**. Overall, despite slight variation of the MIC between the replicates, especially for Clindamycin and Linezolid, CGRP had minimal effects on the antibiotic susceptibility of *Bacillus licheniformis* MIC004.

The impact of CGRP on *B. licheniformis* MIC004 cytotoxicity was evaluated by measurement of LDH, a stable cytosolic enzyme released during cell lysis. The basal cytotoxicity of the bacterium, used at an MOI of 50:1 (*i.e.* 50 bacteria per HaCaT cell, a classical ratio for infection studies), was low (6 % maximal cell death after 2h incubation). To compensate variations of cell populations in wells, results were expressed as percentages of variation in regard of the control (*i.e.,* infection with bacteria grown in the absence of CGRP). A marginal, but non-significant, difference of cytotoxicity was observed after 2 h and 16 h of infection between HaCaT cells exposed to control and CGRP-treated bacteria (**Figure 6B**).

3.4 CGRP is not a transcriptional regulator in Bacillus licheniformis MIC004

The 4288 protein CDSs encoded in the genome of *B. licheniformis* MIC004 were screened in control and CGRP-treated bacteria. Comparison of gene expression profiles between control and CGRP-exposed microorganisms considering a minimal 1.5-fold variation

and a p-value <0.05 did not reveal any significant up- or down-regulated mRNA. Since lower variations of gene expression can also have major metabolic impact when key genes are affected, data were analysed considering a potential 1-fold variation. In this condition, a total of 21 genes appeared modulated by CGRP. A total of 5 genes were overexpressed, including a gene encoding for a probable membrane protein, YisQ, while the majority of the genes (16) were downregulated. These genes were encoding essentially for intermediate metabolism proteins and proteins involved in nitrate assimilation. No key upstream regulator of the bacterial metabolism appeared affected.

3.5 CGRP treated Bacillus licheniformis MIC004 induces major variations in HaCaT keratinocytes genome expression

The impact of CGRP treatment on the outcome of HaCaT cells infection with *B. licheniformis* MIC004 was assessed by performing a global comparative transcriptomic analysis. When HaCaT cells were exposed to untreated bacteria, a total of 731 identified genes were differentially expressed (≥1.5-fold, p-value < 0.05) (**Figure 7A**). Among them, 378 of the genes were downregulated and 352 were upregulated. Genes with a ≥3-fold and a p-value < 0.05 are listed in **Supplementary Table 1**. A member of the histone H3 family (H3C1, - 2.13 of fold change) was downregulated. Other downregulated genes were generally encoding for intermediate metabolism or uncharacterized proteins. Although, *B. licheniformis* MIC004 appears devoid of toxins expression, when HaCaT cells were exposed to this bacterium an increase in genes encoding for proteins involved in inflammation such as interleukin 6 (IL6, +5.76 of fold change), NFKB inhibitor alpha (NFKBIA, +4.79 of fold change), immediate early response 3 (IER3_4, +4.26 of fold change), suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3, +3.85 of fold change) and apoptosis, such as the cellular communication network factor 1 (CCN1, +2.77 of fold change). In parallel, genes encoding for proteins involved in transcription such as the activating transcription factor 3 (ATF3, +4.69), the Jun and Jun B proto-oncogenes (JUN and JUNB, +5.24 and +2.75) the FosB proto-oncogene (FOSB, +4.93), the nuclear receptor subfamily 4 group A members 1, 2 and 3 (NR4A1, A2 and A3, +6.96, +6.37 and +6.40 respectively) and in signal transduction, including the Rho family GTPase 3 (RND3, +2.58), the dual specificity phosphatases 1 and 5 (DUSP1 and 5, +4.61 and +3.62, respectively) and the heparin binding EGF like growth factor (HBEGF, +4.08) were also increased when HaCaT cells were exposed to MIC004.

As shown in **Figure 7B**, genes expression by HaCaT cells was markedly different when they were exposed to control or CGRP-treated *B. licheniformis* MIC004. Most of the genes

activated in HaCaT cells exposed to CGRP-treated *B. licheniformis* were different of those expressed when the cells were exposed to control bacteria. In HaCaT cells exposed to CGRP-treated bacteria, downregulated genes encoding for surface proteins such as ATPase dependent transporters (ATP10B and ATP6V1B1, -1.68 and -2.24, respectively), a potassium voltage-gated channel member (KCNH4, -3.03), transmembrane protein 37 and serine protease 13 (TMEM37 and TMPRSS13, -1.95 and -1.71, respectively), semaphorin 6D (SEMA6D, -2.16) and annexin A9 (ANXA9, -1.93) were identified. Several genes for intercellular junctions, cytoskeletal proteins and matrix molecules, including the desmosomal protein desmoglein 4 (DSG4, -1.64), keratin 13 and 15 (KRT13 and KRT15, -1.86 and -1.76, respectively) and collagen alpha-1(III) chain-like (LOC107985728, -2.48) were also downregulated. Other inhibited genes in the presence of CGRP-treated bacteria appeared involved in intracellular traffic, such as the neuronal vesicle trafficking associated 1 protein (NSG1, -1.72) and RAB26 (-2.87) and enzymatic activity (cytochrome P450 subunits, calmodulin like protein, γ-glutamyl transferase, desaturase, acetylglucosaminyltransferase and methyltransferase). Upregulated genes in HaCaT cells exposed to MIC004 grown in the presence of CGRP include a series of sequences encoding for uncharacterized proteins, which for some of it were markedly over expressed (+3.73 of fold change for LOC124901450). As in HaCaT cells exposed to control bacteria, the gene encoding for the interleukin 23 subunit alpha was overexpressed (+1.68). Other genes were encoding for growth factors (FGF5 and FGF18, +2.7 and +1.86, respectively), matrix metallopeptidases (MMP10 and MMP13, +2.25 and +1.63, respectively) and cell transformation factors (EGOT, +1.94, LOC124902955, +2.21 and SH2D5, +1.59). The list of the 81 identified genes down- and up-regulated in HaCaT cells after exposure to CGRP-treated bacteria in comparison to HaCaT cells exposed to control bacteria is presented in **Supplementary Table 2**.

4. Discussion

B. licheniformis is essentially studied because of its high biotechnological interest and its involvement in the contamination of industrial processes [45]. For those reasons it is frequently identified in foodborne infections [46]. However, ribotyping revealed that the species should, in fact, be divided between toxigenic and nontoxigenic strains [47] capable or not to synthesise lichenysin A and related peptides [48]. Then, whereas some strains can be involved in bacteremia [49-51] endocarditis [52], peritonitis [53] and skin surface infections [18-20], other ones more rarely studied should behave as commensal microorganisms. This is

apparently the case of *B. licheniformis* MIC004, that was collected on the scalp in the absence of any detectable infection, and which does not contain any known toxin in its genome. In addition, no antibiotics resistance genes were detected in the chromosomal genome and the second plasmid pL2 identified in this strain which appears as a new representative member of the species cluster 2 with a new allele for *recF*. In contrast, it is interesting to note that genes encoding for the synthesis of original peptides, namely diketopiperazines, thiopeptides, lanthipeptides and a lassopeptide were found in the genome of *B. licheniformis* MIC004. Despite having multiple activities, these molecules are all considered as antimicrobial compounds. Diketopiperazines have antiviral, antifungal, antibacterial and even antitumour activities [41]. Thiopeptides are protein synthesis inhibitors with potent Gram-positive and even antimalarial activities [42]. Lanthipeptides affect the bacterial cell membrane and are also particularly active in Gram-positive bacteria [43]. In contrast, lassopeptides have high activity against Gram-negative microorganisms [54]. However, this strain is not totally harmless since diketopiperazines have also been shown to interfere with calcium, opioid, GABAergic, serotoninergic 5-HT1A2 and oxytocin receptors [41] and therefore could deeply affect human physiology. Thiopeptides can selectively induce mitochondrial autophagy [55] while lassopeptides can antagonise receptors for atrial natriuretic factor, glucagon and endothelin in eukaryotic cells [54]. Even lantibiotics such as nisin, which are used for food preservation, have side effects and can negatively affect the gut microbiota [56] and even increase virulence at sub-inhibitory concentrations as observed with skin-associated bacteria [57]. Moreover, *B. licheniformis* and its spores have an intrinsic inflammatory potential [58] suggesting that surface molecules could also affect the host physiology. Other data supporting the need to investigate the virulence of *B. licheniformis* MIC004 are linked to the demonstration that local factors can promote the virulence of cutaneous bacteria. In particular, it was shown that Substance P released in skin by C-type nerve terminals can act on a cutaneous strain of *Bacillus cereus*, inducing a four folds increase of its virulence [12]. Substance P is co-localized with CGRP, and in scalp where *B. licheniformis* MIC004 was isolated, CGRP is present in abundance and should play a central role in scalp neurovascular regulation [59]. The apparent heterogeneity of the bacterial response to CGRP being also a puzzling question, it was then decided to investigate the virulence of *B. licheniformis* MIC004 and the potential effect of CGRP.

The lack of effect of CGRP on the growth kinetics of *B. licheniformis* MIC004 appears as a common feature of all neuropeptides and neurotransmitters acting on the cutaneous microbiota studied until now, including Substance P, natriuretic peptides, γ-aminobutyric acid

(GABA) or catecholamines [11]. As in *S. aureus*, CGRP was also without effect on biofilm formation by *B. licheniformis* MIC004, independently of the hydrophobic or hydrophilic properties of the surface, suggesting that CGRP does not modify the envelope properties of *B. licheniformis* MIC004 at the opposite of the observations made on *S. epidermidis* [2]. As expected for a strain that does not contain antibiotics resistance genes, *B. licheniformis* MIC004 was sensitive to almost all tested antibiotics usually employed to treat infections due to this microorganism, except Clindamycin. CGRP had no visible impact on the MIC of antibiotics. It is impossible to know if this is specific to CGRP or to this strain, since this is the first antibiotic resistance study in the context of microbial endocrinology, and after exposure of the bacteria to a neuropeptide or a neurotransmitter. This should deserve further studies in other bacterial species. The basal cytotoxicity of *B. licheniformis* MIC004 was low, as expected for a potential commensal bacterium. This low virulence is making it difficult to observe potential changes of cytotoxicity since statistical variations are high and although a marginal increase in cytotoxicity was observed after exposure of HaCaT cells for 2 and 16 h to CGRP-treated bacteria, the differences were not significant. This absence of effect of a neurohormone on low virulence cutaneous bacteria cytotoxicity was previously observed with GABA in *Pseudomonas fluorescens* [60] and catecholamines with *C. acnes* [61]. However, as shown in *C. acnes*, this can be associated to modifications of the bacterium inflammatory potential.

Investigating the inflammatory response is complex, since for the same signal molecule, for example Substance P, closely related microorganisms such as *S. epidermidis* and *S. aureus* can trigger different inflammatory pathways, as revealed by qRT-PCR array analysis over a series of genes expressed by keratinocytes during inflammation [2]. For that reason, and since the cost of those studies is now more sustainable, we decided to do a transcriptomic study by analysing total mRNAs expressed in *B. licheniformis* MIC004 treated or not to CGRP 10^{-6} M and in HaCaT cells exposed to control or CGRP-treated bacteria.

Analysis of genes expression in control and CGRP-treated *B. licheniformis* MIC004 did not reveal differences with a fold change > 1.5. A limited series of genes appeared modulated with a fold change between 1.5 and 1 but these genes were not encoding for key regulators of the bacterial physiology. Therefore, it appears that CGRP is not a transcriptional regulator in *B. licheniformis* MIC004. This is not excluding potential effects through other mechanisms such as regulation of enzymatic activity or membrane exchange regulation. As shown by genomic analysis of this strain, its genome encodes for biosynthetic gene clusters involved in the synthesis of metabolites (RiPPs, NRPS, terpenes, betalactones…) with important bioactive potential and that was a motivation to study genes expression in HaCaT cells after exposure to

control or CGRP-treated bacteria. As expected for a commensal microorganism, exposure of HaCaT cells to *B. licheniformis* was leading to limited variation of genes expression. However, it was interesting to note that genes encoding for inflammatory proteins were upregulated when HaCaT cells were exposed to the bacterium, suggesting that despite of its commensal behaviour *B. licheniformis* MIC004 has a significant inflammatory potential. Other overexpressed genes were even encoding for proteins involved in apoptosis, indicating that under circumstances and mechanisms to identify, this bacterium could also trigger cell death. A major observation was the marked difference observed between genes expression by HaCaT keratinocytes exposed to bacteria grown in the absence or presence of CGRP. This is clearly showing that although physiological studies failed to detect any effect of CGRP, *B. licheniformis* is sensitive to the neuropeptide. Whereas in cells exposed to the control microorganism, the number of downregulated genes was limited, this number was increased when HaCaT keratinocytes were in contact with CGRP-treated bacteria. Expression of surface proteins, enzymes and proteins involved in intracellular trafficking was affected but the most important was the observation of a decrease in the expression of genes encoding for intercellular junctions, cytoskeletal proteins and matrix molecules. These proteins play a key role in the physiology and function of keratinocytes [62], and the data suggest that after exposure to CGRP, *B. licheniformis* could affect the structure of keratinocytes and even possibly the cohesion of the epidermis. With regret, many genes upregulated in HaCaT cells under the effect of CGRP-treated *B. licheniformis* are not characterized but we observed and increase in mRNAs encoding for interleukin 23, growth factors, matrix metallopeptidases and cell transformation proteins. This is coherent with induction of a basal inflammatory process, as noted with the control bacteria, but through different mechanisms.

In conclusion, it appears that *B. licheniformis* MIC004 is a peculiar strain with commensal behaviour but with potential inflammatory activity. Following detection of CGRP through unknown mechanism, this bacterium should modify its metabolism and acquire an inflammatory activity susceptible to affect keratinocytes and epidermal integrity. These results deserve to be confirmed using primary culture keratinocytes. Proteomic and/or metabolomic analysis of CGRP-treated *B. licheniformis* MIC004 should also allow to identify bacterial metabolites involved in the response of keratinocytes to this strain. Nevertheless, this study is pointing out the complexity of the study of the effect of host molecules on bacteria and the need to investigate deeply their effects through complementary approaches.

Funding

Authors are grateful to the European Union (FEDER), French Ministry of Research, Region Normandie (MICCA PRCE program) and Evreux Porte de Normandie for funding.

Acknowledgments:
This work was supported by Cosmetic Valley, the world's leading perfumery and cosmetics network.

Author contributions
HE: Bacterial physiology investigations; Methodology; Formal analysis, Writing. BA: Genome sequencing; bioinformatic studies. IR: Bacterial physiology investigations; Methodology; Formal analysis. MB: Bacterial physiology, Confocal microscopy. NH: Project administration; Supervision; Validation. SC: Project administration; Supervision; Validation. FM: Conceptualization; Project administration; Supervision; Validation; Writing – review & editing.

Declaration of competing interest
The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, the collection, analyses, or interpretation of data, writing of the manuscript, or the decision to publish the results.

References

[1] Racine P-J, Janvier X, Clabaut M, Catovic C, Souak D, Boukerb AM, et al. Dialog between skin and its microbiota: Emergence of "Cutaneous Bacterial Endocrinology". Exp Dermatol 2020;29:790-800. http://doi.org/10.1111/exd.14158.

[2] N'Diaye A, Mijouin L, Hillion M, Diaz S, Konto-Ghiorghi Y, Percoco G, et al. Effect of Substance P in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence: Implication for skin homeostasis. Front Microbiol 2016;7: 1-15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00506.

[3] Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff, M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. Physiol. Rev. 2006;86:1309-1379. https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2005.

[4] Russell FA, King R, Smillie S-J, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 2014;94:1099-142. https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2013.

[5] N'Diaye A, Gannesen A, Borrel V, Maillot O, Enault J, Racine P-J, et al. Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide: Key regulators of cutaneous microbiota homeostasis. Front Endocrinol 2017;30:8:15. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00015.

[6] Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature 1985; 313:54-56. https://doi.org/10.1038/313054a0.

[7] Russo AF, Hay DL. CGRP physiology, pharmacology, and therapeutic targets: migraine and beyond.
Physiol Rev 2023;103:1565-1644. https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2021.

[8] Cirino PV, Hordinsky M, McAdams B, Romiti R. Small fiber neuropathy and intractable scalp pruritus in dermatomyositis patients. Skin Health Dis 2022;3:e173. https://doi.org/10.1002/ski2.173.

[9] Bedrin KO, Dougherty C. Cephalgia alopecia. Curr Pain Headache Rep 2020;24:46. https://doi.org/10.1007/s11916-020-00880-w.

[10] Mayer MP. The Hsp70-chaperone machines in bacteria. Front Mol Biosci 2021;8:694012. https: // doi.org/ 10.3389/fmolb.2021.694012.

[11] Feuilloley MGJ, Hadjiev E, Amegnona LJ. Interaction of skin-born mediators with the cutaneous microbiota and beyond. Curr Opin Endocr Metab Res 2024;37:100545. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2024.100545.

[12] Mijouin L, Hillion M, Ramdani Y, Jaouen T, Duclairoir-Poc C, Follet-Gueye M-L, et al. Effects of a skin neuropeptide (substance p) on cutaneous microflora. PLoS One 2013;8:e78773. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078773.

[13] Bibel DJ, Lovell DJ, Smiljanic RJ. Survival of *Bacillus licheniformis* on human skin. Appl Environ Microbiol 1978;35:1128–1135. https://doi.org/10.1128/aem.35.6.1128-1135.1978.

[14] Yeak KYC, Perko M, Staring G, Fernandez-Ciruelos BM, Wells JM, Abee T, et al. Lichenysin production by *Bacillus licheniformis* food isolates and toxicity to human cells. Front Microbiol 2022;13: 831033. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.831033.

[15] Liaqat I, Ali S, Butt A, Durrani AI, Zafar U, Saleem S et al. Purification and characterization of keratinase from *Bacillus licheniformis* dcs1 for poultry waste processing. J Oleo Sci 2022;71:693-700. https://doi.org/10.5650/jos.ess21426.

[16] Padhi TR, Sharma S, Das S, Das T. *Bacillus licheniformis* as a cause of delayed-onset recurrent pseudophakic endophthalmitis-a rare case report. Retin Cases Brief Rep 2012;6:43-45. https://doi.org/10.1097/ICB.0b013e3182051df9.

[17] Haydushka IA , Markova N, Kirina V, Atanassova M. Recurrent sepsis due to *Bacillus licheniformis*. J Glob Infect Dis 2012;4:82-83. https://doi.org/10.4103/0974-777X.93768.

[18] Ameur MA, Dubrous P, Koeck JL. *Bacillus licheniformis*: an unusual cause of erysipelosis. Med Mal Infect 2005;35:417–418. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.04.007.

[19] Yuste JR, Cruz S, Fernández-Rivero ME, Mora G. *Bacillus licheniformis* as a cause of a deep skin abscess in a 5-year-old girl: An exceptional case following a plant thorn injury. J Microbiol Immunol Infect 2016;49:821-819. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.08.031.

[20] Iotti LR, Puente-Fuertes L, de Frutos M, Gonzalez-Lopez A, Eiros JM. Infección cutánea por *Bacillus licheniformis*. Rev Esp Quimioter 2023;36: 641-642. https://doi.org/10.37201/req/040.2023.

[21] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 2014;30:2114-2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

[22] Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput. Biol. 2017;13:e1005595. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595

[23] Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 2013;29:1072-1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

[24] https://github.com/BU-ISCIII/plasmidID

[25] Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Research 2015;25:1043-1055. http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.186072.114.

[26] Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, & Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nature communications 2018;9:5114. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9.

[27] https://zenodo.org/records/8192486

[28] Seemann T, mlst Github https://github.com/tseemann/mlst

[29] Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC bioinformatics 2010;11:1-11. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595.

[30] Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. Microbial genomics 2021;7:000685. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685.

[31] https://github.com/moshi4/pyCirclize

[32] Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, Van Wezel GP, Medema MH, Weber T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. Nucleic acids research 2021;49:W29-W35. https://doi.org/10.1093/nar/gkab335.

[33] Rodrigues DLN, Ariute JC, Rodrigues da Costa FM, Benko-Iseppon AM, Barh D, Azevedo V, Aburjaile F. PanViTa: pan virulence and resistance analysis. Frontiers in Bioinformatics 2023;3:1070406. https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1070406.

[34] Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat Biotechnol 2019;37:907–915. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4.

[35] Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, Whitwham A, Keane T, McCarthy SA, Davies RM, Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. GigaScience 2021;10:giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008.

[36] Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics 2014;30:923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656.

[37] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol 2014;15:550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8.

[38] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023. https://www.R-project.org.

[39] Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 2013;29:15-21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635

[40] Kiesewalter HT, Lozano-Andrade CN, Maroti G, Snyder D, Cooper V, Joergensen TS, Weber T, Kovacs AT. Complete genome sequence of 14 *Bacillus subtilis* soil isolates to study secondary metabolite diversity. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP045815.1.

[41] Martins MB, Carvalho I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. Tetrahedron 2007; 63:9923-9932. https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.105.

[42] Chan DCK, Burrows LL Thiopeptides: antibiotics with unique chemical structures and diverse biological activities. J Antibiot 2021;74:161–175. https://doi.org/10.1038/s41429-020-00387-x.

[43] Maheshwari N, Jermiin LS, Cotroneo C, Gordon SV, Shields DC. Insights into the production and evolution of lantibiotics from a computational analysis of peptides associated with the lanthipeptide cyclase domain. R Soc Open Sci 2024;11:240491. https://doi.org/10.1098/rsos.240491.

[44] Zhao N, Pan Y, Cheng Z, Liu H. Lasso peptide, a highly stable structure and designable multifunctional backbone. Amino Acids 2016;48:1347-56. https://doi.org/10.1007/s00726-016-2228-x.

[45] De Clerck E, De Vos P. Study of the bacterial load in a gelatine production process focussed on *Bacillus* and related endosporeforming genera. Syst Appl Microbiol 2002;25: 611-617. https://doi.org/10.1078/07232020260517751;

[46] Logan NA. Bacillus and relatives in foodborne illness. J Appl Microbiol 2012;112:417-429. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x.

[47] Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, Kampfer P, Andersson MC, Honkanen-Buzalski T, Scoging A. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. App Environ Microbiol 1999;65:4637-4645. https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4637-4645.1999.

[48] Mikkola R, Kolari M, Andersson MA, Helin J, Salkinoja-Salonen MS. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. Eur J Biochem 2000;267:4068-4074. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2000.01467.x.

[49] Blue SR, Singh VR, Saubolle MA. *Bacillus licheniformis* bacteremia: five cases associated with indwelling central venous catheters. Clin Infec Dis 1995,20:629-633. https://doi.org/10.1093/clinids/20.3.629.

[50] Hannah WN, Ender PT. (1999). Persistent *Bacillus licheniformis* bacteremia associated with an intentional injection of organic drain cleaner. Clin Infect Dis 1999;29:659-661. https://doi.org/10.1086/598647.

[51] Haydushka IA, Markova N, Kirina V, Atanassova M. (2012). Recurrent sepsis due to *Bacillus licheniformis*. J Glob Infect Dis 2012;4:82-83. https://doi.org/10.4103/0974-777X.93768.

[52] Santini F, Borghetti V, Amalfitano G, Mazzucco A. *Bacillus licheniformis* prosthetic aortic valve endocarditis. J Clin Microbiol 1995;33:3070-3073. https://doi.org/10.1128/jcm.33.11.3070-3073.1995.

[53] Park DJ, Yun JC, Baek JE, Jung EY, Lee DW, Kim MA, Chang SH. (2006). Relapsing *Bacillus licheniformis* peritonitis in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient (Case Report). Nephrology 2006;11:21-22. https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2006.00539.x.

[54] Julian D. Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA. Lasso peptides: An intriguing class of bacterial natural products. Acc Chem Res 2015;48:1909–1919. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00156.

[55] Bird KE, Xander C, Murcia S, Schmalstig AA, Wang X, Emanuele MJ et al. Thiopeptides induce proteasome-independent activation of cellular mitophagy. ACS Chem Biol 2020;15:2164-2174. https://doi.org/10.1021/acschembio.0c00364.

[56] Zhang ZJ, Wu C, Moreira R, Dorantes D, Pappas T, Sundararajan A et al. Activity of gut-derived Nisin-like lantibiotics against human gut pathogens and commensals. ACS Chem Biol 2024;19:357–369. https://doi.org/10.1021/acschembio.3c00577.

[57] Hillion M, Mijouin L, Leneveu C, Gerault E, Jaouen T, Lefeuvre L et al. Response of commensal *Staphylococci* to sub-lethal concentrations of skin antimicrobial peptides. 5th FEMS Congress of European Microbiologists. Leipzig, Germany, July 21-25th 2013.

[58] Pickering J, Teo TH, Thornton RB, Kirkham LA, Zosky G R, Clifford HD *Bacillus licheniformis* in geogenic dust induces inflammation in respiratory epithelium. Env Res 2018;164:248-254. https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.025.

[59] Del Fiacco M, Quartu M, Boi M, Serra MP, Melis T, Boccaletti R et al. TRPV1, CGRP and SP in scalp arteries of patients suffering from chronic migraine. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2015 ;86:393-397. https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-308813.

[60] Dagorn A, Chapalain A, Mijouin L, Hillion M, Duclairoir-Poc C, Chevalier S et al. Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity. Int J Mol Sci 2013;14:12186-12204. https://doi.org/10.3390/ijms140612186.

[61] Borrel V, Thomas P, Catovic C, Racine P-J, Konto-Ghiorghi Y, Lefeuvre L et al. Acne and stress: Impact of catecholamines on *Cutibacterium acnes*. Front Med 2019;6:155. https://doi.org/10.3389/ fmed.2019.00155.

[62] Luxenburg C, Zaidel-Bar R. From cell shape to cell fate via the cytoskeleton - Insights from the epidermis. Exp Cell Res 2019;378:232-237. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.03.016.

Table 1: Minimal inhibitory concentrations of all tested antibiotics (see Figure 5A) in control and CGRP-treated (10^{-6} M) *Bacillus licheniformis* MIC004.

Antibiotics	Control	CGRP 10^{-6} M
Norfloxacin (N)	1-2 µg/mL	2 µg/mL
Ciprofloxacin (Ci)	0.25-0.5 µg/mL	0.25 µg/mL
Clindamycin (Cl)	128 µg/mL	128-256 µg/mL
Meropenem (M)	0.25 µg/mL	0.25 µg/mL
Vancomycin (V)	2-4 µg/mL	2-4 µg/mL
Erythromycin (E)	0.25-1 µg/mL	0.5-1 µg/mL
Linezolid (L)	8-32 µg/mL	8-32 µg/mL
Rifampicin (R)	0.125 µg/mL	0.125 µg/mL

Table 2: *Bacillus licheniformis* genes modulated by CGRP 10^{-6} M with minimal fold change ≥ 1.

ID	Genes	Function
Upregulated		
IGIDGF_03607	*yjbA*	Uncharacterized sporulation protein YjbA, contains UPF0736/DUF3603 domain
IGIDGF_03687	*yhjR/yhrR*	Rubrerythrin diiron-binding domain-containing protein, ferritin-like domain-containing protein
IGIDGF_04081	*yfhS*	Conserved protein YhfS
IGIDGF_03623	*yjaU*	Conserved hypothetical protein YjaU/Hydrolase
IGIDGF_03632	*norM/yisQ*	Probable transporter YisQ, belongs to the multi antimicrobial extrusion (MATE) family
Downregulated		
IGIDGF_01060	*corA/yqxL*	Mg2+ transporter protein, CorA-like
IGIDGF_02781	*ric/scdA*	Putative ScdA, di-iron-containing protein involved in the repair of iron- sulfur clusters, belongs to the RIC family
IGIDGF_02788	*crp/arfM*	Probable transcriptional regulator
IGIDGF_02790	?	DUF1858 domain-containing protein
IGIDGF_02793	*narH*	Nitrate reductase (Beta subunit)
IGIDGF_02794	*narJ*	Nitrate reductase (Protein J)
IGIDGF_02861	?	Uncharacterized/hypothetical protein
IGIDGF_00119	*nirB/nasD*	Assimilatory nitrite reductase (subunit), nitrogen metabolism, nitrate assimilation
IGIDGF_00238	*ldh*	L-lactate dehydrogenase
IGIDGF_00932	*ptsG2/sacP*	Phosphotransferase system (PTS) sucrose-specific enzyme IIBC component
IGIDGF_02787	*ywiC*	Conserved membrane protein, putative carboxy peptidase YwiC
IGIDGF_02795	*narI*	Nitrate reductase (Gamma subunit)
IGIDGF_02901	*ymzA*	Uncharacterized protein
IGIDGF_04180	ncRNA	Uncharacterized
IGIDGF_04223	*nagE*	Phosphotransferase system (PTS) beta-glucoside-specific enzyme IIBCA component
IGIDGF_04295	*tolB/ydjN*	YdjN/Belongs to the TolB family

Legends to the figures

Figure 1: Whole-genome map of *Bacillus licheniformis* MIC004 generated with pyCirclize. The genome map consists of seven different circles from the inner to the outer circle: 1) GC skew, 2) G + C content, 3) tRNA, 4) rRNA, 5) reverse CDS, 6) forward CDS, and 7) measuring scale.

Figure 2: Plasmid-maps of the two plasmids of *Bacillus licheniformis* MIC004. (**A**) Plasmid-map of the pL1 plasmid. (**B**) Plasmid-map of the pL2 plasmid. Circular maps generated with pyCirclize consist in four different circles, from the inner to the outer circle: 1) GC skew, 2) G + C content, 3) reverse CDS, and 4) forward CDS. Figures below indicate the position of genes encoding for identified proteins.

Figure 3: **Multi-Locus Sequence Typing (MLST) analysis of 265 *Bacillus licheniformis* isolates.** The analysis was performed on six house-keeping genes (*adk*, *ccpA*, *recF*, *rpoB*, *spoOA* and *sucC*). The distances represent the number of allele differences between each group of strains. *B. licheniformis* MIC004 belongs to a new Sequence Type (ST59).

Figure 4: **Growth kinetics of *Bacillus licheniformis* MIC004 in the absence or presence of CGRP 10^{-6} M.** The experiments were performed in Tryptic Soy Broth (TSB) culture medium during 24 h at 37 °C. Results are the mean of three independent experiments.

Figure 5: **Effect of CGRP 10^{-6} M on the biofilm formation activity of *Bacillus licheniformis* MIC004** on (**A**) PVC (hydrophobic surface), measured by the crystal violet technique after 24 h of incubation at 37 °C (ns = not significantly different) and (**B**) on glass (polar surface), visualized by confocal laser scanning microscopy after 24 h of incubation.

Figure 6: **Effect of CGRP 10^{-6} M on the antibiotic susceptibility and cytotoxicity of *Bacillus licheniformis* MIC004.** (**A**) Minimum inhibitory concentration was determined according to the EUCAST 2023 guidelines using Norfloxacin (N), Ciprofloxacin (Ci), Clindamycin (Cl), Meropenem (M), Vancomycin (V), Erythromycin (E), Linezolid (L), and Rifampicin (R). Controls including Mueller Hinton broth (MH) and *B. licheniformis* (MIC004) were also included. Results were calculated as the mean values of three independent experiments and are summarized in Table 1. (**B**) Determination of control and CGRP-treated *B. licheniformis* MIC004 cytotoxicity on HaCaT cells after 2 h and 16 h of infection at an MOI of 50:1. Results were expressed as percentage of control cytotoxicity and represent the mean values ± SEM of at least four independent experiments. (ns = not significantly different).

Figure 7: **Effect of *Bacillus licheniformis* MIC004 pre-treated or not with CGRP 10^{-6} M on mRNAs expression by HaCaT cells**. (**A**) mRNAs under- (Red) or over-expressed (Green) in HaCaT cells exposed to control *B. licheniformis* in comparison to non-infected HaCaT cells. (**B**) mRNAs under- (Red) or over-expressed (Green) in HaCaT cells exposed to CGRP-treated *B. licheniformis* in comparison to HaCaT cells exposed to non-treated *B. licheniformis*. mRNAs showing non-significant variations (Fold change <1.5 and adjusted p-value > 0.05) appear in grey. Codes correspond to encoded proteins identified from the NCBI Gene data bank.

Figure 1

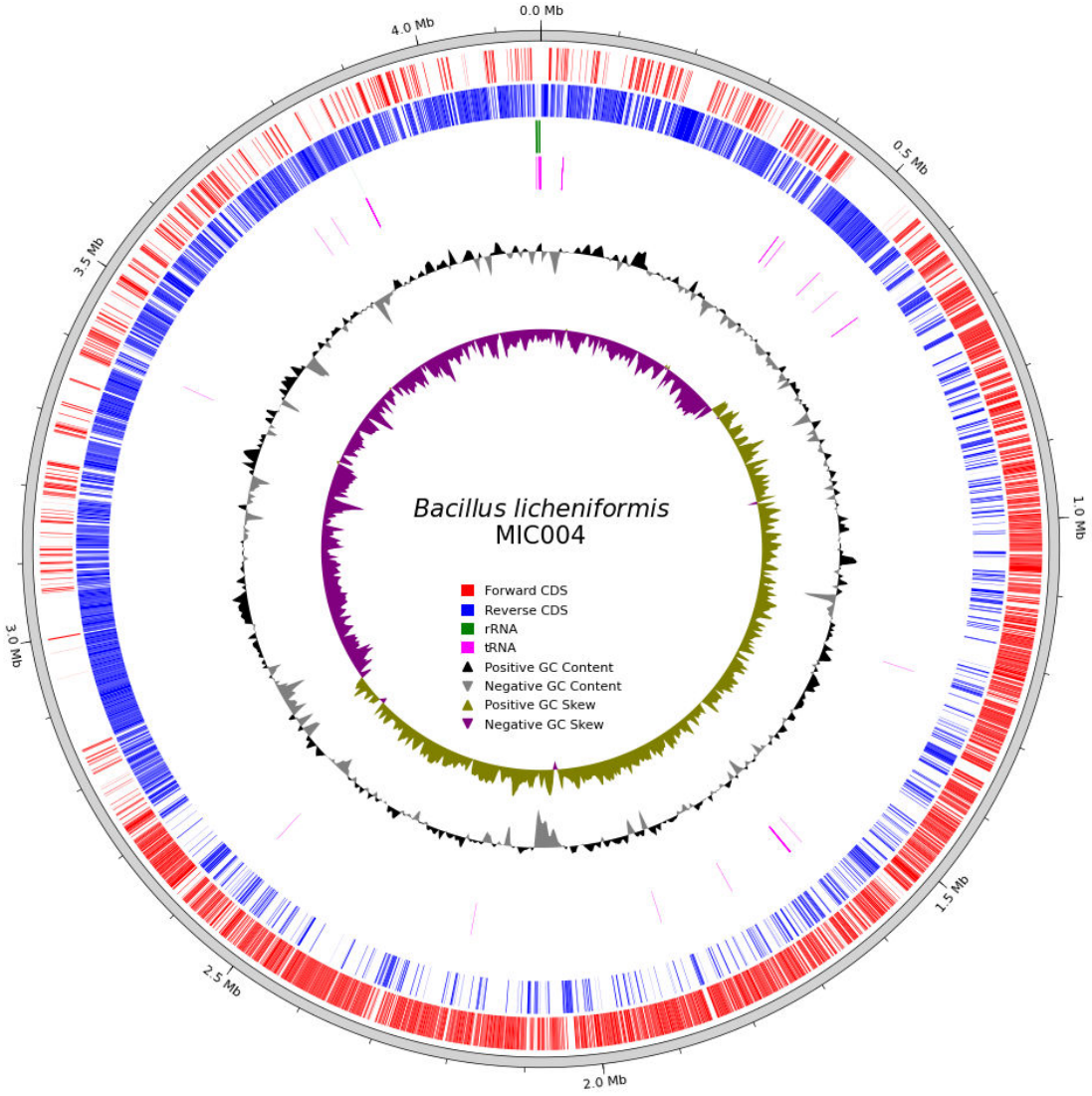
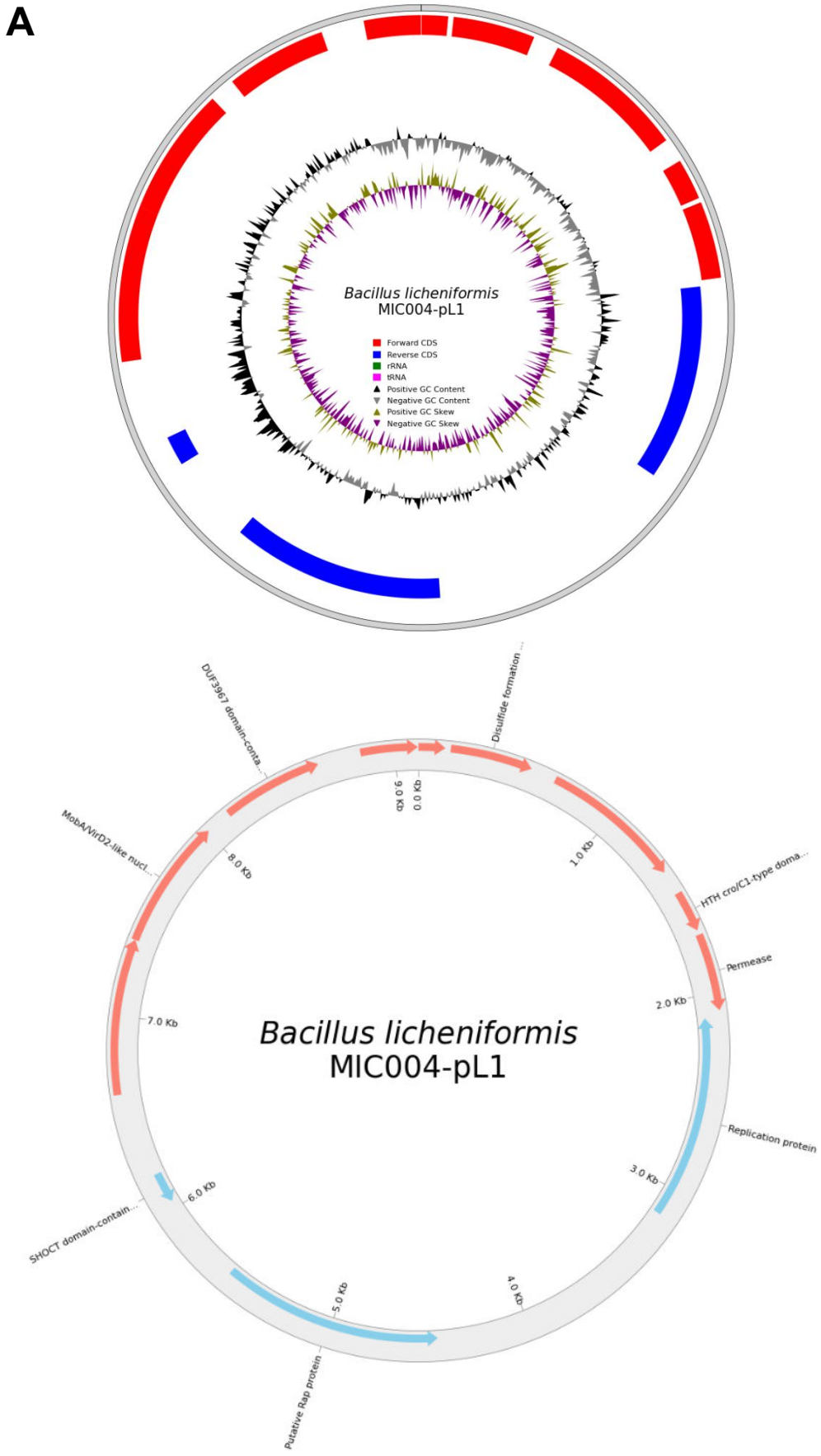
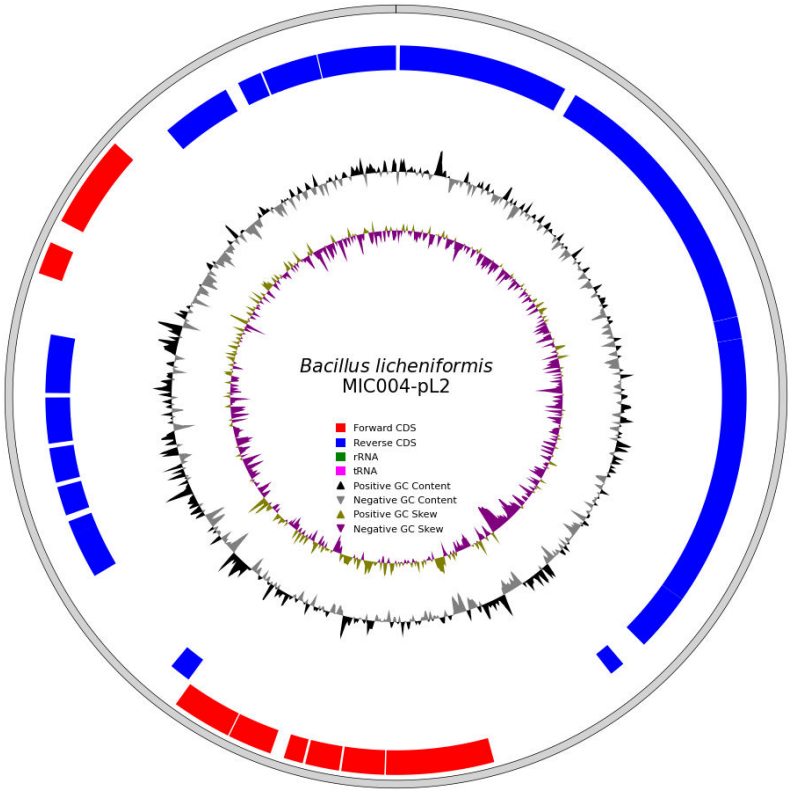

0.0 Mb
0.5 Mb
1.0 Mb
1.5 Mb
2.0 Mb
2.5 Mb
3.0 Mb
3.5 Mb
4.0 Mb
Bacillus licheniformis
MIC004
Forward CDS
Reverse CDS
rRNA
tRNA
Positive GC Content
Negative GC Content
Positive GC Skew
Negative GC Skew

Figure 2


A
Bacillus licheniformis
MIC004-pL1
Forward CDS
Reverse CDS
rRNA
tRNA
Positive GC Content
Negative GC Content
Positive GC Skew
Negative GC Skew
Bacillus licheniformis
MIC004-pL1
DUF3967 domain-conta...
Disulfide formation ...
MobA/VirD2-like nucl...
HTH croiC1-type doma...
Permease
Replication protein
SHOCT domain-contain...
Putative Rap protein
0.0 Kb
1.0 Kb
2.0 Kb
3.0 Kb
4.0 Kb
5.0 Kb
6.0 Kb
7.0 Kb
8.0 Kb
9.0 Kb

B


Bacillus licheniformis
MIC004-pL2
Forward CDS
Reverse CDS
rRNA
tRNA
Positive GC Content
Negative GC Content
Positive GC Skew
Negative GC Skew

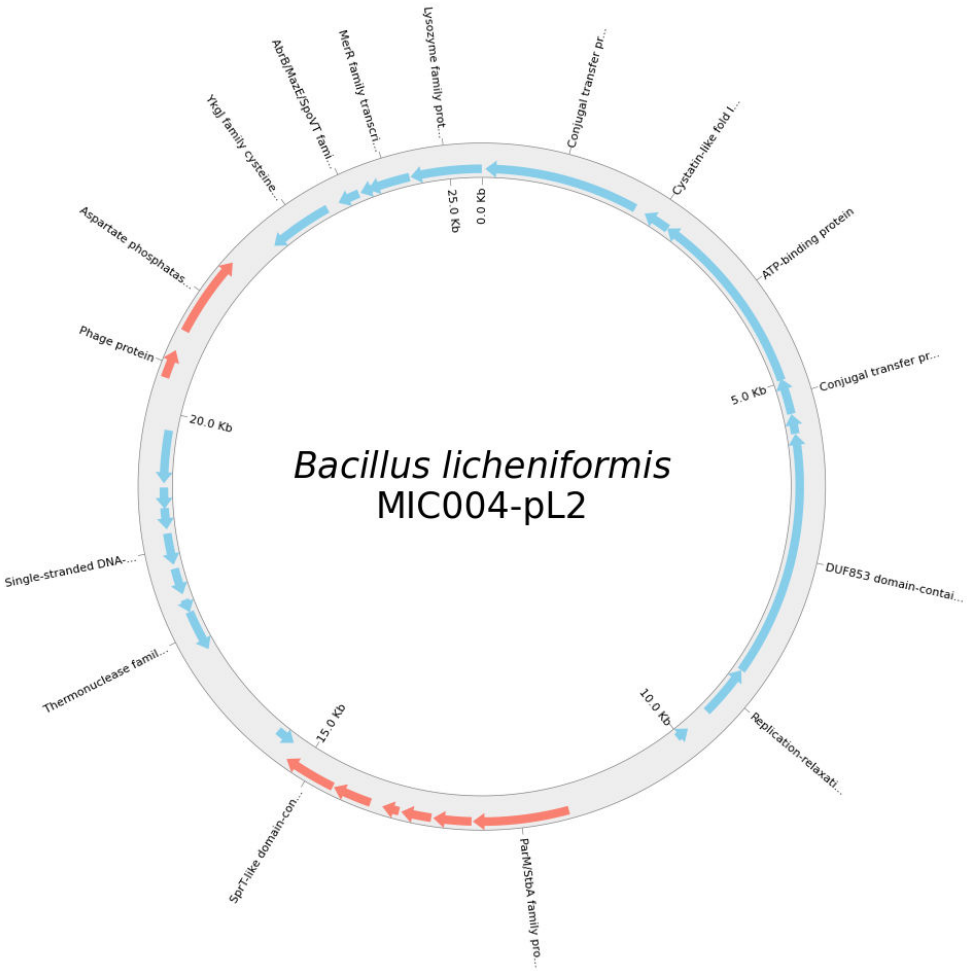

Bacillus licheniformis
MIC004-pL2
0 Kb
5.0 Kb
10.0 Kb
15.0 Kb
20.0 Kb
25.0 Kb
Lysozyme family prot...
Conjugal transfer pr...
Cystatin-like fold l...
ATP-binding protein
Conjugal transfer pr...
DUF853 domain-contai...
Replication-relaxati...
ParM/StbA family pro...
SprT-like domain-con...
Thermonuclease famil...
Single-stranded DNA-...
Phage protein
Aspartate phosphatas...
YkgJ family cysteine...
AbrB/MazE/SpoVT fami...
MerR family transcri...

Figure 3

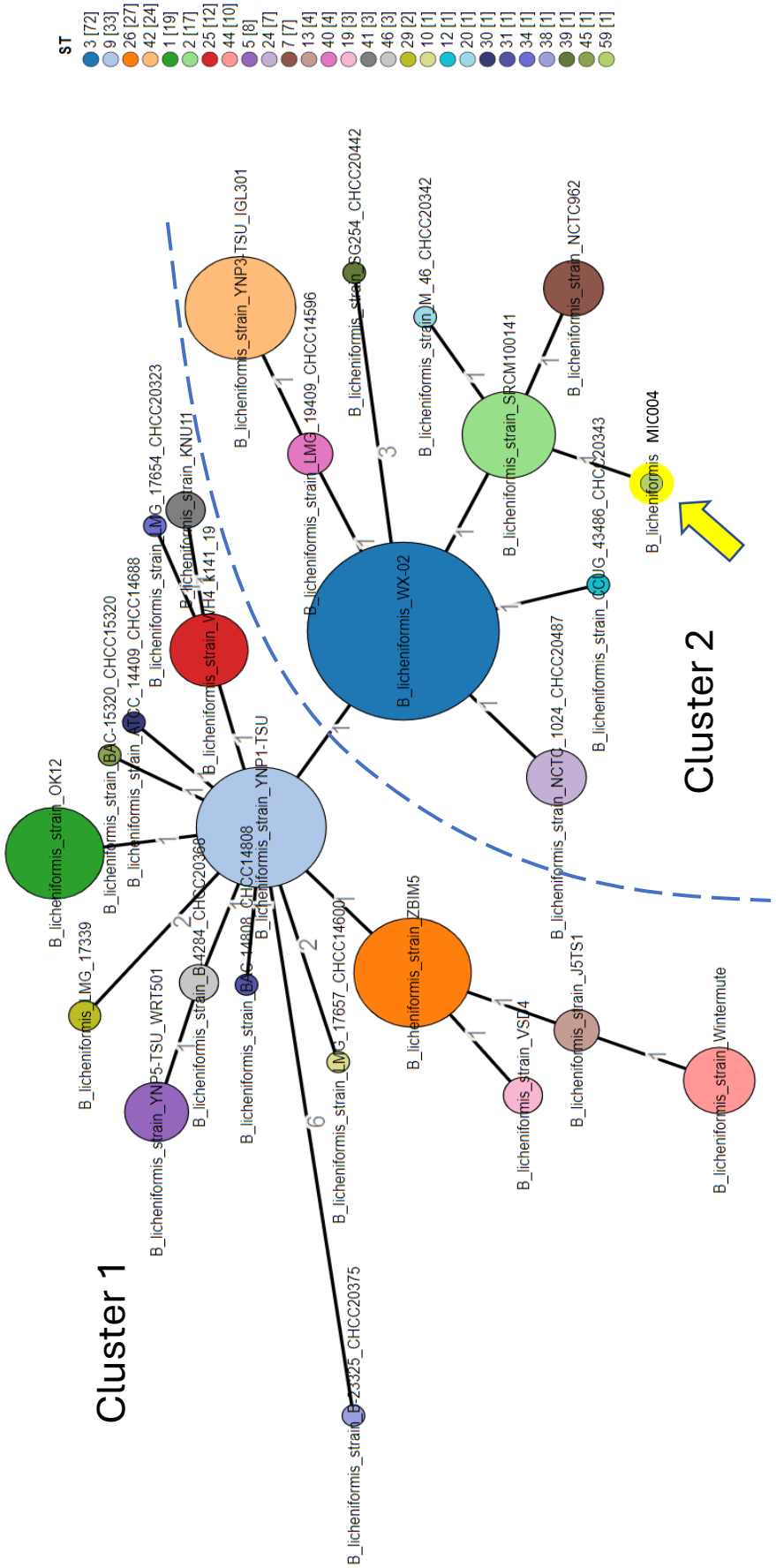

ST
3 [72]
9 [33]
26 [27]
42 [24]
1 [19]
2 [17]
25 [12]
44 [10]
5 [8]
24 [7]
7 [7]
13 [4]
40 [4]
19 [3]
41 [3]
46 [3]
29 [2]
10 [1]
12 [1]
20 [1]
30 [1]
31 [1]
34 [1]
38 [1]
39 [1]
45 [1]
59 [1]
Cluster 1
Cluster 2
B_licheniformis_strain_OK12
B_licheniformis_strain_BAC-15320_CHCC15320
B_licheniformis_strain_ATCC_14409_CHCC14688
B_licheniformis_strain_LMG_17654_CHCC20323
B_licheniformis_strain_KNU11
B_licheniformis_strain_YNP3TSU_IGL301
B_licheniformis_strain_LMG_19409_CHCC14596
B_licheniformis_strain_SG254_CHCC20442
B_licheniformis_strain_M_46_CHCC20342
B_licheniformis_strain_NCTC962
B_licheniformis_strain_SRCM100141
B_licheniformis_strain_MIC004
B_licheniformis_strain_CCUG_43486_CHCC20343
B_licheniformis_WX-02
B_licheniformis_strain_WH4_k141_19
B_licheniformis_strain_YNP1-TSU
B_licheniformis_strain_NCTC_1024_CHCC20487
B_licheniformis_strain_LMG_17339
B_licheniformis_strain_YNP5-TSU_WRT501
B_licheniformis_strain_B4284_CHCC20368
B_licheniformis_strain_BAC_14808_CHCC14808
B_licheniformis_strain_LMG_17657_CHCC14600
B_licheniformis_strain_ZBIM5
B_licheniformis_strain_VSD4
B_licheniformis_strain_J5TS1
B_licheniformis_strain_Wintermute
B_licheniformis_strain_DF23325_CHCC20375

Figure 4

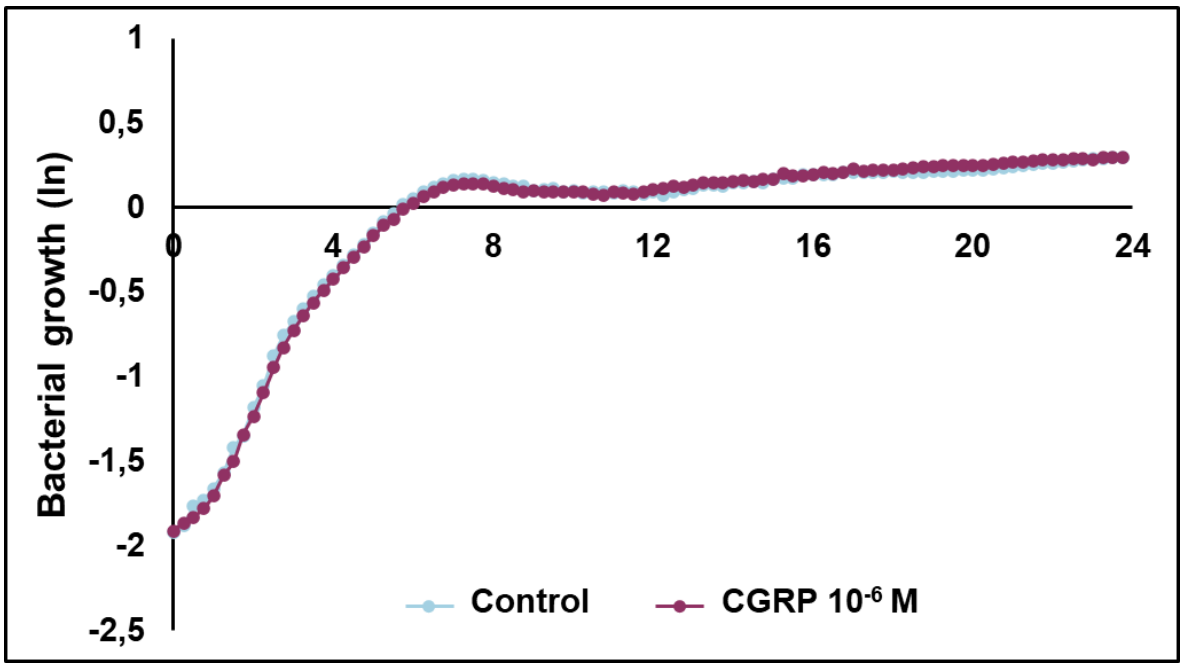

Bacterial growth (ln)
1
0,5
0
-0,5
-1
-1,5
-2
-2,5
0
4
8
12
16
20
24
Control
CGRP 10-6 M

Figure 5

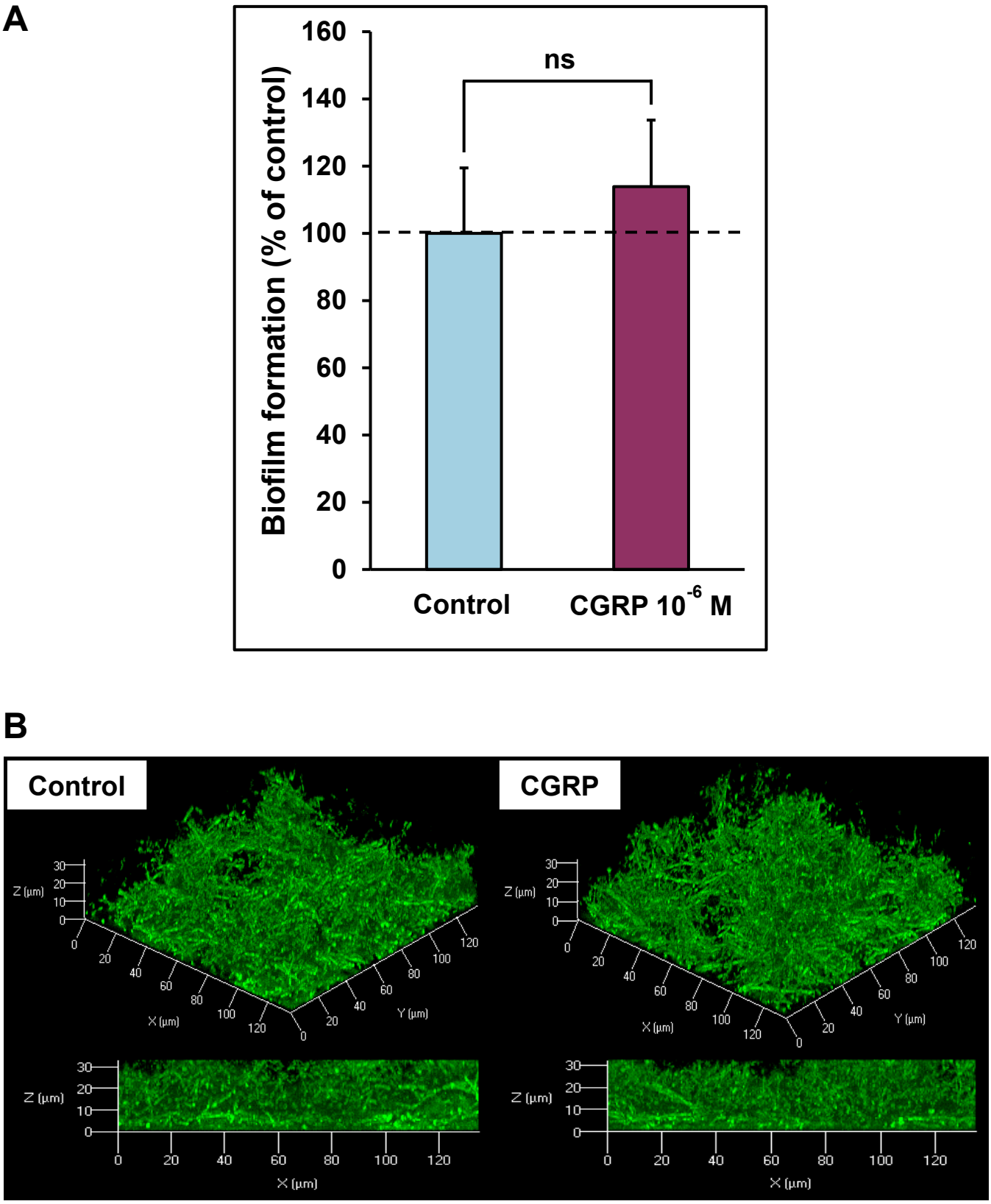

A
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Biofilm formation (% of control)
ns
Control
CGRP 10-6 M
B
Control
CGRP
Z (µm)
X (µm)
Y (µm)

Figure 6

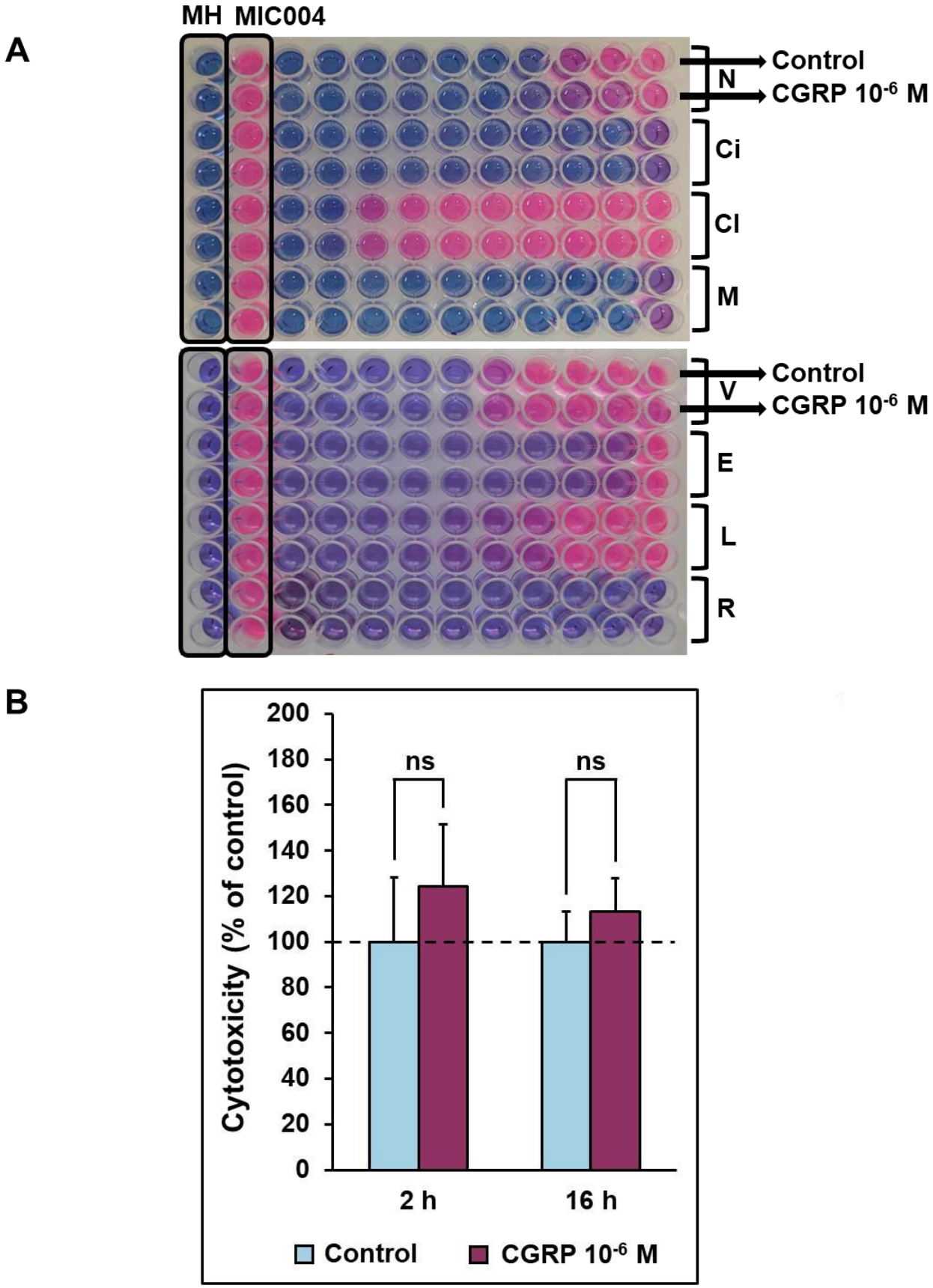
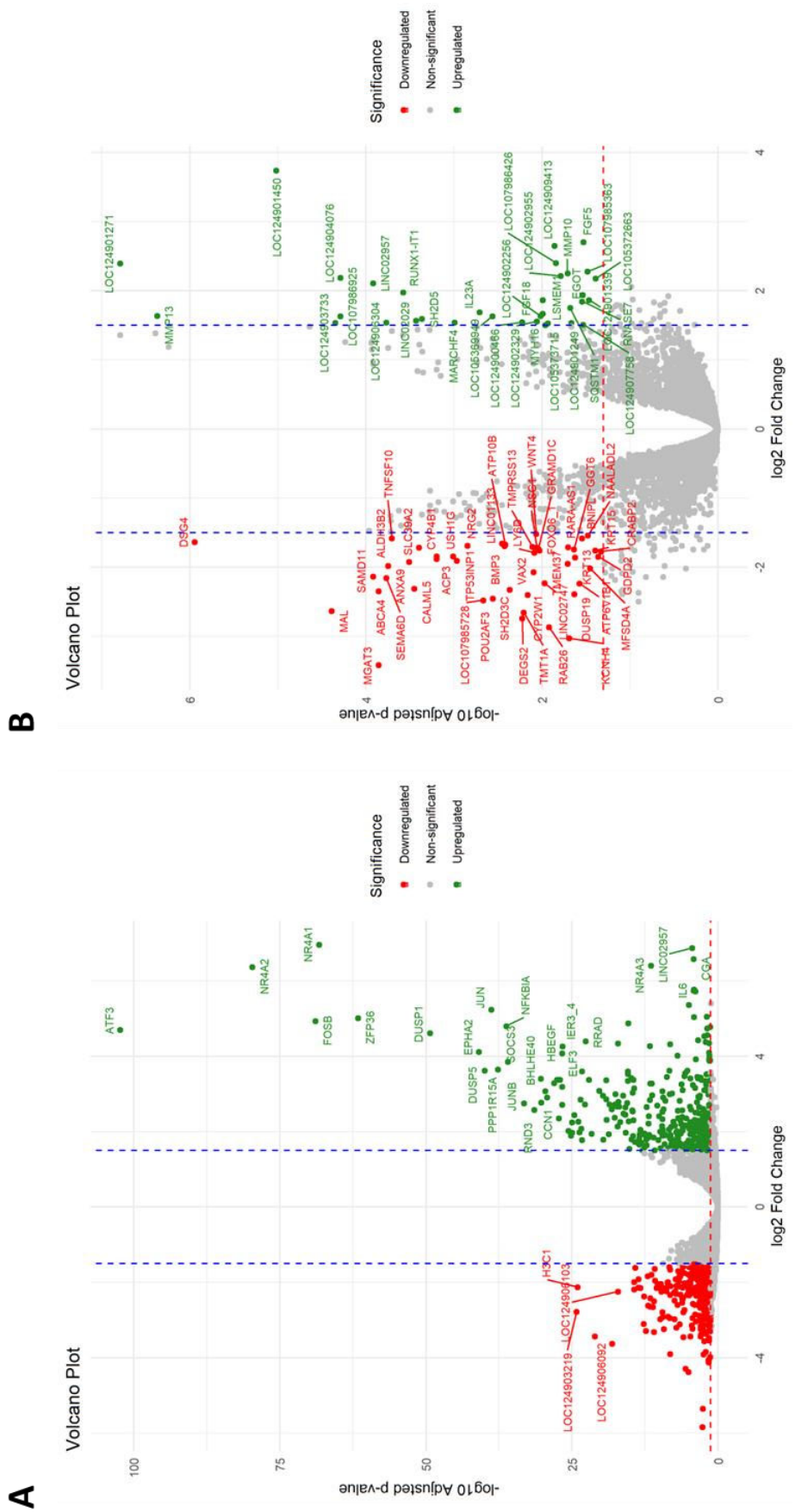

A
MH MIC004
Control
N
CGRP 10-6 M
Ci
Cl
M
Control
V
CGRP 10-6 M
E
L
R
B
Cytotoxicity (% of control)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ns
ns
2 h
16 h
Control
CGRP 10-6 M

Figure 7


A
Volcano Plot
Significance
Downregulated
Non-significant
Upregulated
-log10 Adjusted p-value
log2 Fold Change
ATF3
NR4A2
NR4A1
FOSB
ZFP36
DUSP1
EPHA2
JUN
DUSP5
SOCS3
NFKBIA
PPP1R15A
JUNB
BHLHE40
HBEGF
RND3
CCN1
ELF3
IER3_4
RRAD
NR4A3
LINC02957
IL6
CGA
H3C1
LOC124903219
LOC124906103
LOC124906092
B
Volcano Plot
Significance
Downregulated
Non-significant
Upregulated
-log10 Adjusted p-value
log2 Fold Change
LOC124901271
MMP13
LOC124901450
LOC124904076
LOC124903733
LOC107986925
LOC124906304
LINC02957
LINC00029
RUNX1-IT1
SH2D5
MARCHF4
IL23A
LOC124900466
LOC124902256
LOC107986426
LOC124902329
FGF18
LOC124902955
MYH15
LOC124909413
LOC105371871
LSMEM1
MMP10
EGOT
FGF5
SQSTM1
LOC124907758
RNASE7
LOC105372663
DSG4
SAMD11
ALDH3B2
TNFSF10
ABCA4
ANXA9
SLC39A2
MAL
SEMA6D
CALML5
CYP4B1
USH1C
ACP3
MGAT3
LOC107985728
TP53INP1
NRG2
POU2AF3
BMP3
LINC01133
ATP10B
SH2D3C
VAX2
LY6D
TMPRSS13
NSG1
WNT4
DEGS2
PIP2W1
TMEM37
FOXD6
GRAMD1C
TMT1A
LINC02747
RAB26
RARRES1
DUSP19
KRT13
RNIPL
GGT6
KCNH4
ATP6V1B1
KRT15
NAALADL2
MFSD4A
GDPD2
CLMP

Legends to the supplementary tables

Supplementary Table 1: List of identified genes over- and under-expressed in HaCaT cells exposed to control *B. licheniformis* in comparison to non-infected HaCaT cells (fold change ≥ 3 and p-value < 0.05).

Supplementary Table 2: List of identified genes over- and under-expressed in HaCaT cells exposed to CGRP-treated *B. licheniformis* in comparison to HaCaT cells exposed to control bacteria (fold change ≥ 1.5 and p-value < 0.05). Identified genes that are up- or down-regulated in both HaCaT cells exposed to control and CGRP-treated bacteria are shown in blue boxes.

Supplementary Table 1

Symbol	Full Name	log 2 Fold Change	Adjusted p-value
Upregulated genes			
AREG	Amphiregulin	3.034886971	2.69363026511735e-15
ATF3	Activating transcription factor 3	4.699409376	5.15061243893813e-103
BHLHE40	Basic helix-loop-helix family member e40	3.399311252	4.92507120259207e-31
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	3.244484227	0.00991814134097077
C10orf55	Chromosome 10 putative open reading frame 55	3.01547614	1.29716820452223e-08
C11orf96	Chromosome 11 open reading frame 96	3.519120283	0.0110633488378426
CD55	CD55 molecule (Cromer blood group)	3.289079402	9.11100392026213e-29
CGA	Glycoprotein hormones, alpha polypeptide	6.575224748	7.03917812781377e-05
CSF2	Colony stimulating factor 2	4.009764043	0.0354278596337404
CSF3	Colony stimulating factor 3	3.886807086	0.0434148065530869
CXCL1	C-X-C motif chemokine ligand 1	4.424125718	0.000392715751612848
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	5.365057727	1.03884254891038e-05
CXCL3	C-X-C motif chemokine ligand 3	4.562103142	0.0145580117656689
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	5.053531961	0.0126287084977355
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	4.607459594	5.10452973970879e-50
DUSP2	Dual specificity phosphatase 2	3.079530541	5.11244122868157e-21
DUSP5	Dual specificity phosphatase 5	3.620189926	1.14667480549172e-40
EDN1	Endothelin 1	3.370448858	3.23220830100603e-15
EDN2	Endothelin 2	3.530485027	0.0136171646101334
EGR2	Early growth response 2	3.599876064	3.7726545946238e-16
EGR3	Early growth response 3	3.37079286	7.89016049689418e-23
ELF3	E74 like ETS transcription factor 3	3.592589659	5.15039488291604e-24
EPHA2	EPH receptor A2	4.109565816	1.2243956954229e-41
FGF19	Fibroblast growth factor 19	3.414108244	1.73144698549318e-05
FOSB	FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	4.93362487	1.3672053208891e-69
GADD45B	Growth arrest and DNA damage inducible beta	3.370012413	3.08865382157157e-28

GATA6-AS1	GATA6 antisense RNA 1 (head to head)	3.103844025	9.40418321870389e-07
GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	3.452079046	1.67076994520165e-09
HAND1	Heart and neural crest derivatives expressed 1	3.468027791	1.77125902057947e-06
HBEGF	Heparin binding EGF like growth factor	4.077910624	2.05988810016082e-27
HCST	Hematopoietic cell signal transducer	4.092491124	0.0293939125275889
IER3_4	Immediate early response 3	4.258718875	2.40844259616156e-27
IER3-AS1_4	IER3 antisense RNA 1	4.771492815	0.0462364807767106
IGFL1	IGF like family member 1	3.530467803	3.9119432114989e-16
IL1B	Interleukin 1 beta	3.13428582	0.0146705108625803
IL6	Interleukin 6	5.767011332	8.30427442734877e-05
IL6-AS1	IL6 antisense RNA 1	4.348796434	0.0306144874252557
JUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	5.235145137	1.68673986983969e-39
KRT42P	Keratin 42, pseudogene	4.013521763	1.18294249525791e-07
LIF	LIF interleukin 6 family cytokine	3.275363584	2.55985694102491e-12
LINC00887	Long intergenic non-protein coding RNA 887	4.337272406	8.28425777461282e-18
LINC02957	Long intergenic non-protein coding RNA 2957	6.869812312	4.0203443714914e-05
LOC101928004	Uncharacterized	3.618369147	6.04781776167477e-06
LOC101928156	Uncharacterized	3.427456509	0.00104562591030908
LOC105369583	Uncharacterized	3.908635277	0.0284414330279227
LOC105370964	Uncharacterized	4.876233601	4.75020394227378e-16
LOC105376146	Synapsin-1	3.415277951	0.000399384813475711
LOC105376342	Uncharacterized	3.62097231	4.84486868017939e-09
LOC105376475	Uncharacterized	3.447772825	0.000304475646280577
LOC107984510	Uncharacterized	3.922131915	0.000170051616578277
LOC107984952	Uncharacterized	4.738284758	0.015490598719399
LOC112268102	Uncharacterized	3.877858161	0.0361475860345423
LOC124901321	Uncharacterized	4.376268102	0.00805736271437037
LOC124901620	Uncharacterized	3.102384036	0.00476576409446388
LOC124902175	Uncharacterized	3.279081797	4.96758291870973e-12

LOC124902454	Uncharacterized	3.36244378	0.0491480625467054
LOC124902739	Uncharacterized	3.539989885	0.0390559948383283
LOC124904076	Uncharacterized	5.71813694	0.000144912349725002
LOC124904251	Uncharacterized	3.154968709	0.000122842339994247
LOC124904534	Uncharacterized	3.071713949	2.99317992993315e-10
MAFF	MAF bZIP transcription factor F	3.149955428	4.82784095770637e-15
MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	3.074821418	2.68179560052492e-30
MIR212	MicroRNA 212	4.314824883	6.85698369138236e-09
MIR3191	MicroRNA 3191	3.007901169	0.0256146454297675
MIR637	MicroRNA 637	3.368813405	0.00152413458189863
MIR9902-2	MicroRNA 9902-2	3.342207808	0.00670512708809091
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	4.792112882	5.7591383324753e-37
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	3.373874305	9.64755199364486e-28
NPTX1	Neuronal pentraxin 1	3.240785405	4.76691854797085e-05
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1	6.96125881	5.50618980028406e-69
NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	6.366871619	1.88686439905983e-80
NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3	6.401968489	3.38208768238243e-12
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	3.444782522	0.000499954266681096
PPP1R15A	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A	3.64695301	2.08190537774782e-38
PRDM1	PR/SET domain 1	3.42306178	1.32371119819756e-15
RASD1	Ras related dexamethasone induced 1	4.266445328	2.30953781596713e-12
RHCG	Rh family C glycoprotein	5.743610019	6.50831366123205e-05
RNVU1-18	RNA, variant U1 small nuclear 18	4.529951182	0.00427750452746768
RRAD	RRAD, Ras related glycolysis inhibitor and calcium channel regulator	4.395649221	2.23051337546656e-23
SIK1	Salt inducible kinase 1	3.183311451	2.18025175151447e-27
SLC2A3	Solute carrier family 2 member 3	3.342591722	3.70907287619266e-16
SLC6A7	Solute carrier family 6 member 7	3.547719848	2.47274315562732e-06

SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	3.849054446	1.06242353344251e-36
SPRY4	Sprouty RTK signaling antagonist 4	3.36519668	7.0806468534043e-20
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	5.03703345	7.64668639395269e-05
TUBB2B	Tubulin beta 2B class IIb	3.258982112	5.78156915457887e-07
ZFP36	ZFP36 ring finger protein	5.012267907	2.60994662684802e-62

Symbol	Full Name	log 2 Fold Change	Adjusted p-value
Downregulated genes			
GRK6P1	G protein-coupled receptor kinase 6 pseudogene 1	-3.004724624	0.000941642772694943
HEXD-IT1	HEXD intronic transcript 1	-4.081175151	0.022414892045697
LOC105369477	Uncharacterized	-3.435804392	8.88302133762339e-22
LOC105373527	Uncharacterized	-5.360477263	0.00254965875033804
LOC105374800	Uncharacterized	-4.045777342	0.0286690110854261
LOC105374945	Uncharacterized	-3.504285321	0.0264716333089101
LOC105375631	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein-like	-3.127126392	0.0127548626562494
LOC105376025	Uncharacterized	-3.234547423	4.61016670839943e-05
LOC107986401	Uncharacterized	-3.241564068	5.18002556001038e-10
LOC112268025	Uncharacterized	-4.297772111	2.97387560237687e-06
LOC124900337	Uncharacterized	-3.480548492	0.0318133052947044
LOC124900780	Uncharacterized	-3.183398077	0.0475172286131847
LOC124900944	Uncharacterized	-3.84604756	0.00830204803085192
LOC124901767	Uncharacterized	-3.030776556	0.00168288525553892
LOC124902669	Translation initiation factor IF-2-like	-3.203136992	0.0023690977684725
LOC124903222	Uncharacterized	-3.039480889	0.000174211056855496
LOC124903412	Uncharacterized	-3.909935859	6.07260501930307e-09
LOC124903817	Uncharacterized	-3.567025504	0.00470550277316852
LOC124904775	Uncharacterized	-3.452681474	1.14869000995717e-06
LOC124905087	Uncharacterized	-3.317100075	1.16123942520727e-11
LOC124905191	Uncharacterized	-3.186497107	0.0340929120193268
LOC124906092	Uncharacterized	-3.62914583	7.60684150692155e-19
LOC124907850	Uncharacterized	-3.118200667	2.62077210958972e-07
LOC124909468	Uncharacterized	-3.202412435	7.2043940446913e-08

LOC729609	Uncharacterized	-3.157507788	0.0380166302450944
MFSD2B	MFSD2 lysolipid transporter B, sphingolipid	-3.979096475	0.0440322371282589
MICOS10P1	MICOS10 pseudogene 1	-4.382964288	9.26752804612072e-06
MIR219B	MicroRNA 219b	-3.045005674	0.0290720282638405
MIR6739	MicroRNA 6739	-3.434815195	1.94989493718691e-05
MIR6767	MicroRNA 6767	-3.300725028	0.0485387641226779
MIR8075	MicroRNA 8075	-3.439750998	0.00104562591030908
MMP12	Matrix metallopeptidase 12	-3.021710217	0.0497584532255008
MROH2A	Maestro heat like repeat family member 2A	-3.387030867	0.00116512476010189
NTN3	Netrin 3	-3.369985792	0.00836419693753541
RAPSN	Receptor associated protein of the synapse	-3.077532109	0.00165104385051016
SEPT5-GP1BB	SEPT5-GP1BB readthrough	-3.143323358	3.26014817669618e-05
SNORA30	Small nucleolar RNA, H/ACA box 30	-3.544341211	0.0304046410842443
SNORD160	Small nucleolar RNA, C/D box 160	-3.168115781	0.00110861530346018
SNORD173	Small nucleolar RNA, C/D box 173	-3.206638399	0.0335369504294711
TSSK1B	Testis specific serine kinase 1B	-3.303975011	0.00447081279386763
ZKSCAN2-DT	ZKSCAN2 divergent transcript	-3.107027788	1.87138533729646e-13

Supplementary Table 2

Symbol	Full Name	log2 Fold Change	Adjusted p-value
Upregulated genes			
EGOT	Eosinophil granule ontogeny transcript	1.9387551457045	0.0289689957743181
FGF18	Fibroblast growth factor 18	1.86357673295054	0.0102286928845173
FGF5	Fibroblast growth factor 5	2.7025002838303	0.0295837456455505
IL23A	Interleukin 23 subunit alpha	1.68774424949202	0.00196242709847104
LINC02029	Long intergenic non-protein coding RNA 2029	1.56692592839281	0.000370644222878131
LINC02957	Long intergenic non-protein coding RNA 2957	2.10590466102674	0.000121184625617345
LOC105369949	Uncharacterized	1.62815845707732	0.00273218068509877
LOC105372663	Uncharacterized	2.17572018627122	0.0407207633969131
LOC105373715	Uncharacterized	1.52593966342287	0.0116426038877413
LOC107985363	Uncharacterized	2.27362817656049	0.0329859822093217
LOC107986426	Uncharacterized	2.39925944192428	0.0144655557107052
LOC107986925	Uncharacterized	1.63050121560515	5.15923847002366e-05
LOC124900466	Uncharacterized	1.5423428112405	0.00595704387693048
LOC124901249	Uncharacterized	1.53526448296322	0.0217078277305384
LOC124901271	Uncharacterized	2.39466490612296	1.62527371533137e-07
LOC124901339	Uncharacterized	1.86352983254635	0.0343161193750084
LOC124901450	Uncharacterized	3.7347954986018	9.59847302827842e-06
LOC124902256	Uncharacterized	1.6313474557706	0.00961802663653669
LOC124902329	Uncharacterized	1.55471346720262	0.00876042056741977
LOC124902955	HMGA2 antisense RNA 2	2.21012278625911	0.0163382083112671
LOC124903733	Uncharacterized	1.53001427776844	4.5025017611641e-05
LOC124904076	Uncharacterized	2.18492704432362	5.15923847002366e-05
LOC124906304	Uncharacterized	1.53764171611748	0.00017067546222227
LOC124907758	Uncharacterized	1.50516929910157	0.0293430470607144
LOC124909413	Uncharacterized	2.64961280105255	0.0138952304293414
LSMEM1	Leucine rich single-pass membrane protein 1	1.66310506259721	0.0102286928845173
MARCHF4	Membrane associated ring-CH-type finger 4	1.54003188216295	0.0010161294726646
MMP10	Matrix metallopeptidase 10	2.25037528890584	0.0195484159610432
MMP13	Matrix metallopeptidase 13	1.63461140149826	4.26586323972688e-07

MYH16	Myosin heavy chain 16	1.5022742287265	0.0109133178830419
RNASE7	Ribonuclease A family member 7	1.84327630436644	0.0284198807334951
RUNX1-IT1	RUNX1 intronic transcript 1	1.97124409285637	0.000266628712861733
SH2D5	SH2 domain containing 5	1.59023353457193	0.000432838150453879
SQSTM1	Sequestosome 1	1.74991800683548	0.020906775111832

Symbol	Full Name	log2 Fold Change	Adjusted p-value
Downregulated genes			
ABCA4	ATP binding cassette subfamily A member 4	-2.34993321122518	0.000139278163901993
ACP3	Acid phosphatase 3	-1.8847063036129	0.000637411914623446
ALDH3B2	Aldehyde dehydrogenase 3 family member B2	-1.98185025352533	0.000178781169203724
ANXA9	Annexin A9	-1.92758649685915	0.000311224290894052
ATP10B	ATPase phospholipid transporting 10B (putative)	-1.67632478075518	0.00384057565368781
ATP6V1B1	ATPase H+ transporting V1 subunit B1	-2.23993985702301	0.0268212505852762
BMP3	Bone morphogenetic protein 3	-1.69732018653786	0.00377008763288675
BNIPL	BCL2 interacting protein like	-1.58606335832396	0.0284198807334951
CALML5	Calmodulin like 5	-2.31462281494867	0.000356095971907105
CRABP2	Cellular retinoic acid binding protein 2	-1.77413799029035	0.0470548830923294
CYP2W1	Cytochrome P450 family 2 subfamily W member 1	-2.40476641857648	0.00688190885285226
CYP4B1	Cytochrome P450 family 4 subfamily B member 1	-1.8435355519122	0.000637411914623446
DEGS2	Delta 4-desaturase, sphingolipid 2	-2.74534440771405	0.00598270242806734
DSG4	Desmoglein 4	-1.63588879405408	1.13795892067701e-06
DUSP19	Dual specificity phosphatase 19	-2.39004353614191	0.0233006164943452
FOXO6_1	Forkhead box O6	-1.75900475040441	0.00934084171893493
GDPD2	Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 2	-1.85195816124186	0.0437500530148776
GGT6	Gamma-glutamyltransferase 6	-1.74557104164747	0.023170551383768
GRAMD1C	GRAM domain containing 1C	-1.73340126835525	0.00913218502604291
KCNH4	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 4	-3.03209314884782	0.0203903084509271
KRT13	Keratin 13	-1.86284134822957	0.0236936166661488

KRT15	Keratin 15	-1.76013104438664	0.0403660639870269
LINC01133	Long intergenic non-protein coding RNA 1133	-1.66202458804818	0.00352771262932535
LINC02747	Long intergenic non-protein coding RNA 2747	-2.233612752277	0.0107080742576197
LOC107985728	Collagen alpha-1(III) chain-like	-2.48008187354997	0.00215791927117517
LY6D	Lymphocyte antigen 6 family member D	-1.7942645093056	0.00815555232546855
MAL	Mal, T cell differentiation protein (MAL blood group)	-2.63905340263425	4.09206652035697e-05
MFSD4A	Major facilitator superfamily domain containing 4A	-2.02110079408971	0.0351658754785549
MGAT3	Beta-1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	-3.41929615794952	0.000139541950670504
NAALADL2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase like 2	-1.54276069656162	0.0333226144852054
NRG2	Neuregulin 2	-1.6915229403105	0.00142137441111683
NSG1	Neuronal vesicle trafficking associated 1	-1.71789829587897	0.00876042056741977
POU2AF3	POU class 2 homeobox associating factor 3	-2.45588974622227	0.00275524887981745
RAB26	RAB26, member RAS oncogene family	-2.87108641544493	0.0119769422794759
RARA-AS1	RARA antisense RNA 1	-1.71238220013308	0.0198988072319242
SAMD11	Sterile alpha motif domain containing 11	-2.13511088364772	0.000121184625617345
SEMA6D	Semaphorin 6D	-2.16077193439778	0.00017067546222227
SH2D3C	SH2 domain containing 3C	-2.33010602833485	0.00430200461000308
SLC39A2	Solute carrier family 39 member 2	-1.7181041566092	0.000400080105935211
TMEM37	Transmembrane protein 37	-1.95284222192218	0.0195484159610432
TMPRSS13	Transmembrane serine protease 13	-1.7071060850057	0.00778576556871515
TMT1A	Thiol methyltransferase 1A	-2.65652782465898	0.00622302886281924
TNFSF10	TNF superfamily member 10	-1.58747703237717	0.00019751214183476
TP53INP1	Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	-1.90673504766754	0.00108244446751552
USH1G	USH1 protein network component sans	-1.84502415387284	0.000980660145253737
VAX2	Ventral anterior homeobox 2	-2.07201227046893	0.00800435871247807
WNT4	Wnt family member 4	-1.5202171904371	0.00862475095235763

Contexte de l'Article 2

Les travaux de l'**Article 1** ont mis en évidence que la souche *B. licheniformis* MIC004, isolée du cuir chevelu, est sensible au Calcitonin Gene-Related Peptide. Bien que sans effet apparent sur la physiologie et la virulence bactérienne, l'infection de la lignée de kératinocytes HaCaT avec des bactéries prétraitées au CGRP résulte en une augmentation de l'expression des marqueurs de l'inflammation et une baisse de celle des kératines 13 et 15 et d'une desmogléine, impliquées dans la structure et la cohésion des cellules épidermiques. En parallèle, et afin de compléter ces observations, nous avons étudié l'effet du CGRP sur quatre autres microorganismes commensaux de la peau, *Staphylococcus capitis*, *Micrococcus luteus*, *Cutibacterium acnes* ribotype 4 (RT4, souche acnéique) et C. acnes ribotype 6 (RT6, souche non acnéique). Après exposition des bactéries au CGRP, il apparaît que la molécule n'a aucun effet sur la croissance ou la production de biofilm de ces souches. La seule exception concerne *M. luteus*, pour laquelle les premiers résultats semblent indiquer une augmentation de la biomasse et de l'épaisseur moyenne du biofilm mature. Une analyse transcriptomique, réalisée sur les ARNm totaux exprimés par les différentes souches, a révélé que le CGRP n'influe pas sur la transcription des gènes chez *S. capitis*, *C. acnes* RT4 et *C. acnes* RT6. Les analyses bioinformatiques de l'**Article 1** avait indiqué la présence de clusters de gènes responsables de la production d'une variété de métabolites secondaires chez *B. licheniformis*. Ainsi, de la même manière, il est envisageable que l'étude future des protéomes et métabolomes des autres souches puisse mettre en avant de potentiels effets du CGRP que nous n'avons, pour l'instant, pas pu identifier.

Article 2 : Re-evaluating the sensitivity of cutaneous bacteria to Calcitonin Gene-Related Peptide

Re-evaluating the sensitivity of cutaneous bacteria to Calcitonin Gene-Related Peptide

E.B.D. Hadjiev[a], A.M. Boukerb[a,b](https://orcid.org/ 0000-0002-8349-6739), R. Ismail[a,c], M. Barreau[a,b](https://orcid.org/0000-0002-9509-6054), C. Catovic[a], S. Chevalier[a,c](https://orcid.org/0000-0001-6489-438X), and M.G.J. Feuilloley[a,c] (https://orcid.org/0000-0001-6467-4336)*

[a] *Research Unit 4312 Bacterial Communication and Anti-infectious Strategies, University of Rouen Normandy, 55 rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France.*
[b] *University of Rouen Normandy, Evreux Health Safety Platform (PS2E), F-76000 Rouen, France.*
[c] *Expertise Center Cosmetomics@URN, University of Rouen Normandy, 55 rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France.*

* *e-mail*: marc.feuilloley@univ-rouen.fr

Abstract – It has been shown that the Calcitonin-Gene Related Peptide (CGRP) released in skin by cutaneous nerve terminals can modulate the physiology of *Staphylococcus epidermidis* and *Bacillus licheniformis*. In the present study we investigated the effect of CGRP on four commensal skin bacteria, *Staphylococcus capitis*, *Micrococcus luteus*, *C. acnes* ribotype 4 (RT4, acneic strain) and *C. acnes* ribotype 6 (RT6, non-acneic strain). As noted in other species CGRP barely affected the growth kinetics of these microorganisms. CGRP was also without effect on the initial adhesion and biofilm formation activity of *S. capitis*, *C. acnes* RT4 and *C. acnes* RT6. In contrast, the peptide seems to increase the biomass and average thickness of the biofilm formed by *M. luteus* but did not modify the initial adhesion of the bacterium, suggesting a modification of biofilm matrix components production. A transcriptomic analysis was performed on total mRNAs expressed by *S. capitis*, *C. acnes* RT4 and *C. acnes* RT6. CGRP does not appear as a transcriptional regulator in these bacteria, but this does not exclude a potential effect through proteins and/or metabolites expression as previously shown in *B. licheniformis*.

Keywords: Skin microbiome, Bacterial physiology**,** Microbial endocrinology, Biofilm, Transcriptomic

INTRODUCTION

The cutaneous microbiota is located for a large part (25 %) under the skin surface and particularly in annexes such as the hair follicle, sweat glands and sebaceous glands [1]. Living microorganisms have even been detected deeply into the epidermis, at the level of the *stratum basalis*, and in the absence of any infection [2]. This situation favors interactions between the skin microbiota and host tissues. Bacterial metabolites can diffuse through the epidermis and affect eukaryotic cells including keratinocytes, mastocytes and melanocytes [3]. Conversely, hormones and neurohormones are diffusing in the epidermal matrix and in sweat [4] and can reach the cutaneous microbiota. In this context we demonstrated that both Gram-positive (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Cutibacterium acnes, Bacillus cereus* and *Lactobacillus crispatus*) but also Gram-negative bacteria (*Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa*) can sense a large variety of skin hormones and neurotransmitters such as catecholamines, Substance P (SP), Calcitonin Genre-Related Peptide (CGRP), Natriuretic Peptides or 17β-estradiol released by keratinocytes, nerve endings and/or endothelial cells [5]. Demonstrating the bacterial sensitivity to these host factors is not easy since there is no bioinformatic model allowing any predictive screening. Moreover, and although a large diversity of ubiquitous bacterial proteins, including the thermo unstable ribosomal elongation factor EfTu, the chaperone protein DnaK, the amidase AmiC, the histidine kinase KdpD and the lipid rafts SPFH domain containing protein, have been identified as bacterial hormonal sensors, it is probable that post-translational modifications are required for their activity [6]. Another reason that led to ignore the sensitivity of bacteria to host hormones for a long time is that, at physiological concentrations, they rarely affect the growth kinetics of microorganisms [7]. It is then necessary to investigate the potential impact of neurohormones on the biofilm formation, the cytotoxic activity or the inflammatory potential of bacteria, but even in this case the same neuropeptide can trigger totally different metabolic responses in closely related microorganisms, as demonstrated by qRT-PCR microarray analysis of SP-treated *S. aureus* and *S. epidermidis* [8]. Sometimes, as in the case of CGRP, the absence of response of one of these species, in this case *S. aureus*, is difficult to explain since the other, *S. epidermidis*, is highly sensitive to the hormone [9]. Nevertheless, this is coherent with the observation of strain-related variability to neurohormones sensitivity even within the same species, as noted for instance in *C. acnes* with catecholamines [10]. More recently, we observed that a scalp-associated bacterium, namely *Bacillus licheniformis*, that appeared totally non-responsive to CGRP in terms of biofilm formation and cytotoxicity, was in fact sensitive to the

neurohormone when total messenger RNAs expression in HaCaT cells was investigated and showed differences following infection with control or CGRP-treated bacteria [11]. In this context, it appeared necessary to reconsider the potential response to CGRP of commensal cutaneous bacteria that were initially screened but were not investigated in detail because of their apparent lack of sensitivity to this neurohormone.

In the present study we screened the response to CGRP of four commensal human skin bacteria, *Staphylococcus capitis*, *Micrococcus luteus*, *C. acnes* ribotype 4 (RT4, acneic strain) and *C. acnes* ribotype 6 (RT6, non-acneic strain) by investigating the effect of the peptide on their growth kinetics, biofilm formation activity but also by analysis of their total messengers RNAs expression.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. *Staphylococcus capitis* MFP08 and *Micrococcus luteus* MFP06 were isolated from the skin of healthy volunteers by the CRO Bio-EC (Longjumeau, France) in agreement with French and EU Ethic guidelines (ARS Biomedical Research Agreement N°2012-12-010, Bioethic Agreement DC-2008-542) [12]. They were initially identified using API® strips, 16S ribosomal RNA gene sequencing and whole proteome analysis by MALDI-TOF mass spectrometry and Biotyper analysis (Bruker Daltonics). Both strains were grown in Tryptic Soy Broth (TSB, Merck Millipore) on a rotary shaker (180 rpm) at 37 °C. They were subsequently characterized by complete genome sequencing using the MiSeq Technology (Illumina, Inc., San Diego, California, USA) with paired-end and barcode strategy according to the Illumina DNA prep protocol (Illumina, Inc., San Diego, California, USA). DNA was quantified using a Qubit 4.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The libraries were normalized, pooled, then loaded onto the Miseq Reagent Kit v3. Cluster generation and paired-end sequencing with dual-index reads was performed in a 2 × 301 bp format. The quality of the reads was checked using FastQC (https://www.bioinformatics. babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Raw reads were trimmed using Trimmomatic [13], and genome was assembled de novo with Unicycler [14]. Assembly quality control was realized with Quast [15]. The completeness of the assembled genome was checked using CheckM v1.2.2 [16], indicating 0 % contamination for both strains and 99.81 % completeness at the genus level for *S. capitis*.

Cutibacterium acnes ribotype 4 (RT4) 516 (HL045PA1/HM-516) and *Cutibacterium acnes* ribotype 6 (RT6) 554 (HL110PA3/HM-554) initially isolated by Fitz-Gibbon [17] were obtained from BEI Resources American Type Culture Collection (Virginia, United States). *C. acnes* RT4 516 is a typical acneic strain of phylotype IA1 whereas *C. acnes* RT6 554 is a non-acneic strain of phylotype II [18]. These strains were stored at -80 °C on microbeads. They were grown in reinforced clostridial medium (RCM) at 37 °C under anoxic condition using the BD GasPack^{TM} System or a A35 Don Whitley anaerobic workstation (Don Whitley, Bingley, United Kingdom).

For physiological studies, bacteria cultured at 30 °C (for *M. luteus*) or 37 °C, with or without the neurohormone, were collected at the end of the exponential growth phase. Growth was monitored by spectrophotometry at 580 nm. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP, CAS number 90954-53-3) was obtained from Tocris (Catalog No. 3012; Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom). The peptide, diluted in sterile water, was added at the beginning of the culture at a concentration of 10^{-6} M. This concentration was selected in coherence with the previous study on *B. licheniformis* [11].

Growth kinetics studies. For *S. capitis* and *M. luteus*, bacterial growth was monitored at 580 nm using a temperature-controlled microplate reader (Bioscreen C Oy Growth Curves Ab Ltd., Turku, Finland). An inoculum was added into 96-well-flat-bottomed plates (Thermo Fisher Scientific) to an initial OD_{580} = 0.08 and in the presence or absence of CGRP 10^{-6} M. Plates were incubated at 37 °C or 30 °C respectively for *S. capitis* and *M. luteus*, under constant shaking, and optical density was determined automatically every 15 to 30 minutes during 24 to 48 h. For *C. acnes*, cultures were grown under static anoxic conditions, with or without CGRP 10^{-6} M, and plated on RCM agar over a 72 h incubation period at 37°C. Growth curves were determined over three independent experiments.

Biofilm formation studies. Biofilms were grown in 24-well plates with flat glass bottoms (Sensoplate, Greiner Bio-One, Germany). Control and CGRP-treated bacteria were harvested at the end of the exponential growth phase, collected by centrifugation (7500 x g, 10 minutes) and washed with sterile physiological water (9 g/L NaCl, Thermo Fisher Scientific, pH 7) to remove all traces of medium and free peptide. A volume of 300 µL bacterial suspension, adjusted to an OD_{580} = 0.1 in sterile physiological water, was transferred to the wells of the plate and incubated for 2 h to allow the initial adhesion. Physiological water was then replaced with 500 µL or 1 mL fresh medium (TSB or RCM following the bacteria), with or without CGRP 10^{-6} M, and the plates were incubated in static conditions for 22 h in the case

of *Staphylococcus capitis* MFP08, 46 h for *Micrococcus luteus* MFP06 or 70 h in the case of *Cutibacterium acnes* RT4 and *Cutibacterium acnes* RT6. At the end of the incubation time, the wells were washed twice with sterile physiological water and the biofilms were stained with 5 µM SYTO^{TM} 9 green fluorescent nucleic acid stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for 15 minutes at room temperature. Stained samples were fixed with ProLong^{TM} Diamond Antifade Mountant (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Biofilms were observed using a Zeiss LSM710 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a 63x oil immersion objective. Bacteria were detected by monitoring SYTO^{TM} 9 fluorescence with excitation and emission wavelengths of 485 nm and 495-550 nm respectively. Images were taken at 0.65 µM intervals throughout the entire depth of the biofilm. Three-dimensional (3D) imaging data were visualized and processed with Zen 2.1 software (Zeiss, Germany). Quantification of biovolume, average thickness and roughness coefficient were performed using the Comstat2 software [www.comstat.dk; 19-20]. For the initial bacterial adhesion, the percentage of covered surface was determined using the ImageJ software [21].

Bacteria transcriptomic studies. Total RNA was extracted from frozen bacteria exposed or not to CGRP 10^{-6} M, from the onset of the experiment to the end of the exponential growth phase, using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and following the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using a Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and its integrity was assessed using a 5600 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

rRNAs were depleted using the NEBNext rRNA Depletion Kit for Bacteria (NEB, Ipswich, MA, USA). Libraries were prepared and raw reads were analyzed as previously described [11].

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated with unpaired (two samples) two-tailed t tests. Means and the Standard Error of the Mean (SEM) were calculated and plotted.

RESULTS

Growth kinetics studies. As previously observed in *S. aureus* and *S. epidermidis* [22], CGRP 10^{-6} M was without effect on the growth kinetics of *S. capitis* MFP08 (**Figure 1**), with a generation time of 67.2 ± 1.5 (control) and 67.7 ± 1.7 (CGRP-treated) minutes. The latency period, slope of the exponential growth phase and level of the stationary phase of *M. luteus* MFP06 and *C. acnes* RT4 516 were also identical in the absence or presence of CGRP 10^{-6} M.

Generation times were of 170.5 ± 16.1 and 166.5 ± 13.9 min for control and CGRP-treated *M. luteus* MFP06, while they were of 327.4 ± 50.9 and 325.3 ± 49.6 min for control and CGRP-treated *C. acnes* RT4 516. *C. acnes* RT6 554 showed a minor shift of the lag time that is reflected in the generation time, 156.8 ± 77.3 (control) and 266.3 ± 26.7 (CGRP-treated) minutes, due to variability in between the replicates from the same condition. Final biomasses were identical in control and CGRP-treated bacteria.

Biofilm formation studies. The initial adhesion of *S. capitis* MFP08 was unchanged after growth in the absence or presence of CGRP (10^{-6} M). When the mature biofilm was observed by confocal microscopy after 22 h incubation, the biovolume, average thickness and roughness coefficient did not show significant variations (**Figure 2**). In the case of *M. luteus* MFP06 the initial adhesion was also unchanged after exposure or not to CGRP (10^{-6} M). In contrast, image analysis of the biofilm formed after 46 h of incubation seem to reveal a significant increase of the mean biovolume and thickness of the CGRP-treated bacteria (+79 and +83.5 %, respectively, $p < 0.05$). Conversely, the roughness coefficient was in parallel significantly decreased (-24.8 %, $p < 0.05$; *to be confirmed by biological replicates*) (**Figure 3**). In the case of *C. acnes* RT4 516, the initial adhesion was not significantly modified in bacteria grown in control or CGRP-supplemented medium. The mature biofilm formed by this strain was heterogeneous and consequently, the biovolume, thickness and roughness values showed important variability, but no difference was noted between control and CGRP-treated bacteria (**Figure 4**). The initial adhesion values of the strain *C. acnes* RT6 554 were not affected by the neuropeptide. The mature biofilm of this non-acneic strain was more homogeneous than observed with the acneic strain *C. acnes* RT4 516. A non-significant decrease of the biofilm volume and thickness was noted while the roughness coefficient remained unchanged (**Figure 5**).

Bacterial transcriptomic studies. A total of 2364, 2368 and 2338 proteins encoded in the genomes of *S. capitis* MFP08, *C. acnes* RT4 516 and *C. acnes* RT6 554, respectively, were screened in control and CGRP-treated bacteria. *M. luteus* being a poorly studied species, the NEBNext rRNA depletion kit did not operate efficiently and the competition between rRNAs and mRNAs didn't allow to realize the transcriptomic study in *M. luteus* MFP06.

Comparison of genes expression profiles considering a minimal 1.5 fold variation and a *p*-value <0.05 did not reveal any significant up- or down-regulated mRNAs in *S. capitis* MFP08,

C. acnes RT4 516 and *C. acnes* RT6 554 after growth in the absence or presence of CGRP (10^{-6} M).

DISCUSSION

It is now well demonstrated that the cutaneous microbiota plays a major role in skin homeostasis by training skin immunity, promoting keratinocytes dynamics, accelerating wound healing and by acting as a barrier against pathogens, UVs and pollutants [23]. However, this microbiota is a complex ecosystem that includes a mean of 1000 different bacterial species with diverse physiological requirements and behaviors. In addition, bacteria are known to rapidly adapt to their microenvironment and particularly to cytokines, hormones and neurohormones released locally by keratinocytes, endothelial cells, immune cells and nerve terminals [4]. CGRP is released in skin by sensory afferent C fibers and autonomic nerve terminals and is one of the most prominent skin neuropeptides with Substance P [24]. Two isoforms of this peptide, α-CGRP and β-CGRP which differ by 3 amino acids, have been identified but α-CGRP is predominantly expressed in skin although its exact concentration remains unknown, presumably because of its short half-life (<10min) [25]. Nevertheless, as Substance P which has an even shorter half-life, ranging from seconds to minutes [26], CGRP was found to specifically modulate *S. epidermidis* virulence when the bacterium was exposed to micromolar concentrations of the peptide [8], as presently employed. However, at the opposite of Substance P which acts on a broad range of bacteria, until now the list of CGRP-sensitive microorganisms was limited to *S. epidermidis* and, as recently demonstrated, a rarely studied commensal scalp microorganism, *B. licheniformis* [11]. Then, in order to increase our knowledge of the potential impact of CGRP on cutaneous bacteria, and since it is currently impossible to predict its effect which probably involves epigenetic processes, we decided to test the effect of this neurohormone on four common bacteria of the skin microbiota, namely *S. capitis*, *M. luteus*, and two strains of *C. acnes* with opposite behavior, an acneic and a non-acneic strain. *S. capitis* was selected because of its abundance in skin and its phylogenetic links with *S. epidermidis*. *M. luteus* was chosen since it is poorly studied but appears to play a central role in the protection against UVs by reversing their deleterious effect on urocanic acid isomerization [27]. *C. acnes* RT4 516 is a typical phylotype IA1 acneic strain with inflammatory potential that should be now assigned to the *C. acnes acnes* subspecies. At the opposite, *C. acnes* RT6 554 is a phylotype II non-acneic strain with anti-inflammatory activity of the *C. acnes defendens* subfamily. All these strains are from cutaneous origin.

The absence of impact of CGRP on the four strains is not surprising since all skin neuropeptides and neurotransmitters studied until now are usually without impact on the bacterial growth rate and since this parameter is usually the first one investigated, this is probably the major reason why the rise of microbial endocrinology was recent [5]. In addition, bacteria rarely grow in a planktonic mode, particularly in skin where they form microcolonies and biofilms. Bacterial growth in biofilm is also associated with major metabolic changes that can deeply affect their host interactions [28]. The absence of effect of CGRP on *S. capitis* makes its behavior resemble that of *S. aureus* which, until now, also appears non-sensitive to CGRP [8]. Although they have very different metabolisms and requirements [10], both acneic and non-acneic strains of *C. acnes* also appeared unsensitive to CGRP. The case of *M. luteus* is different with a dual impact on mature biofilm formation. CGRP being without effect on the initial adhesion process, that depends only on physico-chemical polar interactions with the surfaces, suggests that the peptide is not affecting the surface charges of the bacterium but more probably its capacity to produce and export extracellular matrix components. At the opposite, in *S. epidermidis*, CGRP treatment was associated with a marked decrease in biofilm formation, at least in flow cell conditions [8], while in static conditions the results were more variable, including an increase in biofilm formation (*Unpublished data*) suggesting also a change in the composition of the biofilm matrix.

As indicated in the results chapter, by regret because of the paucity of data on *M. luteus*, rRNAs are insufficiently known and it is not presently possible to completely deplete rRNA sequences and avoid interferences during mRNAs sequencing. In contrast, for the three other bacterial species, no variation of mRNAs expression was observed after exposure to CGRP indicating that, as noted in *B. licheniformis* [11], CGRP is not a transcriptional regulator in *S. capitis* and *C. acnes*. That does not exclude a potential effect of CGRP on these bacteria through modification(s) of proteins or metabolites expression as shown with *B. licheniformis* in HaCaT keratinocytes, but proteomic and metabolomic studies were not possible to realize presently for technical and economic reasons.

Taken together, and although these results are essentially negative, they complete our knowledge of the impact of CGRP on the cutaneous microbiota.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the world's leading perfumery and cosmetics network Cosmetic Valley for its support through identification of fundings and industrial partners.

FUNDING

This study was supported by the French Ministry of Research, PSPC program MICCA supported by the Région Normandie and European Union (FEDER) and Evreux Porte de Normandie.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors. All data is available in the published manuscript or stored in public databases.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, the collection, analyses, or interpretation of data, writing of the manuscript, or the decision to publish the results.

REFERENCES

[1] Lousada, M.B., Lachnit, T., J Edelkamp, J., Rouillé, T., Ajdic, D., Uchida, Y., Di Nardo, A., Bosch, T.C.G., Paus, R. *Br. J. Dermatol.* 2021, vol.184, pp. 802-815. https://doi.org/10.1111/bjd.19461.

[2] Nakatsuji, T., Chiang, H.I., Jiang, S.B., Nagarajan, H., Zengler, K., Gallo, R.L. *Nat. Commun.* 2012, vol. 4, pp. 1431. https://doi.org/10.1038/ncomms2441.

[3] Wang, Z, Mascarenhas, N., Eckmann, L, Miyamoto, Y., Sun, X., Kawakami, T., Di Nardo, A. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2017, vol 139, pp. 1205-1216. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.019.

[4] Cizza, G., Marques, A.H., Eskandari, F., Christie, I.C., Torvik, S., Silverman, M.N., Philips, T.M., Sternberg, E.M. and the POWER Study Group. *Biol. Psychiatry.* 2008, vol. 64, pp. 907-911. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.05.035.

[5] Racine, P-J., Janvier, X., Clabaut, M., Catovic, C., Souak, D., Boukerb, A.M, , Anne Groboillot, A., Konto-Ghiorghi, Y., Duclairoir-Poc, C., Lesouhaitier, O., Orange, N., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J. *Exp. Dermatol.* 2020, vol 29, pp. 790-800. https://doi.org/10.1111/exd.14158.

[6] Feuilloley, M.G.J., Hadjiev, E., Amegnona, L.J. *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res*. 2024, vol 37, pp. 100545. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2024.100545.

[7] Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O. 2025. Endocrine Microbiology: A transdisciplinary approach of the human physiology. *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res*. 2025, vol. 38, pp. 100570. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2025.100570.

[8] N'Diaye, A., Mijouin, L., Hillion, M., Diaz, S., Konto-Ghiorghi, Y., Percoco, G., Chevalier, S., Lefeuvre, L., Harmer, N.J., Lesouhaitier, O., Feuilloley M.G.J. *Front. Microbiol.* 2016, vol. 7, pp. 506. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00506.

[9] N'Diaye, A., Gannesen, A., Borrel, V., Maillot, O., Enault, J., Racine, P-J., Plakunov, V., Chevalier, S., Lesouhaitier, O., Feuilloley M.G.J. *Front. Endocrinol.* 2017, vol 8, pp. 15. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00015.

[10] Borrel, V., Thomas, P., Catovic, C., Racine, P-J., Konto-Ghiorhi, Y., Lefeuvre, L., Duclairoir-Poc, C., Zouboulis, C.C, Feuilloley, M.G.J. *Front. Med.* 2019, vol. 6, pp. 155. https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00155.

[11] Hadjiev, E.B.D., Boukerb, A.M., Ismail, R., Barreau, M., Hajem, N., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J. *Res. Microbiol.* 2025, in preparation.

[12] Hillion, M., Mijouin, L., Jaouen, T., Barreau, M., Meunier, P., Lefeuvre, L., Lati, E., Chevalier, S., Feuilloley, M.G. *Microbiologyopen.* 2013, vol. 2, pp.953-61. https://doi.org/10.1002/mbo3.138.

[13] Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. *Bioinformatics*. 2014, vol. 30, p. 2114-2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170.

[14] Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt K.E. PLoS Comput. Biol. 2017, vol. 13, p. e1005595. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595.

[15] Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Glenn, T. *Bioinformatics*. 2013, vol. 29, p. 1072-1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086.

[16] Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., Tyson G.W. *Genome research*. 2015, vol. 25, p. 1043-1055. http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.186072.114.

[17] Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfe, M.C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R.L., Miller, J.F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G.M., Li H. *J. Invest. Dermatol.* 2013, vol. 133, pp. 2152-2160. https://doi.org/10.1038/jid.2013.21.

[18] Dekio, I., McDowell, A., Sakamoto, M., Tomida, S. Ohkuma, M. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019, vol. 69, pp. 1087-1092. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003274

[19] Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg C., Givskov M., Ersbøll B.K., Molin S. *Microbiology*. 2000, vol. 146, p. 2395-2407. https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395.

[20] Vorregaard, M. 2008. Thèse de maîtrise. Technical University of Denmark, DTU, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark.

[21] Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. *Nat. methods*, 2012, vol. 9, no 7, p. 671-675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089.

[22] N'Diaye, A.R., Leclerc, C., Kentache, T., Hardouin, J., Poc, C., Konto-Ghiorghi, Y., Chevalier, S., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G. *Sci. Rep*. 2016, vol. 6, pp. 35379. https://doi.org/10.1038/srep35379.

[23] Fournière M. Latire T., Souak D., Feuilloley M.G.J., Bedoux G. *Microorganisms.* 2020, vol. 8, pp. 1752. https://doi.org/10.3390/microorganisms8111752.

[24] Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. *Physiol. Rev.* 2006, vol. 86, pp. 1309-1379. doi: 10.1152/physrev.00026.2005.

[25] Wang Q, Qin H, Deng J, Xu H, Liu S, Weng J, Zeng H. *Biomolecules.* 2023, vol. 13, pp; 838. https://doi.org/10.3390/biom13050838.

[26] Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdös EG. *Peptides*. 1984, vol. 5, pp.769-776. https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90020-2.

[27] Hug D.H., Dunkerson D.D., Hunter J.K. *J. Photochem.Photobiol. B: Biol.* 1999, vol. 50, pp. 66-73. https://doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00072-X.

[28] Malviya J, Alameri AA, Al-Janabi SS, Fawzi OF, Azzawi AL, Obaid RF, Alsudani AA, Alkhayyat AS, Gupta J, Mustafa YF, Karampoor S, Mirzaei R. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2023, vol. 39, pp. 212. doi: 10.1007/s11274-023-03651-y.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1: Growth kinetics of *Staphylococcus capitis* MFP08 (**A**), *Micrococcus luteus* MFP06 (**B**), *Cutibacterium acnes* RT4 516 (**C**) and *Cutibacterium acnes* RT6 554 (**D**) in the absence or presence of CGRP 10^{-6} M. Results are the mean of three independent experiments.

Figure 2: Effect of CGRP 10^{-6} M on the initial adhesion and biofilm formation activity of *Staphylococcus capitis* MFP08 visualized with the SYTO™ 9 green fluorescent stain. The initial adhesion was determined after 2 h of incubation. Mature biofilm formation characteristics were assessed after 24 h of incubation. Representative 3D micrographs of *Staphylococcus capitis* initial adhesion and biofilm were visualized by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) (**A**). Initial adhesion (**B**) and mature biofilm biovolume, average thickness and roughness coefficient (**C**) were calculated using ImageJ [21] and the Comstat2 software [www.comstat.dk; 19-20]. (ns = not significantly different, to be confirmed by further biological replicates).

Figure 3: Effect of CGRP 10^{-6} M on the initial adhesion and biofilm formation activity of *Micrococcus luteus* MFP06 visualized with the SYTO™ 9 green fluorescent stain. The initial adhesion was determined after 2 h of incubation. Mature biofilm formation characteristics were assessed after 48 h of incubation. Representative 3D micrographs of *Micrococcus luteus* initial adhesion and biofilm were visualized by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) (**A**). Initial adhesion (**B**) and mature biofilm biovolume, average thickness and roughness coefficient (**C**) were calculated using ImageJ [21] and the Comstat2 software [www.comstat.dk; 19-20]. (* = $p<0.05$, to be confirmed by further biological replicates).

Figure 4: Effect of CGRP 10^{-6} M on the initial adhesion and biofilm formation activity of *Cutibacterium acnes* RT4 516 visualized with the SYTO™ 9 green fluorescent stain. Initial adhesion was determined after 2 h of incubation**.** Mature biofilm formation characteristics were assessed after 72 h of incubation. Representative 3D micrographs of *Cutibacterium acnes* RT4 516 initial adhesion and biofilm were visualized by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) (**A**). Initial adhesion (**B**) and mature biofilm biovolume, average thickness and roughness coefficient (**C**) were calculated using ImageJ [21] and the Comstat2 software [www.comstat.dk; 19-20]. (ns = not significantly different, to be confirmed by further biological replicates).

Figure 5: Effect of CGRP 10^{-6} M on the initial adhesion and biofilm formation activity of *Cutibacterium acnes* RT6 554 visualized with the SYTO™ 9 green fluorescent stain. Initial adhesion was determined after 2 h of incubation**.** Mature biofilm formation characteristics were assessed after 72 h of incubation. Representative 3D micrographs of *Cutibacterium acnes* RT6 554 initial adhesion and biofilm were visualized by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) (**A**). Initial adhesion (**B**) and mature biofilm biovolume, average thickness and roughness coefficient (**C**) were calculated using ImageJ [21] and the Comstat2 software [www.comstat.dk; 19-20]. (ns = not significantly different, to be confirmed by further biological replicates).

Figure 1

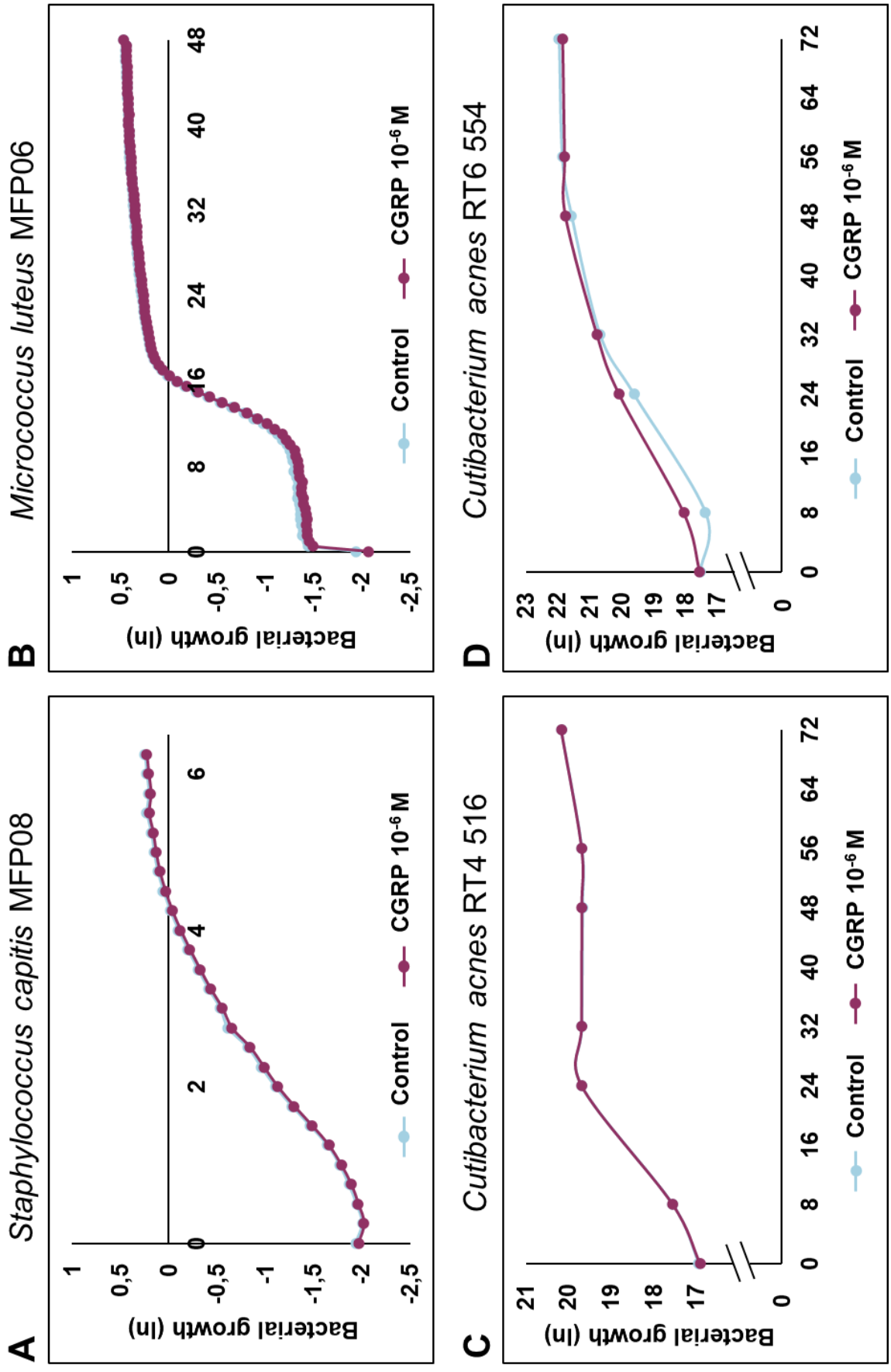

A
Staphylococcus capitis MFP08
B
Micrococcus luteus MFP06
C
Cutibacterium acnes RT4 516
D
Cutibacterium acnes RT6 554
Bacterial growth (ln)
Control
CGRP 10-6 M

Figure 2

***Staphylococcus capitis* MFP08**

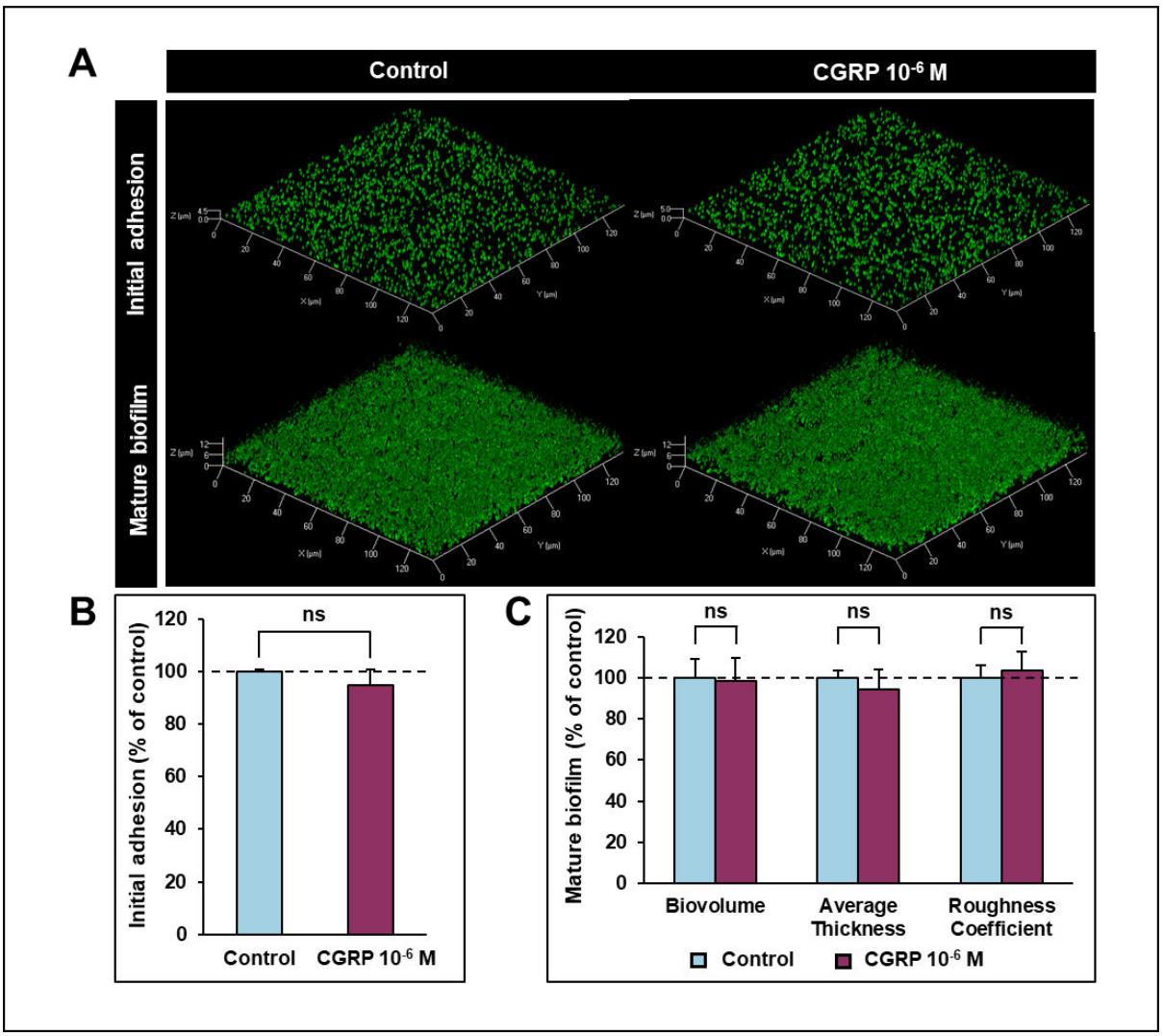


Figure 3

***Micrococcus luteus* MFP06**

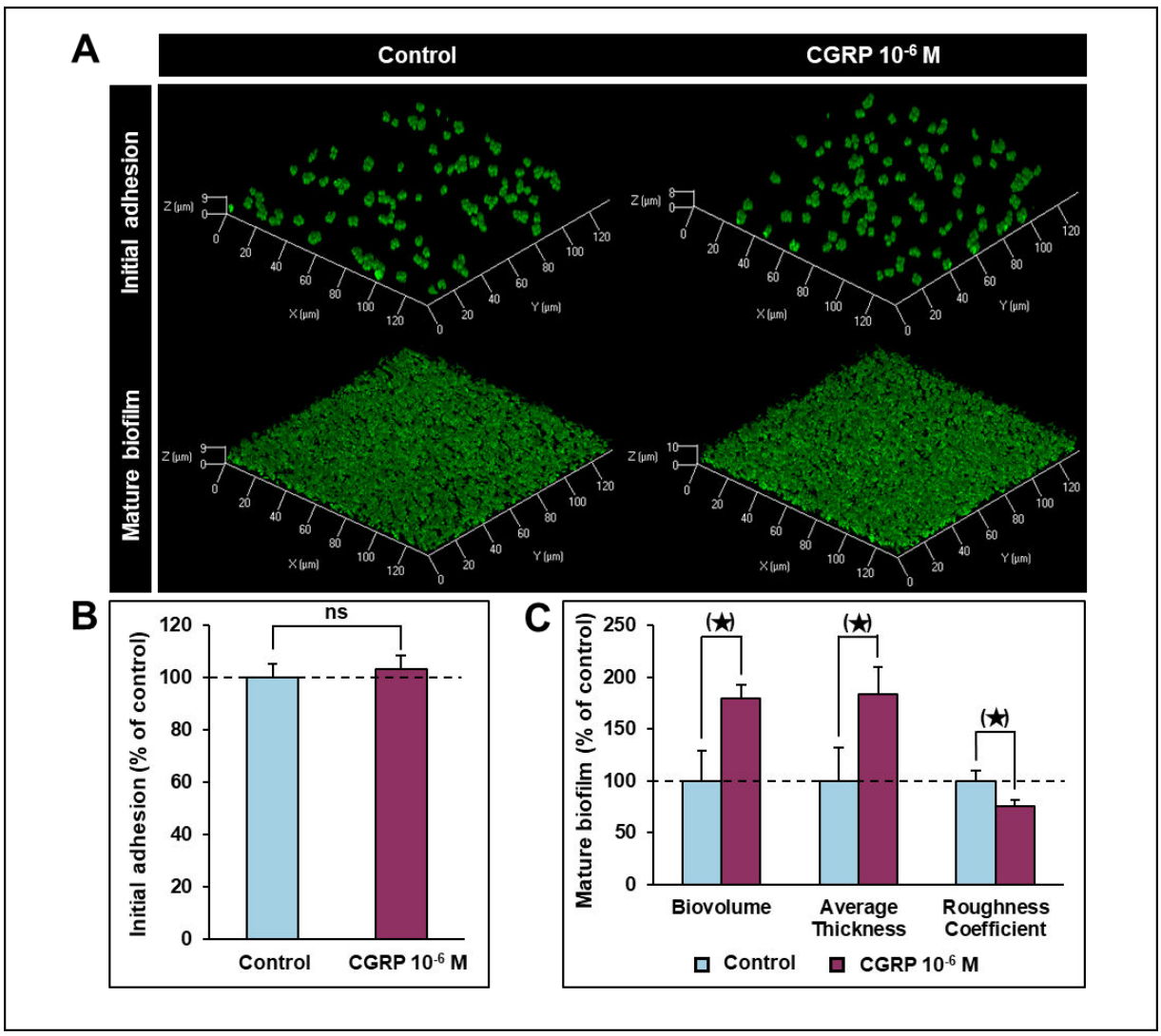


Figure 4

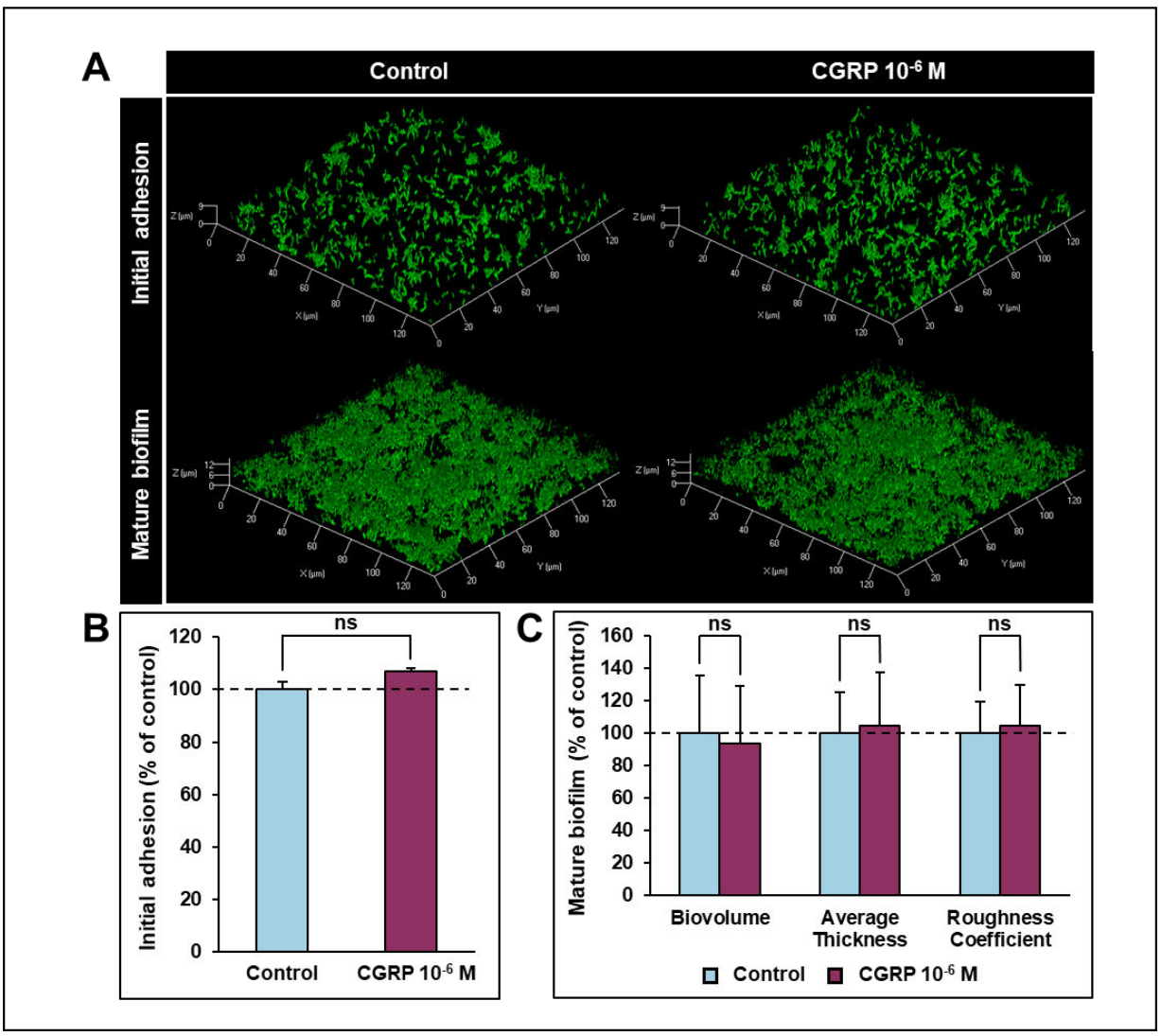
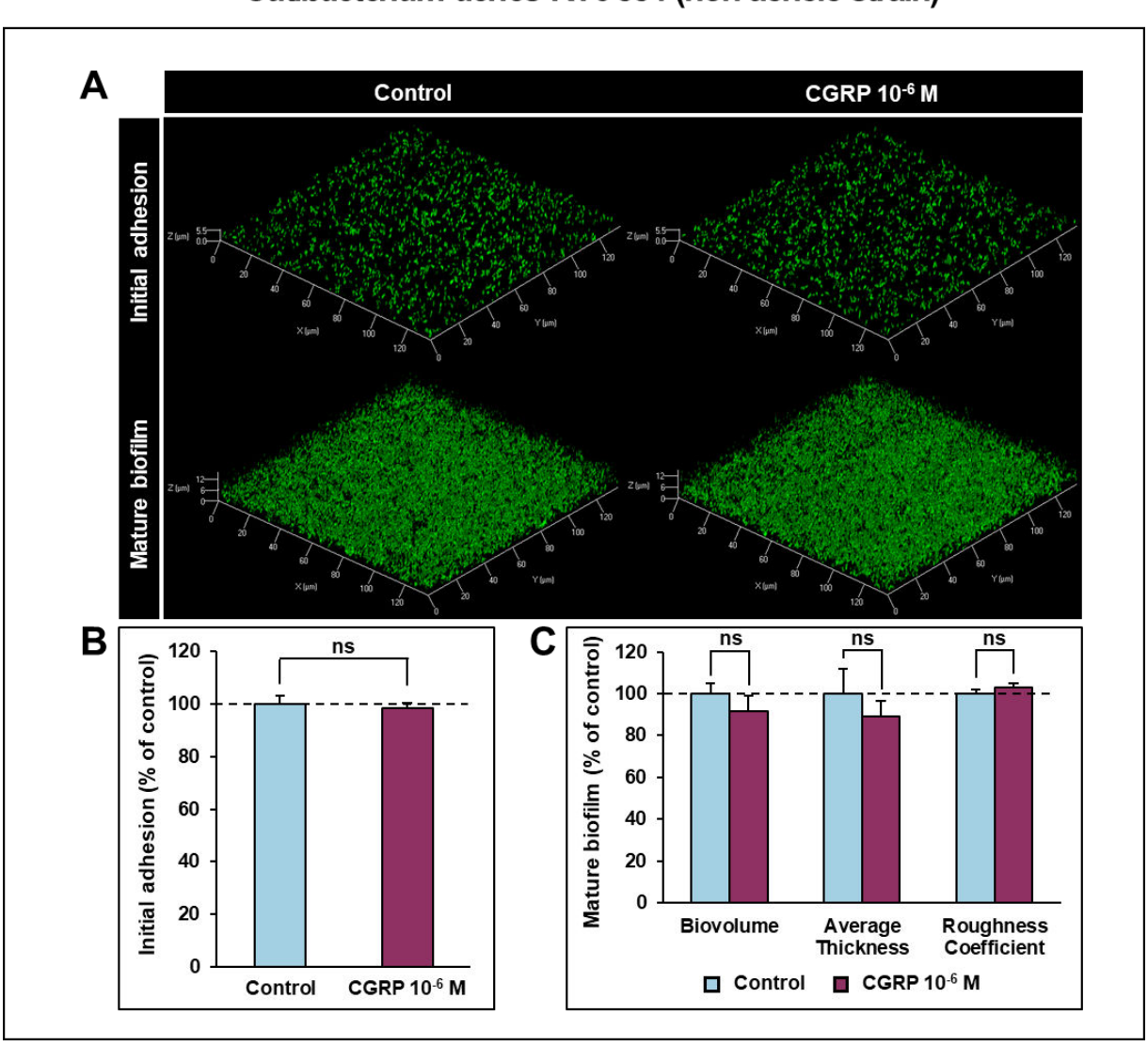

Cutibacterium acnes RT4 516 (acneic strain)
A
Control
CGRP 10-6 M
Initial adhesion
Mature biofilm
B
Initial adhesion (% of control)
ns
Control
CGRP 10-6 M
C
Mature biofilm (% of control)
ns
ns
ns
Biovolume
Average Thickness
Roughness Coefficient
Control
CGRP 10-6 M

Figure 5


Cutibacterium acnes RT6 554 (non acneic strain)
A
Control
CGRP 10-6 M
Initial adhesion
Mature biofilm
B
Initial adhesion (% of control)
ns
Control
CGRP 10-6 M
C
Mature biofilm (% of control)
ns
ns
ns
Biovolume
Average Thickness
Roughness Coefficient
Control
CGRP 10-6 M

Résultats complémentaires

Au cours de cette thèse, les effets potentiels du CGRP sur la physiologie et la virulence bactérienne ont été testés sur des bactéries à Gram positif : *Bacillus licheniformis* (**Article 1**), *Staphylococcus capitis*, *Micrococcus luteus*, *Cutibacterium acnes* (RT4, acnéique) et *Cutibacterium* acnes (RT6, non-acnéique) (**Article 2**). En complément de ces résultats, nous avons cherché à évaluer l'impact du CGRP sur une bactérie à Gram négatif, *Pseudomonas fluorescens* MFP05, qui a déjà fait l'objet d'une publication démontrant sa sensibilité à la SP (**Hillion *et al.*, 2014**). Nous avons ainsi étudié l'effet du neuropeptide sur la croissance bactérienne, la formation de biofilm sur surface hydrophobe et hydrophile, ainsi que la cytotoxicité et le potentiel inflammatoire sur la lignée de kératinocytes HaCaT. La méthodologie employée est décrite dans la partie « Matériels et Méthodes » de ce manuscrit et les résultats obtenus pour ces différents paramètres sont présentés ci-dessous.

I- Effet du CGRP sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* MFP05

Un suivi de croissance de *P. fluorescens* MFP05 a été réalisé, en présence et en absence de CGRP à 10^{-6} M, pendant 24 h à 28°C. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 30**.

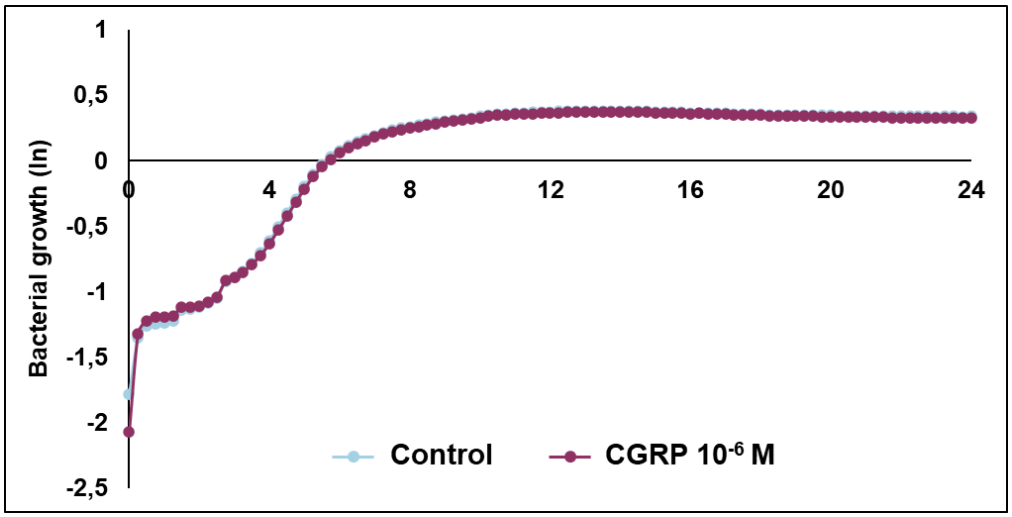


***Figure 30* : Courbe de croissance (n=3) de *Pseudomonas fluorescens* MFP05 en absence (bleu) et en présence (violet) de CGRP à 10^{-6} M.** *L'expérience a été réalisée en milieu LB, à 28°C, pendant 24 h et les résultats ont été obtenus par mesure automatique de la DO_{580nm} toutes les 15 minutes pendant la durée de l'incubation.*

Il apparaît que le CGRP n'a aucun impact sur la croissance de *P. fluorescens*. Cela est confirmé par le calcul du temps de génération qui est de 101 ± 1,2 minutes (bactéries seules) contre 103 ± 7 minutes (bactéries traitées). Cette observation est en accord avec les résultats obtenus pour les autres souches (**Article 1 – Figure 4 ; Article 2 – Figure 1**) et la bibliographie, dans laquelle il est déjà établi qu'à concentration physiologique, les neurohormones n'impact pas la croissance des microorganismes (**Feuilloley and Lesouhaitier, 2025**).

II- Effet du CGRP sur la formation de biofilm de *Pseudomonas fluorescens* MFP05

Les résultats obtenus précédemment avec d'autres isolats cutanés ont démontré que les neurohormones sont capables d'influencer la formation de biofilm par les bactéries (**Racine *et al.*, 2020**). Ainsi, de même que dans les **Articles 1 et 2** présentés précédemment, nous avons évalué l'impact du CGRP à 10^{-6} M sur la formation de biofilm de *P. fluorescens* MFP05, en commençant par la technique de coloration au Cristal Violet. Pour cela, les biofilms ont été formés dans des plaques 96 puits en polystyrène et à fond plat. Après coloration au Cristal Violet et resolubilisation de celui-ci dans de l'acide acétique, une mesure de densité optique à 595 nm a permis d'obtenir les résultats de la **Figure 31**.

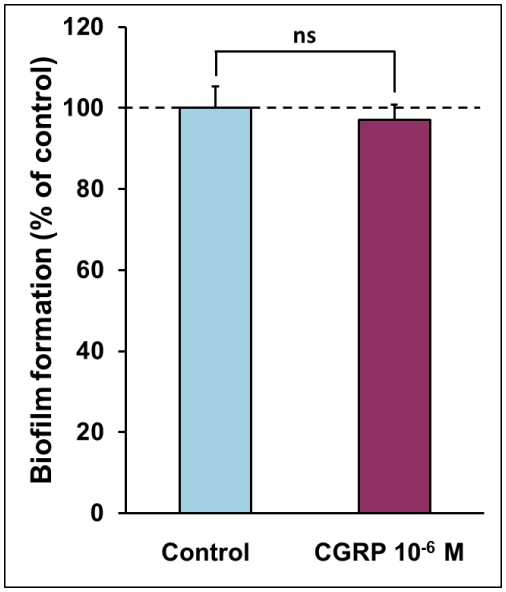


Figure 31 : Formation de biofilm (n=3) de Pseudomonas fluorescens MFP05, en présence (bleu) et en absence (violet) de CGRP à 10^{-6} M, *suite à une incubation à 28 °C pendant 24 h en conditions statiques, et révélation par la technique de coloration au*

Cristal Violet. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. (ns = non significatif).

Les résultats obtenus indiquent une absence d'effet du CGRP sur la formation de biofilm dans ces conditions (surface hydrophobe). En parallèle, nous avons réalisé d'autres manipulations de formation de biofilm mais cette fois-ci, dans des plaques en verre (surface hydrophile), par marquage des cellules bactériennes au SYTO™ 9 et mesure de la fluorescence en microscopie confocale à balayage laser. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 32**.

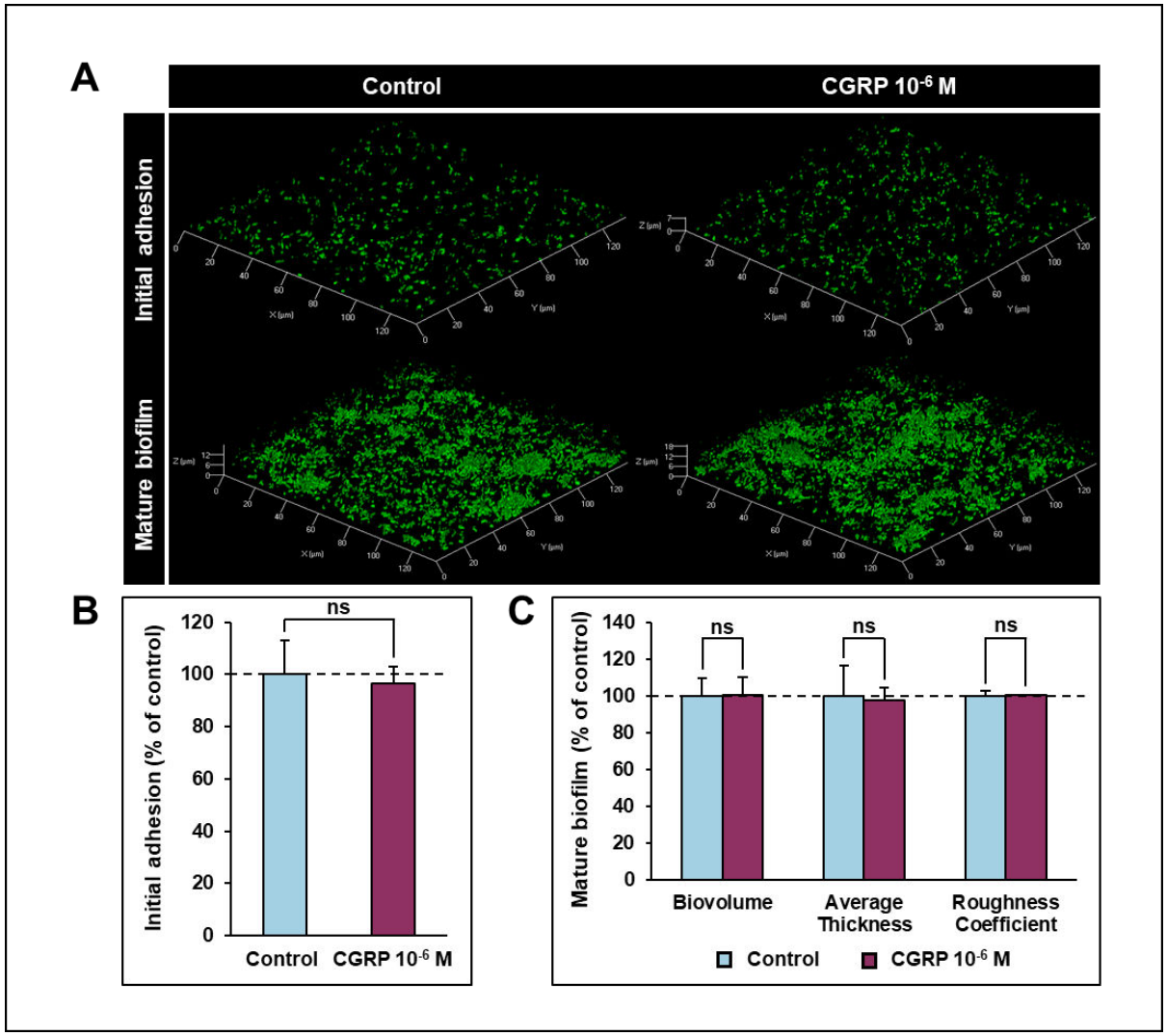


Figure 32 : Effet du CGRP à 10-6 M sur l'adhésion initiale et la formation de biofilm de Pseudomonas fluorescens MFP05 par visualisation en microscopie confocale à balayage laser. *L'adhésion initiale a été déterminée après 2 heures d'incubation, à 28 °C, en conditions statiques. Le biovolume, l'épaisseur moyenne et le coefficient d'hétérogénéité du biofilm mature ont été déterminés après 24 heures d'incubation. (**A**) Des reconstitutions en 3D représentatives de l'adhésion initiale et du biofilm de P.*

*fluorescens ont été obtenues et traitées avec le logiciel Zen 2.1 (Zeiss, Allemagne). (**B**) L'adhésion initiale (n=2, à compléter) ainsi que (**C**) le biovolume, l'épaisseur moyenne et le coefficient d'hétérogénéité du biofilm mature (n=3) ont été calculés respectivement à l'aide des logiciels ImageJ (**Schneider et al., 2012**) et Comstat2 (www.comstat.dk ; **Heydorn et al., 2000** ; **Vorregaard, 2008**). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. (ns = non significatif).*

Que cela soit en termes d'adhésion ou de maturation du biofilm, l'exposition de *P. fluorescens* au CGRP (10^{-6} M) n'entraîne aucune modification des paramètres mesurés.

III- Effet du CGRP sur la virulence de *Pseudomonas fluorescens* MFP05

1- Evaluation de la cytotoxicité sur la lignée cellulaire HaCaT

Nous avons cherché à évaluer l'effet du CGRP sur la virulence de *P. fluorescens* MFP05 en mesurant le taux de mortalité cellulaire après infection de la lignée de kératinocytes HaCaT. Pour cela, nous avons effectué un dosage de la LDH dans le surnageant de culture des cellules et comparé les résultats obtenus pour des bactéries prétraitées ou non avec 10^{-6} M du neuropeptide (**Figure 33**).

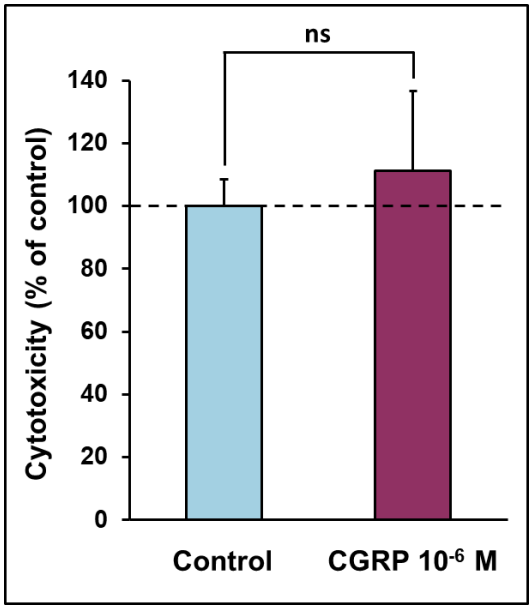


***Figure 33** : **Evaluation de la cytotoxicité de Pseudomonas fluorescens MFP05 (n=2, à compléter), traitée ou non avec le CGRP (10^{-6} M).** L'infection de la lignée cellulaire HaCaT a été effectuée à une MOI 50 (soit 50 bactéries pour 1 cellule humaine), à 37 °C, 5% de CO_2, pendant 16 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle. (ns = non significatif).*

De la même manière que pour *B. licheniformis* (**Article 1 – Figure 6**), le prétraitement des bactéries avec le CGRP n'a aucun impact sur la cytotoxocité de *P. fluorescens* MFP05. Des résultats similaires avaient été trouvés lorsque la bactérie était exposée à la SP (**Hillion *et al.*, 2014**).

2- Evaluation du potentiel inflammatoire par dosage de l'IL-8

Les résultats obtenus sur *B. licheniformis* MIC004 et présentés dans l'**Article 1** (**Figures 6 et 7**) ont démontré que, malgré une absence de cytotoxicité, l'infection de la lignée HaCaT par des bactéries témoins et traitées au CGRP augmente l'expression de marqueurs de l'inflammation chez les kératinocytes. De ce fait, nous avons cherché à mesurer l'impact du neuropeptide sur le potentiel inflammatoire de *P. fluorescens* MFP05 en effectuant le dosage de l'IL-8, un marqueur classique de l'inflammation, dans le surnageant de culture des cellules après infection. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 34**.

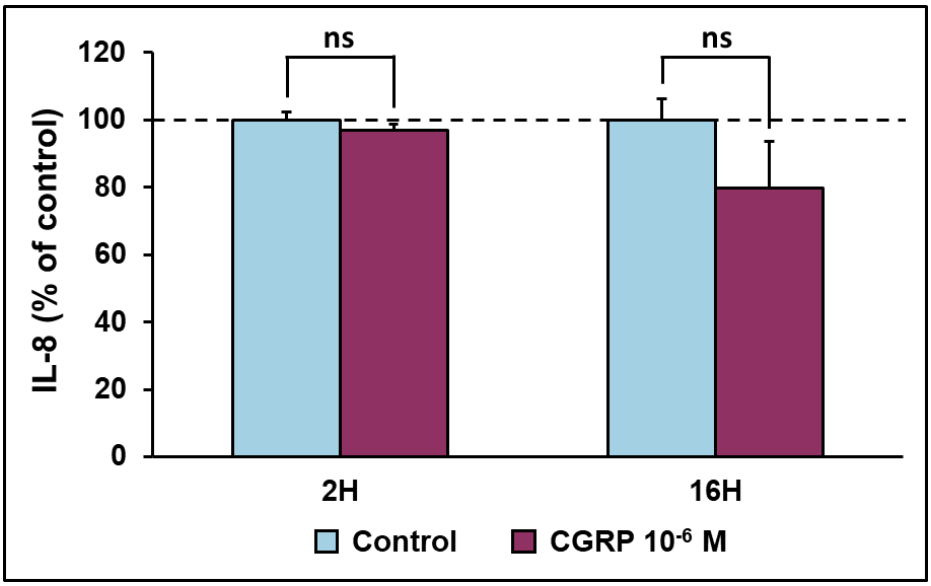


Figure 34 *: **Evaluation du potentiel inflammatoire de Pseudomonas fluorescens MFP05, traitée ou non avec le CGRP (10^{-6} M)**, sur la lignée cellulaire HaCaT après 2 h (n=3) ou 16 h (n=2, à compléter) d'infection à une MOI de 50 (soit 50 bactéries pour 1 cellule humaine) à 37 °C et 5% de CO_2. (ns = non significatif).*

Contrairement à *B. licheniformis* MIC004, il semblerait que *P. fluorescens* MFP05 ne provoque pas d'inflammation chez les kératinocytes. L'IL-8 n'étant qu'un des nombreux marqueurs de l'immunité, des expériences complémentaires sur d'autres cytokines, et chimiokines, permettraient de venir compléter ce résultat.

DISCUSSION

La peau constitue la première ligne de défense du corps humain contre l'environnement extérieur et représente, en prenant en compte toutes les annexes cutanées, une surface pouvant aller jusqu'à 25 m^2 (**Gallo, 2017**). Elle abrite le microbiote cutané, considéré comme la deuxième plus importante population microbienne du corps et composé d'une diversité de bactéries, champignons, levures, virus et archées qui coexistent au sein d'un écosystème complexe (**Byrd *et al.*, 2018**). L'abondance et la composition de ce microbiote vont être influencées par les divers paramètres physico-chimiques propres à chaque site cutané, par la physiologie et le mode de vie de l'hôte, ainsi qu'une multitude de facteurs environnementaux (**Harrys-Tryon and Grice, 2022**). On distingue cependant quatre phyla majoritaires que sont les Actinobactéries, Firmicutes, Protéobactéries et Bacteroidetes (**Baldwin *et al.*, 2017**) avec une prédominance d'espèces appartenant notamment aux genres *Staphylococcus*, *Cutibacterium*, et *Micrococcus* que l'on va retrouver dans notre étude. L'interaction bipartite entre ce microbiote et le système tégumentaire confère aux microorganismes un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la peau et l'éducation du système immunitaire, en plus de la protection contre la colonisation par des espèces microbiennes pathogènes (**Harrys-Tryon and Grice, 2022**).

Combiné à cela, la peau est également considérée comme le plus grand organe neuro-immuno-endocrinien du corps humain et comporte un réseau vasculaire et nerveux extrêmement riche et complexe (**Roosterman *et al.*, 2006**). De ce fait, une large diversité d'hormones, de neurohormones et de peptides diffuse dans la sueur et les différentes couches de la peau, exposant ainsi en permanence le microbiote cutané à des facteurs eucaryotes (**N'Diaye et al., 2016b**). C'est l'étude des catécholamines qui a ouvert la voie à une meilleure compréhension de l'impact de ces molécules sur la physiologie et la virulence bactérienne, donnant ainsi lieu à l'émergence d'un nouveau domaine d'étude, celui de l'Endocrinologie Microbienne (**Lyte, 2004**). Celui-ci a permis de mettre en évidence que d'autres hormones, telles que les peptides natriurétiques ou la Substance P, ont également des effets considérables sur la flore bactérienne (**Lesouhaitier *et al.*, 2019**), notamment cutanée. La SP étant souvent colocalisée avec le CGRP au niveau des terminaisons nerveuses afférentes de type C, ce neuropeptide a ainsi fait l'objet d'une publication visant à évaluer son impact sur des souches cutanées de *S. aureus* et *S.*

epidermidis. Ainsi, dans l'étude de **N'Diaye *et al.* (2016b)**, il apparaît que le CGRP stimule la virulence de la souche *S. epidermidis* MFP04, à une concentration de 10^{-6} M, et entraîne une modification des propriétés de surface de la bactérie. Il apparaît en effet que celle-ci transitionne de moyennement hydrophile à faiblement hydrophobe et possède un caractère acide de Lewis renforcé. Le seuil d'activité de la molécule était alors de l'ordre du picomolaire et inférieur aux concentrations de CGRP retrouvées dans le sang (± 84 × 10^{-12} M) (**Birklein *et al.*, 2001**) et la peau (entre 0,3 et 5,4 × 10^{-12} M/g de tissu) (**Eedy *et al.*, 1994**). En revanche, le neuropeptide n'a aucun impact sur la souche *S. aureus* MFP03 testée et, jusqu'à présent, ces deux coques à Gram positif étaient les seuls membres de la flore cutané à avoir été mis en contact avec la molécule.

C'est dans la continuité de ces premiers résultats que s'inscrivent les travaux de recherche effectués au cours de cette thèse. Nous nous sommes orientés vers un plus large panel d'espèces bactériennes isolées de la peau et avons ainsi réalisé un criblage sur des souches cutanées issues de la collection du CBSA. Parmi ces souches se trouvent *S. capitis* MFP08, *P. fluorescens* MFP05 et *M. luteus* MFP06 qui ont été isolées au laboratoire sur peau humaine, au niveau de l'omoplate ou de la fosse antécubitale droite (**Hillion *et al.*, 2013**). Une souche acnéique, *C. acnes* RT4 516, ainsi qu'une souche non acnéique, *C. acnes* RT6 554, initialement isolées par **Fitz-Gibbon *et al.* (2013)**, font également partie de notre étude. Elles viennent ajouter une autre dimension à ce travail, à travers une nouvelle niche écologique, puisque ces deux microorganismes proviendraient respectivement du compartiment sébacé et de la surface de la peau/de l'infundibulum du follicule pileux (**Borrel *et al.*, 2019**). La souche RT4 516 est ainsi retrouvée dans les couches plus profondes de la peau, et pourrait donc être davantage en contact avec la variété de molécules qui y sont sécrétées, tandis que les autres souches mentionnées ci-dessus, et collectées en surface, y sont exposées à travers la sueur et donc à des concentrations différentes.

En complément de ces souches, déjà étudiées et caractérisées au laboratoire, est venue s'ajouter *B. licheniformis* MIC004, isolée par écouvillonnage au niveau du cuir chevelu d'un volontaire sain. Cette souche a été assignée à un tout nouveau Sequence Type (ST59) par analyse MLST (**Article 1 – Figure 3**). Le follicule pileux est une annexe cutanée densément innervée et exposée aux neuropeptides et neurotransmetteurs libérés par les

terminaisons nerveuses (**Samuelov *et al.*, 2012**). Une étude de **Hagner *et al.* (2002)** a d'ailleurs démontré que le récepteur CRLR du CGRP est présent au niveau de ces follicules. La bibliographie montre clairement un impact, positif (**Suh and Eun, 1995**) comme négatif (**Peters *et al.*, 2001**), du CGRP sur la phase anagène de croissance du follicule et une étude de **Oh *et al.* (2005)** a également montré que le neuropeptide permet de raccourcir celle-ci et de stimuler l'expression de l'IL-1β et de la caspase-3, deux facteurs impliqués respectivement dans l'inhibition de la croissance des cheveux et l'apoptose. En parallèle, les travaux de **Samuelov *et al.* (2012)** montrent une induction précoce de la phase catagène, donc de régression, de la croissance du follicule en présence de CGRP. Ce neuropeptide étant impliqué dans la migraine, une publication de **Ruiz *et al.* (2023)** rapporte deux cas de patientes ayant été traitées à l'érénumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur au CGRP, et ayant développé une alopécie comme effet secondaire. Une diminution de la présence du peptide avait déjà été reportée par **Meyronet *et al.* (2003)** dans le cadre de cette pathologie qui entraîne une perte de cheveux. En parallèle, bien que la majorité des souches de *B. licheniformis* soient d'origine tellurique, cette bactérie est tout de même capable de survivre sur la peau (**Bibel *et al.*, 1978**) et de provoquer des infections (érysipèle, abcès) cutanées (**Ameur *et al.*, 2005 ; Yuste *et al.*, 2016**). De même, le potentiel inflammatoire des spores de cette bactérie a déjà été démontré sur la lignée cellulaire NuLi-1 (**Pickering *et al.*, 2018**) et plusieurs souches de *B. licheniformis* possèdent une intéressante activité kératolytique (**Peng *et al.*, 2019**). Bien qu'initialement étudiée dans le cadre du traitement des déchets avicoles, (**Liaqat *et al.*, 2022**) ont montré que la kératinase produite par la souche *B. licheniformis* dcs1 dégrade également les cheveux et les ongles d'origine humaine. Au vu de ces éléments, et de l'implication particulière du CGRP au niveau du cuir chevelu, il est apparu intéressant d'étudier l'impact du neuropeptide sur la composante microbienne de cet environnement particulier en prenant comme modèle d'étude la souche *B. licheniformis* MIC004.

Ce projet de thèse s'est ainsi articulé autour de plusieurs points visant à évaluer l'effet du CGRP sur la physiologie et la virulence bactérienne :

- Une évaluation de l'influence du neuropeptide sur la croissance, la formation de biofilm et la résistance aux antibiotiques des différentes souches ;

- L'étude des effets du CGRP sur la virulence bactérienne à travers une mesure de la cytotoxicité et du potentiel inflammatoire sur modèle HaCaT ;
- Une analyse transcriptomique visant à approfondir nos connaissances sur les effets de la molécule vis-à-vis de la transcription des gènes, chez nos souches, ainsi que chez les cellules HaCaT après infection avec *B. licheniformis*.

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer l'impact du CGRP à 10^{-6} M sur la croissance des différentes souches sélectionnées pour cette étude. Cette concentration a été choisie pour l'ensemble des manipulations réalisées au cours de cette thèse à la suite des résultats publiés par **N'Diaye *et al.* (2016b)**. Dans notre cas, les données obtenues ne démontrent aucun effet de la molécule sur le temps de génération de *B. licheniformis* (**Article 1 – Figure 4**), *S. capitis*, *M. luteus*, *C. acnes* RT4 516 (**Article 2 – Figure 1**) ou encore *P. fluorescens* (**Résultats complémentaires**). Une variation est observée dans le cas de *C. acnes* RT6 554 mais l'importante variabilité inter-réplicats, ainsi qu'une biomasse finale identique, suggèrent un effet minime du CGRP. Comme évoqué dans le Chapitre 2 de l'Introduction, les neuropeptides cutanés possèdent une activité antimicrobienne à des concentrations généralement supérieures à 10^{-4} M. A l'inverse, à des concentrations physiologiques sub-micromolaires, des facteurs tels que les NPs et la SP induisent un effet stimulant sur la virulence bactérienne sans pour autant modifier le taux de croissance (**Racine *et al.*, 2020**). C'était déjà le cas pour *S. epidermidis* après exposition au CGRP (**N'Diaye *et al.*, 2016b**) et c'est donc pour cette raison que nous nous sommes par la suite intéressés au potentiel impact de la molécule sur d'autres paramètres de la physiologie et de la virulence de ces bactéries cutanées.

Les biofilms bactériens sont un mode de vie de type communautaire reposant sur un amas de cellules attachées à un substrat, à une interface ou entre elles, et intégrées dans une matrice d'exopolysaccharides. Plusieurs études ont démontré la capacité des bactéries isolées de la peau à former du biofilm, et ce dernier constitue également un élément critique influençant la cicatrisation des plaies et le développement de maladies cutanées telles que la dermatite atopique et l'acné (**Percival *et al.*, 2012**). Afin de se rapprocher des conditions physiologiques réelles des bactéries sur la peau, les biofilms des différentes souches testées ont été formés en condition statique. Comme démontré dans l'**Article 1** (**Figure 5A**), aucune différence de formation de biofilm n'est observée

pour *B. licheniformis* MIC004 après exposition à 10^{-6} M de CGRP. Des images obtenues en microscopie confocale à balayage laser (**Article 1 – Figure 5B**) montrent que la bactérie forme un biofilm hétérogène et très aéré, mais qu'aucune modification de sa structure n'est observée en présence du neuropeptide. En comparaison avec *B. cereus* MFP01, une autre espèce du même genre, la SP n'avait eu aucun effet sur l'adhésion initiale de la bactérie mais l'épaisseur moyenne du biofilm mature était significativement impactée au bout de 5 h de culture seulement (**Mijouin *et al.*, 2013**). Il semblerait ainsi que les effets diffèrent en fonction de la molécule et de l'espèce étudiée. En effet, dans le cas de *S. aureus* MFP03 et *S. epidermidis* MFP04, les expériences de formation de biofilm en présence et absence de CGRP avaient été réalisées en condition dynamique, et il en résulte que le CGRP diminuait la formation de biofilm uniquement chez *S. epidermidis* (**N'Diaye *et al.*, 2016b**). Les premiers résultats présentés dans l'**Article 2** semblent démontrer que l'exposition de *S. capitis* (**Figure 2**), mais également de *C. acnes* (**Figure 4 et 5**) à la molécule, n'entraîne aucune modification de l'adhésion initiale ou de la formation de biofilm chez ces souches. Ces données devront être confirmées par d'autres réplicats biologiques. De même, comme visible dans la partie « **Résultats complémentaires** », le CGRP n'a également aucun impact sur le biofilm du germe à Gram négatif, *P. fluorescens* MFP05. Chez *M. luteus* (**Article 2 - Figure 3**), une augmentation du biovolume (+79%) et de l'épaisseur moyenne (+83,5%) du biofilm mature, ainsi qu'une diminution du coefficient d'hétérogénéité (–24,8%), semblent être observées mais restent également à confirmer avec d'autres réplicats.

Notre étude s'est intéressée pour la première fois à l'impact d'une neurohormone sur la résistance aux antibiotiques. Plusieurs souches de *B. licheniformis*, dont certaines utilisées en tant que probiotiques en Europe de l'Est, ont montré une résistance à divers antibiotiques dont la clindamycine, la kanamycine, la streptomycine, l'ampicilline, la céfoxitine, la ceftriaxone, la céfotaxime, l'érythromycine et le chloramphénicol (**Sorokulova *et al.*, 2008 ; Adimpong *et al.*, 2012**). Nous avons pris connaissances des recommandations de l'EUCAST pour les *Bacillus* spp. et avons testé tous les antibiotiques présents sur les listes standard et complémentaire pour ce genre bactérien. Nos résultats (**Article 1 – Figure 6A et Tableau 1**) démontrent une résistance de la souche *B. licheniformis* MIC004 à la clindamycine, avec une valeur de

concentration minimale inhibitrice (CMI) de 128 à 256 µg/mL pour cet antibiotique. La bactérie est en revanche sensible à la ciprofloxacine, au méropénem, à l'érythromycine ou encore à la rifampicine pour lesquels la CMI est inférieure ou égale à 1 µg/mL. Malgré une CMI légèrement plus élevée pour la norfloxacine, la vancomycine et le linézolide (allant de 2 à 32 µg/mL) par rapport aux autres antibiotiques, les valeurs restent basses et permettent également de conclure à une sensibilité de la bactérie. En cas d'ajout du CGRP à 10^{-6} M, aucun impact de la neurohormone n'est observé sur les valeurs de CMI obtenues. Comme présenté dans le Chapitre 1 de l'Introduction, les différents isolats de *B. licheniformis* semblent posséder des caractéristiques qui leurs sont propres, tant au niveau de la résistance aux antibiotiques, que de la production de toxines ou encore du potentiel biotechnologique. De ce fait, il serait intéressant de réaliser cette même expérience sur les autres isolats cutanés de *B. licheniformis* disponibles dans les différentes collections. De même, bien que non testées dans un contexte cutané, une étude de **Niu *et al.* (2023)** sur les catécholamines a montré qu'en présence de 100 µM d'Epi et de NE, les CMI augmentent de manière significative chez plus de 60% des isolats, et ce, pour 6 des 14 antibiotiques testés. Il serait donc intéressant d'inclure ce paramètre dans de futures études qui permettraient d'évaluer l'impact des hormones humaines sur la résistance aux antibiotiques chez les bactéries.

Pour aller plus loin dans notre étude, nous avons cherché à mesurer l'effet du CGRP sur la virulence de *B. licheniformis* MIC004 envers la lignée de kératinocytes immortalisés HaCaT. En effet, comme mentionné dans le Chapitre 1 de l'Introduction, bien que généralement considérée comme non pathogène, *B. licheniformis* fait tout de même l'objet de plusieurs publications démontrant son potentiel infectieux. La production d'une toxine, la lichenysine, est également en cause dans des cas d'intoxications alimentaires (**Mikkola *et al.*, 2000**) et cette dernière a déjà montré un effet cytotoxique sur la lignée intestinale Caco-2 ainsi que sur des organoïdes d'iléon de porc (**Yeak *et al.*, 2022**). Bien que la production de ce lipopeptide reste très dépendante des conditions environnementales, nous avons tout de même voulu évaluer le potentiel cytotoxique de notre souche. Pour cela, nous avons infecté les cellules avec la bactérie, prétraitée ou non avec 10^{-6} M de CGRP, à une MOI 50 et pendant 2 h ou 16 h d'incubation. Dans l'étude précédente avec *S. epidermidis*, l'exposition au CGRP a considérablement augmenté la

cytotoxicité de la bactérie (+ 388%) sur modèle HaCaT et ces résultats se sont également retrouvés sur un modèle d'épiderme humain reconstruit RHE. En revanche, chez *B. licheniformis* MIC004, le neuropeptide n'a aucun impact significatif sur la cytotoxicité (**Article 1 – Figure 6B**). Le séquençage puis l'analyse du génome de la souche MIC004 en parallèle de cette manipulation a révélé une absence de gènes codant pour des toxines connues, ce qui peut expliquer ces résultats. En parallèle, nous avons également évalué la cytotoxicité d'un germe à Gram négatif, *P. fluorescens* MP05, après traitement avec 10^{-6} M de CGRP et infection des cellules HaCaT pendant 16 h (**Résultats complémentaires**). Il apparaît grâce aux premiers résultats obtenus que, comme dans le cas de la SP, le neuropeptide ne semble avoir aucun impact sur ce paramètre. Nous avons donc cherché à compléter notre étude en nous intéressant au potentiel inflammatoire de la bactérie par mesure de la libération d'IL-8 par les cellules HaCaT au bout de 2 h et 16 h d'infection. A nouveau, le prétraitement de *P. fluorescens* avec 10^{-6} M de CGRP ne semble avoir aucun impact (**Résultats complémentaires**).

L'étude de **Hillion *et al.* (2014)** sur les effets de la SP chez *P. fluorescens* avait déjà démontré que même en absence de cytotoxicité, l'exposition à la molécule induit tout de même une augmentation de la virulence en stimulant les capacités d'adhésion et d'invasion de la bactérie. De ce fait, afin d'évaluer plus en profondeur l'impact du CGRP sur ces microorganismes, nous avons réalisé une étude transcriptomique sur les ARNm totaux de *B. licheniformis* MIC004, *S. capitis* MFP08, *M. luteus* MFP06, *C. acnes* RT4 516 et *C. acnes* RT6 554, traitées ou non avec 10^{-6} M de CGRP. Pour ce faire, les bactéries ont été cultivées en présence de l'hormone puis l'extraction des ARNm et le séquençage ont été réalisés par la société Genewiz. Le traitement des données bioinformatiques a été réalisé, comme décrit dans la partie « Résultats expérimentaux », avec le soutien du Dr. Amine Boukerb (UR4312 CBSA, Université de Rouen Normandie). Il a consisté en une quantification de l'expression par rapport à la condition contrôle (sans hormone) afin de calculer le Fold Change (FC) de chaque gène exprimé différentiellement de manière significative (p-value < 0,05). L'analyse n'a révélé aucune différence d'expression des gènes, à un FC ≥ 1,5, pour *S. capitis* et les deux souches de *C. acnes* (**Article 2**). Malheureusement, *M. luteus* étant une bactérie bien moins étudiée, le kit disponible n'a pas permis de réaliser correctement la déplétion des ARN ribosomaux, une étape

nécessaire lors d'un séquençage des ARNm. Dans le cas de *B. licheniformis*, un nombre limité de gènes est apparu en se plaçant à un FC allant de 1 à 1,5 mais ces gènes ne codent pas pour des régulateurs clés de la physiologie bactérienne (**Article 1 – Table 2**). En conclusion, il semblerait donc que le CGRP n'agit pas sur la transcription des gènes dans nos conditions de cultures et sur les souches testées au cours de notre étude. Cela n'exclut cependant pas de potentiels effets *a posteriori* qui pourraient être évalués en combinant ces premières données à des études de protéomique et de métabolomique. En effet, comme observé par **N'Diaye *et al.* (2016b)** chez *S. epidermidis*, le CGRP est aussi capable de stimuler la libération d'enzymes et de protéines, voire de métabolites, dans le sécrétome bactérien et les mécanismes impliqués ne sont pas nécessairement liés à des régulations au niveau transcriptionnel.

En parallèle de ce premier séquençage, une deuxième analyse transcriptomique a été réalisée afin de mieux comprendre l'impact du CGRP sur la modulation de l'expression des gènes lors d'une infection du modèle cellulaire HaCaT par *B. licheniformis* MIC004.

Dans un premier temps, en comparant avec les résultats obtenus pour la condition contrôle (cellules HaCaT seules *versus* cellules HaCaT exposées aux bactéries témoin), il apparaît que 731 gènes (représentant 1,15% du génome) sont différentiellement exprimés (FC ≥ 1,5) en cas d'infection des cellules avec *B. licheniformis* MIC004 (**Article 1 – Figure 7A**). Les gènes avec un FC ≥ 3 et une p-value ajustée < 0,05 sont présentés dans le **Supplementary Table 1** (**Article 1**). Parmi eux, on retrouve 87 et 41 gènes qui sont respectivement sur- et sous-exprimés avec une portion d'entre eux, 38 au total, qui sont à ce jour non caractérisés. On observe en particulier une surexpression des gènes codant pour des cytokines (**CSF2**, +4.01 ; **CSF3**, +3.87 ; **IL1B**, +3.13 ; **IL6**, +5.77), des chimiokines (**CXCL1**, +4.42 ; **CXCL2**, +5.37 ; **CXCL3**, +4.56 ; **CXCL8**, +5.05) et d'autres facteurs impliqués dans la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires (**CD55**, +3.29 ; **NFKBIA**, +4.79 ; **NFKBIZ**, +3.37 ; **PRDM1**, +3.42 ; **SOCS3**, +3.85). Ainsi, bien que *B. licheniformis* MIC004 ne possède pas d'effet cytotoxique, ces résultats démontrent que l'infection avec cette souche provoque tout de même une activation des facteurs impliqués dans l'inflammation et le recrutement des cellules immunitaires. Cette bactérie étant un potentiel microorganisme commensal de la peau, il semble étonnant de constater qu'elle possède un potentiel inflammatoire propre sur les kératinocytes,

même en l'absence de toute stimulation. Il faut toutefois indiquer que le modèle utilisé (cellules HaCaT en culture) est assez éloigné de la réalité physiologique, à la fois par l'absence du *stratum corneum* de la peau mais également des autres cellules de l'épiderme et du derme (mastocytes, dendrocytes, mélanocytes, fibrolastes, *etc.*) qui contribuent à la régulation des kératinocytes. Un résultat similaire avait été observé pour les deux souches de *C. acnes,* RT4 516 et RT6 554, envers la lignée de sébocytes SZ95. Dans cette étude de **Borrel *et al.* (2019)**, les auteurs avaient relevé une augmentation de la libération d'IL-8, un marqueur classique de l'inflammation, après infection de la lignée de sébocytes par les deux souches bactériennes étudiées, et ce même en l'absence de tout traitement. La première étude, au niveau transcriptionnel, sur des kératinocytes infectés par des bactéries exposées à une neurohormone cutanée a été réalisée par qRT-PCR sur le modèle RHE (**N'Diaye *et al.*, 2016a**), en sélectionnant 64 gènes dont l'expression a été évaluée après infection avec *S. aureus* et *S. epidermidis* prétraitées ou non par 10^{-6} M de SP. Les résultats avaient alors montré des modifications de l'expression des gènes liés aux défenses immunitaires et à l'inflammation impliquant des voies et des effecteurs différents pour ces deux bactéries, malgré leur proximité phylogénétique. Les données de la littérature citées dans le Chapitre 1 de l'Introduction (voir III-5-2. Stimulation du système immunitaire) démontrent que la flore commensale cutanée participe activement aux défenses de l'hôte. Que cela soit en produisant ou en stimulant la sécrétion d'AMPs, ou encore en entraînant la libération de cytokines et modulant de ce fait l'inflammation, les bactéries du microbiote cutané sont ainsi un acteur essentiel de l'immunité (**Belkaid and Segre, 2014**). *B. licheniformis* MIC004 pourrait ainsi également rentrer dans ce cas de figure et maintenir l'inflammation des kératinocytes à un niveau basal.

En parallèle de l'activation du processus inflammatoire, plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans la réponse au stress sont également surexprimés, tels que les phosphatases **DUSP1** (+4.61), **DUSPP2** (+3.08) et **DUSP5** (+3.62) ou encore les facteurs **GADD45B** (+3.37) et **PPP1R15A** (+3.65). Des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose (**ATF3**, +4.70 ; **BIRC3**, +3.24) sont également affectés, démontrant un éventuel impact de *B. licheniformis* sur la mort cellulaire. Plusieurs facteurs de croissance (**HBEGF**, +4.08 ; **FGF19**, +3.41) dont notamment une amphiréguline (**AREG**,

+3.03) faisant partie de la famille des facteurs de croissance épidermique sont surexprimés. La bibliographie indique d'ailleurs un lien entre cette dernière et le développement du psoriasis (**Chung *et al.*, 2005**), une maladie marquée par une hyperprolifération des kératinocytes et une infiltration de cellules inflammatoires. Plusieurs des gènes mentionnés ci-dessus codent également pour des facteurs qui vont intervenir dans la différenciation cellulaire et le remodelage des tissus. Bien entendu, plusieurs régulateurs transcriptionnels (**EGR2**, +3.60 ; **EGR3**, +3.37, **ELF3**, +3.59, **FOSB**, +4.93, **JUN**, +5.23, **MAFF**, +3.15) donc certains nucléaires (**NR4A1**, + 6,96 ; **NR4A2**, + 6.37 ; **NR4A3**, +6.40) ainsi que gènes codant des facteurs impliqués dans la signalisation (**HCST**, +4.09 ; **IGFL1**, +3.53) sont largement surexprimés. Enfin, la présence de microARNs (**MIR212**, +4.31 ; **MIR3191**, +3.01 ; **MIR637**, +3.37 ; **MIR9902-2**, +3.34) dont le rôle se situe davantage au niveau des régulations post-transcriptionnelles est aussi à noter. La portion de gènes sous-exprimés est plus faible et regroupe, entre autres, un gène codant pour une protéine impliquée dans le transport des lipides (**MFSD2**, -3.98), un autre codant pour une métallopeptidase (**MMP12G**, -3.02) et, à nouveau, des microARNs (**MIR219B**, -3.05 ; **MIR6739**, -3.43 ; **MIR6767**, -3.30 ; **MIR8075**, -3.44). L'étude génomique réalisée sur la souche *B. licheniformis* MIC004, et détaillée dans l'**Article 1**, a démontré la présence de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de petits peptides bioactifs (dioxopipérazines, peptides cycliques, thiopeptides, lanthipeptides et lassopeptides) ainsi que de 12 clusters de gènes biosynthétiques (RiPPs, NRPS, terpènes, bêtalactone, *etc.*) responsables de la production de métabolites secondaires. La diversité d'activités biologiques dues à ces composés pourrait expliquer que malgré l'absence de cytotoxicité, *B. licheniformis* soit tout de même capable d'induire des modifications de l'expression des gènes chez les cellules HaCaT à travers des mécanismes qui restent encore à identifier.

Afin d'étudier l'impact du CGRP sur le processus infectieux de *B. licheniformis*, nous avons ensuite comparé la condition correspondant à une infection par une culture de *B. licheniformis* MIC004 témoin avec une infection réalisée avec des bactéries prétraitées avec 10^{-6} M du neuropeptide (**Article 1 – Figure 7B**). Au total, ce sont 81 gènes (**Article 1 – Supplementary Table 2**) qui sont différentiellement exprimés, avec un FC ≥ 1,5 et une p-value ajustée < 0,05. Parmi eux, 34 et 47 gènes sont respectivement sur- et sous-

exprimés. Parmi les 8 transcrits (**IL23A**, **LINC02029**, **LINC02957**, **LOC107986426**, **LOC124903733**, **LOC124904076**, **LOC124907758**, **SH2D3C**) qui sont retrouvés aussi bien dans le cas d'une infection classique des HaCaT par la bactérie, qu'en cas de prétraitement avec le CGRP, se trouve des ARNm codant la sous-unité alpha d'une cytokine pro-inflammatoire (**IL23A**) et une protéine adaptatrice (**SH2D3C**) intervenant dans plusieurs voies de signalisation (adhésion et migration cellulaire, organisation tissulaire et régulation de la réponse immunitaire).

Parmi les gènes surexprimés, trois donnent lieu à des ARN non codants, ne possédant aucune indication particulière quant à leur fonction, et 18 codent pour des transcrits qui sont, à ce jour, non caractérisés. On retrouve une surexpression de deux gènes (**FGF5**, +2.70 ; **FGF18**, +1.86) codant pour des facteurs de croissance des fibroblastes impliqués dans une variété de processus biologiques dont la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que la réparation tissulaire. La protéine FGF5 a cependant été identifiée comme oncogène et peut être utilisée pour la transformation de lignées cellulaires de mammifères, un élément à prendre en compte dans le cas des cellules HaCaT. Deux transcrits (**LSMEM1**, +1.66 ; **MARCH4**, +1.54) codent pour des protéines associées à la membrane, la deuxième étant également impliquée dans le processus d'ubiquitination des résidus de lysine du CMH-I, favorisant ainsi son endocytose, et du CD4 (**Bartee *et al.*, 2004**). Deux autres transcrits (**MMP10**, +2.25 ; **MMP13**, +1.63) correspondent à des métallopeptidases matricielles impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (notamment le collagène), et par conséquent dans l'homéostasie cutanée, la cicatrisation et le remodelage des tissus. Un autre transcrit (**SQSTM1**, +1.75) semble impliqué dans la régulation de l'activation du facteur NF-kB, impliqué dans l'immunité et la réponse au stress. De façon intéressante, un des transcrits code pour la **RNase7** (+1.84) qui possède une activité antimicrobienne à large spectre contre les bactéries et les champignons et participe aux défenses cutanées (**Rademacher *et al.*, 2016**). Plusieurs études ont ainsi démontré le rôle de cette protéine dans le contrôle de la croissance et des infections de la peau par divers bactéries commensales et pathogènes telles que *Corynebacterium amycolatum* (**Walter *et al.*, 2017**), *Enterococcus faecium* (**Köten *et al.*, 2009**), *P. aeruginosa* (**Rademacher *et al.*, 2017**) ou encore *S. aureus* (**Simanski *et al.*, 2010**).

Les résultats obtenus, dans cette étude de transcriptomique, indiquent que la majorité des gènes dont la transcription est impactée lors d'une infection des cellules HaCaT par des bactéries prétraitées au CGRP sont sous-exprimés. Plusieurs transcrits correspondent à des transporteurs (**ABCA4**, -2.35 ; **KCNH4**, -3.03 ; **SLC39A2**, -1.72 ; **TMEM37**, -1.95 ; **TMPRSS13**, -1.71), un facteur de transcription (**FOXO6_1**, -1.76), des protéines impliquées dans la signalisation (**DUSP19**, -2.39 ; **WNT4**, -1.52), la croissance et la différenciation des cellules épithéliales (**CALML5**, -2.31 ; **NRG2**, -.169), la mort cellulaire (**TP53INP1**, -1.91) ou encore le trafic des vésicules (**NSG1**, -1.72 ; **RAB26**, -2.87). En particulier, nous avons constaté une baisse de l'expression des gènes codant pour des kératines (**KRT13**, -1.86 ; **KRT15**, -1.76), ainsi qu'une desmogléine (**DSG4**, -1.64). Les kératines sont une famille de protéines dont différents types d'hétérodimères vont se succéder pendant la différenciation des kératinocytes, ce qui impactera la structure du cytosquelette et la morphologie des cellules (**Xu *et al.*, 2019**). La desmogléine, quant à elle, est une protéine transmembranaire et un composant des desmosomes, qui joue donc un rôle clé dans l'adhésion des cellules entre elles. Leur sous-expression pourrait indiquer une éventuelle altération de l'intégrité de la monocouche de HaCaT qui, si elle est confirmée sur d'autres modèles, pourrait ultérieurement démontrer une atteinte de la barrière cutanée. Plusieurs gènes codent également pour des protéines possédant des activités enzymatiques telles que des membres de la famille des cytochromes P450 (**CYP2W1**, -2.40 ; **CYP4B1**, -1.84), une désaturase (**DEGS2**, -2.75) et des transférases (**MGAT3**, -3.42 ; **TMT1A**, -2.66). Des protéines impliquées dans l'immunité (**LY6D**, -1.79 ; **MAL**, -2.64) dont notamment une cytokine membre de la famille des TNF (**TNFSF10**, -1.59) capable d'induire l'apoptose et une protéine membre de la superfamille des TGFβ (**BMP3**, -1.70) sont également à noter.

En conclusion, il est possible d'observer que malgré une absence d'effet du CGRP sur les différents paramètres physiologiques testés précédemment, ainsi que sur le transcriptome de *B. licheniformis*, le neuropeptide possède tout de même un impact sur la capacité de la bactérie à moduler la physiologie des kératinocytes. Afin de préciser les résultats obtenus, il serait nécessaire de réaliser des expériences de qRT-PCR sur les gènes d'intérêt qui ressortent de cette étude transcriptomique. Tout comme dans le cas des bactéries, combiner cela à une étude protéomique ou métabolomique permettrait

d’apporter encore davantage de réponses sur les effets du CGRP sur le processus infectieux de *B. licheniformis*. Bien que très utile pour un premier criblage en modèle *in vitro*, les résultats obtenus sur les cellules HaCaT encouragent à réaliser des expériences sur des modèles 3D plus développés, potentiellement vascularisés, voir innervés, bien que ceux-ci restent encore à mettre en place à l’heure actuelle.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Le Calcitonin Gene-Related Peptide est un des neuropeptides les plus abondants au niveau cutané. En complément d'une importante activité vasodilatatrice, le CGRP est notamment connu pour son implication dans les voies de la douleur et l'apparition de la migraine. Libéré par les terminaisons nerveuses afférentes de types C, et produit aussi bien par les cellules endothéliales du réseau vasculaire, que par les cellules immunitaires et les kératinocytes, le CGRP possède un rôle essentiel dans l'inflammation neurogène et la morphogénèse cutanée. Dans la littérature, l'étude de **N'Diaye *et al*. (2016b)** est la première à s'être intéressée à l'impact direct de ce neuropeptide sur la physiologie et la virulence bactérienne. C'est ainsi qu'a été mis en évidence que la souche *S. epidermidis* MFP04 est sensible au CGRP, et que de premières expériences ont placé la protéine chaperonne DnaK comme senseur potentiel de la molécule.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de montrer un effet du CGRP sur une autre espèce bactérienne, *B. licheniformis* MIC004, provenant du cuir chevelu d'un volontaire sain. Le follicule pileux étant un environnement densément innervé, la libération de neurohormones et neurotransmetteurs y est donc conséquente. Les premiers résultats obtenus ont montré une absence d'effet du neuropeptide sur la croissance, la capacité à former du biofilm, la résistance aux antibiotiques et la cytotoxicité de la souche MIC004. Une étude transcriptomique est ensuite venue compléter ces résultats en démontrant une absence de variation de l'expression des gènes après exposition de la bactérie au CGRP. Cependant, l'infection de la lignée cellulaire HaCaT, par *B. licheniformis* MIC004, puis l'analyse du transcriptome des kératinocytes a indiqué que cette souche possède un potentiel inflammatoire intéressant, même en l'absence de toute stimulation. En comparaison, après infection avec la bactérie prétraitée avec le neuropeptide, la baisse de l'expression des gènes codant pour des protéines liées à l'intégrité de la monocouche de cellules, telles que les kératines et une desmogléine, indique une potentielle atteinte à la barrière cutanée. Celle-ci reste à confirmer sur d'autres modèles de cultures cellulaires et par qRT-PCR des gènes d'intérêt. *B. licheniformis* possédant de nombreux clusters de gènes permettant la production d'une variété de métabolites secondaires, de prochaines études de protéomique et de métabolomique sur cette souche devraient permettre

d'apporter plus de réponses sur l'action du CGRP. En effet, le transcriptome à lui seul ne permet pas de rendre compte de l'impact du processus de traduction et des modifications qui précèdent et suivent celui-ci sur le protéome et le métabolome bactérien.

D'autres microorganismes commensaux, *S. capitis*, *M. luteus* et *C. acnes* ont également été exposés au neuropeptide. Là encore, le CGRP ne semble pas impacter la croissance, la formation de biofilm ou encore la transcription des gènes chez ces souches, à l'exception de *M. luteus* dont une éventuelle stimulation de la formation de biofilm reste à confirmer. Les premiers résultats obtenus chez *P. fluorescens* sont similaires et n'indiquent également aucun effet sur la cytotoxicité et le potentiel inflammatoire de cette bactérie à Gram négatif. Il n'est pas surprenant que des bactéries provenant d'un environnement, où elles sont régulièrement exposées aux facteurs de leur hôte, ne voient pas nécessairement leur physiologie ou leur virulence être modifiée après exposition à ces derniers. Cependant, il est important de rappeler que de fortes variations locales de concentrations peuvent être observées pour le CGRP, ainsi que la majorité des neurohormones cutanées, dont la demi-vie va également varier en fonction de la localisation. De même, au vu des résultats obtenus sur *S. aureus* et *S. epidermidis*, il apparaît que les effets du CGRP sont espèces, voir souches dépendants, et sans aucun doute influencés par les conditions microenvironnementales et, dans le cadre de cette thèse, par la méthodologie employée.

L'Endocrinologie Microbienne reste un domaine d'étude relativement récent, et pour lequel les efforts se sont longtemps concentrés sur l'étude des catécholamines (Epi, NE et dopamine). Ce n'est que récemment que les travaux du laboratoire ont démontré que les hormones humaines peuvent impacter les communautés microbiennes cutanées. Etudiées d'abord pour leurs effets à l'échelle individuelle, la SP et le CGRP ont fait l'objet d'une première manipulation montrant leur action antagoniste sur la cytotoxicité de *S. epidermidis* (**N'Diaye *et al.*, 2016b**) et laissant penser à des similarités dans leur mécanisme de détection par la bactérie. Comme démontré dans le Chapitre 2 de l'Introduction, plusieurs hormones (SP, CGRP mais aussi NKA, VIP, NPY, dynorphine, *etc.*) co-existent et sont co-sécrétées au niveau de la peau. Ainsi il serait intéressant, lors de futures études, d'évaluer les effets de différentes combinaisons de ces hormones,

tout en intégrant davantage de souches d'une même espèce bactérienne afin de couvrir les potentiels variabilités intra-espèces qui peuvent exister. De la même manière, il est admis que le microbiote cutané est un écosystème complexe dont la composition et la localisation va être dépendante de plusieurs paramètres. La composante microbienne de celui-ci est souvent la première à être mise en avant dans la majorité des études. Il est cependant important de rappeler que les champignons et les virus (dont les phages) sont des membres à part entière de ce microbiote. L'intérêt grandissant de la bibliographie pour le genre *Malassezia* pousse par exemple à envisager des études sur des interactions tripartites : bactéries, levures et cellules humaines. De même, les bactériophages participent à la dynamique du microbiote cutané puisque leurs cycles de vie, lytique ou lysogénique, ont des conséquences directes sur la composition des populations bactériennes et peuvent également affecter leur physiologie. Il est tout à fait envisageable que l'activité de ces phages puissent être régulée par les neurohormones cutanées, en faisant un autre élément qui reste à explorer dans de futures études.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdallah, F., Mijouin, L., Pichon, C., 2017. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. Mediators of Inflammation 2017, 5095293. https://doi.org/10.1155/2017/5095293

Adimpong, D.B., Sørensen, K.I., Thorsen, L., Stuer-Lauridsen, B., Abdelgadir, W.S., Nielsen, D.S., Derkx, P.M.F., Jespersen, L., 2012. Antimicrobial Susceptibility of Bacillus Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology 78, 7903–7914. https://doi.org/10.1128/AEM.00730-12

Agerholm, J.S., Jensen, N.E., Dantzer, V., Jensen, H.E., Aarestrup, F.M., 1999. Experimental Infection of Pregnant Cows with Bacillus licheniformis Bacteria. Vet Pathol 36, 191–201. https://doi.org/10.1354/vp.36-3-191

Ahle, C.M., Feidenhansl, C., Brüggemann, H., 2023. Cutibacterium acnes. Trends in Microbiology 31, 419–420. https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.10.006

Aiyar, N., Rand, K., Elshourbagy, N.A., Zeng, Z., Adamou, J.E., Bergsma, D.J., Li, Y., 1996. A cDNA Encoding the Calcitonin Gene-related Peptide Type 1 Receptor (∗). Journal of Biological Chemistry 271, 11325–11329. https://doi.org/10.1074/jbc.271.19.11325

Albertin, G., Carraro, G., Parnigotto, P.P., Conconi, M.T., Ziolkowska, A., Malendowicz, L.K., Nussdorfer, G.G., 2003. Human skin keratinocytes and fibroblasts express adrenomedullin and its receptors, and adrenomedullin enhances their growth in vitro by stimulating proliferation and inhibiting apoptosis. International Journal of Molecular Medicine 11, 635–639. https://doi.org/10.3892/ijmm.11.5.635

Albrandt, K., Brady, E.M., Moore, C.X., Mull, E., Sierzega, M.E., Beaumont, K., 1995. Molecular cloning and functional expression of a third isoform of the human calcitonin receptor and partial characterization of the calcitonin receptor gene. Endocrinology 136, 5377–5384. https://doi.org/10.1210/endo.136.12.7588285

Alexopoulos, A., Chrousos, G.P., 2016. Stress-related skin disorders. Rev Endocr Metab Disord 17, 295–304. https://doi.org/10.1007/s11154-016-9367-y

Allaker, R.P., Greenman, J., Osborne, R.H., 1986. Histamine production by Propionibacterium acnes in batch and continuous culture. Microbios 48, 165–172.

Alrumman, S.A., Mostafa, Y.S., Al-izran, K.A., Alfaifi, M.Y., Taha, T.H., Elbehairi, S.E., 2019. Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase from Bacillus licheniformis Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. Sci Rep 9, 3756. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40512-x

Amara, S.G., Arriza, J.L., Leff, S.E., Swanson, L.W., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G., 1985. Expression in Brain of a Messenger RNA Encoding a Novel Neuropeptide Homologous to Calcitonin Gene-Related Peptide. Science 229, 1094–1097. https://doi.org/10.1126/science.2994212

Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S., Evans, R.M., 1982. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature 298, 240–244. https://doi.org/10.1038/298240a0

Amblee, V., Jeffery, C.J., 2015. Physical Features of Intracellular Proteins that Moonlight on the Cell Surface. PLOS ONE 10, e0130575. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130575

Ameur, M.A., Dubrous, P., Koeck, J.L., 2005. *Bacillus licheniformis* : agent causal d'érysipèle. Médecine et Maladies Infectieuses 35, 417–418. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.04.007

Anderson, M.T., Armstrong, S.K., 2008. Norepinephrine Mediates Acquisition of Transferrin-Iron in Bordetella bronchiseptica. Journal of Bacteriology 190, 3940–3947. https://doi.org/10.1128/jb.00086-08

Andreis, D.T., Singer, M., 2016. Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-and-Hyde conundrum. Intensive Care Med 42, 1387–1397. https://doi.org/10.1007/s00134-016-4249-z

Arda, O., Göksügür, N., Tüzün, Y., 2014. Basic histological structure and functions of facial skin. Clinics in Dermatology, Red Face Revisited: I 32, 3–13. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021

Arena, A., Maugeri, T.L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., Bisignano, G., 2006. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. International Immunopharmacology 6, 8–13. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.07.004

Argunhan, F., Brain, S.D., 2022. The Vascular-Dependent and -Independent Actions of Calcitonin Gene-Related Peptide in Cardiovascular Disease. Front. Physiol. 13. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.833645

Aroori, S.V., Cogan, T.A., Humphrey, T.J., 2014. Effect of Noradrenaline on the Virulence Properties of Campylobacter Species. International Journal of Microbiology 2014, 279075. https://doi.org/10.1155/2014/279075

Assas, B.M., Pennock, J.I., Miyan, J.A., 2014. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. Front. Neurosci. 8. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00023

Atanasova, K.R., Reznikov, L.R., 2018. Neuropeptides in asthma, chronic obstructive pulmonary disease and cystic fibrosis. Respiratory Research 19, 149. https://doi.org/10.1186/s12931-018-0846-4

Augustyniak, D., Kramarska, E., Mackiewicz, P., Orczyk-Pawiłowicz, M., Lundy, F.T., 2021. Mammalian Neuropeptides as Modulators of Microbial Infections: Their Dual Role in Defense versus Virulence and Pathogenesis. International Journal of Molecular Sciences 22, 3658. https://doi.org/10.3390/ijms22073658

Augustyniak, D., Nowak, J., Lundy, F.T., 2012. Direct and Indirect Antimicrobial Activities of Neuropeptides and their Therapeutic Potential. Curr Protein Pept Sci 13, 723–738. https://doi.org/10.2174/138920312804871139

Ayala-Fontánez, N., Soler, D.C., McCormick, T.S., 2016. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. Psoriasis: Targets and Therapy 6, 7–32. https://doi.org/10.2147/PTT.S64950

Bager, P., Wohlfahrt, J., Westergaard, T., 2008. Caesarean delivery and risk of atopy and allergic disesase: meta-analyses. Clinical & Experimental Allergy 38, 634–642. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.02939.x

Baldwin, H.E., Bhatia, N.D., Friedman, A., Eng, R.M., Seite, S., 2017. The Role of Cutaneous Microbiota Harmony in Maintaining a Functional Skin Barrier. J Drugs Dermatol 16, 12–18.

Bansal, T., Englert, D., Lee, J., Hegde, M., Wood, T.K., Jayaraman, A., 2007. Differential Effects of Epinephrine, Norepinephrine, and Indole on Escherichia coli O157:H7 Chemotaxis, Colonization, and Gene Expression. Infection and Immunity 75, 4597–4607. https://doi.org/10.1128/iai.00630-07

Barbieri, J.S., Wanat, K., Seykora, J., 2014. Skin: Basic Structure and Function, in: McManus, L.M., Mitchell, R.N. (Eds.), Pathobiology of Human Disease. Academic Press, San Diego, pp. 1134–1144. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.03501-2

Barnard, E., Shi, B., Kang, D., Craft, N., Li, H., 2016. The balance of metagenomic elements shapes the skin microbiome in acne and health. Sci Rep 6, 39491. https://doi.org/10.1038/srep39491

Bartee, E., Mansouri, M., Hovey Nerenberg, B.T., Gouveia, K., Früh, K., 2004. Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I by Human Ubiquitin Ligases Related to Viral Immune Evasion Proteins. Journal of Virology 78, 1109–1120. https://doi.org/10.1128/jvi.78.3.1109-1120.2004

Bäsler, K., Galliano, M.-F., Bergmann, S., Rohde, H., Wladykowski, E., Vidal-y-Sy, S., Guiraud, B., Houdek, P., Schüring, G., Volksdorf, T., Caruana, A., Bessou-Touya, S., Schneider, S.W., Duplan, H., Brandner, J.M., 2017. Biphasic influence of Staphylococcus aureus on human

epidermal tight junctions. Annals of the New York Academy of Sciences 1405, 53–70. https://doi.org/10.1111/nyas.13418

Baxter, G.F., 2004. The natriureticpeptides. Basic Res Cardiol 99, 71–75. https://doi.org/10.1007/s00395-004-0457-8

Bay, L., Barnes, C.J., Fritz, B.G., Thorsen, J., Restrup, M.E.M., Rasmussen, L., Sørensen, J.K., Hesselvig, A.B., Odgaard, A., Hansen, A.J., Bjarnsholt, T., 2020. Universal Dermal Microbiome in Human Skin. mBio 11, 10.1128/mbio.02945-19. https://doi.org/10.1128/mbio.02945-19

Bearson, B.L., Bearson, S.M.D., 2008. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbial Pathogenesis 44, 271–278. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.10.001

Belkaid, Y., Segre, J.A., 2014. Dialogue between skin microbiota and immunity. Science 346, 954–959. https://doi.org/10.1126/science.1260144

Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J.G., Geppetti, P., 2009. CGRP receptors in the control of pain and inflammation. Current Opinion in Pharmacology, Neurosciences 9, 9–14. https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.007

Berrier, C., Garrigues, A., Richarme, G., Ghazi, A., 2000. Elongation Factor Tu and DnaK Are Transferred from the Cytoplasm to the Periplasm of Escherichia coli during Osmotic Downshock Presumably via the Mechanosensitive Channel MscL. Journal of Bacteriology 182, 248–251. https://doi.org/10.1128/jb.182.1.248-251.2000

Biaggini, K., Barbey, C., Borrel, V., Feuilloley, M., Déchelotte, P., Connil, N., 2015. The pathogenic potential of Pseudomonas fluorescens MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. Arch Microbiol 197, 983–990. https://doi.org/10.1007/s00203-015-1135-y

Biaggini, K., Borrel, V., Szunerits, S., Boukherroub, R., N'Diaye, A., Zébré, A., Bonnin-Jusserand, M., Duflos, G., Feuilloley, M., Drider, D., Déchelotte, P., Connil, N., 2017. Substance P enhances lactic acid and tyramine production in Enterococcus faecalis V583 and promotes its cytotoxic effect on intestinal Caco-2/TC7 cells. Gut Pathog 9, 20. https://doi.org/10.1186/s13099-017-0171-3

Bibel, D.J., Lovell, D.J., Smiljanic, R.J., 1978. Survival of bacillus licheniformis on human skin. Applied and Environmental Microbiology 35, 1128–1135. https://doi.org/10.1128/aem.35.6.1128-1135.1978

Bigal, M.E., Edvinsson, L., Rapoport, A.M., Lipton, R.B., Spierings, E.L.H., Diener, H.-C., Burstein, R., Loupe, P.S., Ma, Y., Yang, R., Silberstein, S.D., 2015. Safety, tolerability, and efficacy of TEV-48125 for preventive treatment of chronic migraine: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b study. The Lancet Neurology 14, 1091–1100. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00245-8

Bigal, M.E., Walter, S., Rapoport, A.M., 2013. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) and Migraine Current Understanding and State of Development. Headache: The Journal of Head and Face Pain 53, 1230–1244. https://doi.org/10.1111/head.12179

Birklein, F., Schmelz, M., Schifter, S., Weber, M., 2001. The important role of neuropeptides in complex regional pain syndrome. Neurology 57, 2179–2184. https://doi.org/10.1212/WNL.57.12.2179

Bitschar, K., Sauer, B., Focken, J., Dehmer, H., Moos, S., Konnerth, M., Schilling, N.A., Grond, S., Kalbacher, H., Kurschus, F.C., Götz, F., Krismer, B., Peschel, A., Schittek, B., 2019. Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. Nat Commun 10, 2730. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10646-7

Black, P.H., 2002. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. Brain, Behavior, and Immunity 16, 622–653. https://doi.org/10.1016/S0889-1591(02)00021-1

Blier, A.-S., Veron, W., Bazire, A., Gerault, E., Taupin, L., Vieillard, J., Rehel, K., Dufour, A., Le Derf, F., Orange, N., Hulen, C., Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., 2011. C-type natriuretic peptide modulates quorum sensing molecule and toxin production in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology 157, 1929–1944. https://doi.org/10.1099/mic.0.046755-0

Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A.M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G.P., Medema, M.H., Weber, T., 2021. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. Nucleic Acids Res 49, W29–W35. https://doi.org/10.1093/nar/gkab335

Bodó, E., Kany, B., Gáspár, E., Knüver, J., Kromminga, A., Ramot, Y., Bíró, T., Tiede, S., van Beek, N., Poeggeler, B., Meyer, K.C., Wenzel, B.E., Paus, R., 2010. Thyroid-Stimulating Hormone, a Novel, Locally Produced Modulator of Human Epidermal Functions, Is Regulated by Thyrotropin-Releasing Hormone and Thyroid Hormones. Endocrinology 151, 1633–1642. https://doi.org/10.1210/en.2009-0306

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30, 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Bomar, L., Brugger, S.D., Yost, B.H., Davies, S.S., Lemon, K.P., 2016. Corynebacterium accolens Releases Antipneumococcal Free Fatty Acids from Human Nostril and Skin Surface Triacylglycerols. mBio 7, 10.1128/mbio.01725-15. https://doi.org/10.1128/mbio.01725-15

Booe, J.M., Walker, C.S., Barwell, J., Kuteyi, G., Simms, J., Jamaluddin, M.A., Warner, M.L., Bill, R.M., Harris, P.W., Brimble, M.A., Poyner, D.R., Hay, D.L., Pioszak, A.A., 2015. Structural Basis for Receptor Activity-Modifying Protein-Dependent Selective Peptide Recognition by a G Protein-Coupled Receptor. Molecular Cell 58, 1040–1052. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.018

Borrel, V., Thomas, P., Catovic, C., Racine, P.-J., Konto-Ghiorghi, Y., Lefeuvre, L., Duclairoir-Poc, C., Zouboulis, C.C., Feuilloley, M.G.J., 2019. Acne and Stress: Impact of Catecholamines on Cutibacterium acnes. Front. Med. 6. https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00155

Boujnane, M., Boukerb, A.M., Connil, N., 2024. Bacterial gene expression in response to catecholamine stress hormones. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research 36, 100543. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2024.100543

Boukerb, A.M., Cambronel, M., Rodrigues, S., Mesguida, O., Knowlton, R., Feuilloley, M.G.J., Zommiti, M., Connil, N., 2021. Inter-Kingdom Signaling of Stress Hormones: Sensing, Transport and Modulation of Bacterial Physiology. Front. Microbiol. 12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.690942

Bouslimani, A., da Silva, R., Kosciolek, T., Janssen, S., Callewaert, C., Amir, A., Dorrestein, K., Melnik, A.V., Zaramela, L.S., Kim, J.-N., Humphrey, G., Schwartz, T., Sanders, K., Brennan, C., Luzzatto-Knaan, T., Ackermann, G., McDonald, D., Zengler, K., Knight, R., Dorrestein, P.C., 2019. The impact of skin care products on skin chemistry and microbiome dynamics. BMC Biology 17, 47. https://doi.org/10.1186/s12915-019-0660-6

Boxberger, M., Cenizo, V., Cassir, N., La Scola, B., 2021. Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. Microbiome 9, 125. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01062-5

Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Buanne, P., Finn, A., Stenfors, C., Vigneti, E., Theodorsson, E., Lundeberg, T., 2002. NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF? Journal of Neuroimmunology 123, 58–65. https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00475-1

Brain, S.D., 1997. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. Immunopharmacology 37, 133–152. https://doi.org/10.1016/S0162-3109(97)00055-6

Brain, S.D., Grant, A.D., 2004. Vascular Actions of Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin. Physiological Reviews 84, 903–934. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2003

Brain, S.D., Tippins, J.R., Morris, H.R., MacIntyre, I., Williams, T.J., 1986. Potent Vasodilator Activity of Calcitonin Gene-Related Peptide in Human Skin. Journal of Investigative Dermatology 87, 533–536. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12455620

Brain, S.D., Williams, T.J., 1988. Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. Nature 335, 73–75. https://doi.org/10.1038/335073a0

Brain, S.D., Williams, T.J., 1985. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. Br J Pharmacol 86, 855–860.

Brain, S.D., Williams, T.J., Tippins, J.R., Morris, H.R., MacIntyre, I., 1985. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature 313, 54–56. https://doi.org/10.1038/313054a0

Brogden, K.A., Guthmiller, J.M., Salzet, M., Zasloff, M., 2005. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. Nat Immunol 6, 558–564. https://doi.org/10.1038/ni1209

Brown, M.M., Horswill, A.R., 2020. Staphylococcus epidermidis—Skin friend or foe? PLOS Pathogens 16, e1009026. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009026

Buckley, T.L., Brain, S.D., Collins, P.D., Williams, T.J., 1991. Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. The Journal of Immunology 146, 3424–3430. https://doi.org/10.4049/jimmunol.146.10.3424

Bühlmann, N., Leuthäuser, K., Muff, R., Fischer, J.A., Born, W., 1999. A Receptor Activity Modifying Protein (RAMP)2-Dependent Adrenomedullin Receptor Is a Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor when Coexpressed with Human RAMP1*. Endocrinology 140, 2883–2890. https://doi.org/10.1210/endo.140.6.6783

Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L., 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological Reviews 198, 169–184. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x

Burbach, G.J., Kim, K.H., Zivony, A.S., Kim, A., Aranda, J., Wright, S., Naik, S.M., Caughman, S.W., Ansel, J.C., Armstrong, C.A., 2001. The Neurosensory Tachykinins Substance P and Neurokinin A Directly Induce Keratinocyte Nerve Growth Factor. Journal of Investigative Dermatology 117, 1075–1082. https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01498.x

Burns, E.M., Ahmed, H., Isedeh, P.N., Kohli, I., Van Der Pol, W., Shaheen, A., Muzaffar, A.F., Al-Sadek, C., Foy, T.M., Abdelgawwad, M.S., Huda, S., Lim, H.W., Hamzavi, I., Bae, S., Morrow, C.D., Elmets, C.A., Yusuf, N., 2019. Ultraviolet radiation, both UVA and UVB, influences the composition of the skin microbiome. Exp Dermatol 28, 136–141. https://doi.org/10.1111/exd.13854

Byrd, A.L., Belkaid, Y., Segre, J.A., 2018. The human skin microbiome. Nat Rev Microbiol 16, 143–155. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157

Byrd, A.L., Deming, C., Cassidy, S.K.B., Harrison, O.J., Ng, W.-I., Conlan, S., Belkaid, Y., Segre, J.A., Kong, H.H., 2017. Staphylococcus aureus and S. epidermidis strain diversity underlying human atopic dermatitis. Sci Transl Med 9, eaal4651. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal4651

Cadet, J., Douki, T., 2018. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. Photochem Photobiol Sci 17, 1816–1841. https://doi.org/10.1039/c7pp00395a

Cai, W.-Q., Bodin, P., Loesch, A., Sexton, A., Burnstock, G., 2008. Endothelium of Human Umbilical Blood Vessels: Ultrastructural Immunolocalization of Neuropeptides. Journal of Vascular Research 30, 348–355. https://doi.org/10.1159/000159017

Callewaert, C., Kerckhof, F.-M., Granitsiotis, M.S., Gele, M.V., Wiele, T.V. de, Boon, N., 2013. Characterization of Staphylococcus and Corynebacterium Clusters in the Human Axillary Region. PLOS ONE 8, e70538. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070538

Cambronel, M., Nilly, F., Mesguida, O., Boukerb, A.M., Racine, P.-J., Baccouri, O., Borrel, V., Martel, J., Fécamp, F., Knowlton, R., Zimmermann, K., Domann, E., Rodrigues, S., Feuilloley, M., Connil, N., 2020. Influence of Catecholamines

(Epinephrine/Norepinephrine) on Biofilm Formation and Adhesion in Pathogenic and Probiotic Strains of Enterococcus faecalis. Front Microbiol 11, 1501. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01501

Cambronel, M., Tortuel, D., Biaggini, K., Maillot, O., Taupin, L., Réhel, K., Rincé, I., Muller, C., Hardouin, J., Feuilloley, M., Rodrigues, S., Connil, N., 2019. Epinephrine affects motility, and increases adhesion, biofilm and virulence of Pseudomonas aeruginosa H103. Sci Rep 9, 20203. https://doi.org/10.1038/s41598-019-56666-7

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., Barcelos, L.S., 2014. Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. The Journal of Immunology 193, 5171–5180. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400625

Capone, K.A., Dowd, S.E., Stamatas, G.N., Nikolovski, J., 2011. Diversity of the Human Skin Microbiome Early in Life. Journal of Investigative Dermatology 131, 2026–2032. https://doi.org/10.1038/jid.2011.168

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Costello, E.K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., Gordon, J.I., Knight, R., 2011. Moving pictures of the human microbiome. Genome Biol 12, R50. https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-5-r50

Catania, A., Colombo, G., Rossi, C., Carlin, A., Sordi, A., Lonati, C., Turcatti, F., Leonardi, P., Grieco, P., Gatti, S., 2006. Antimicrobial Properties of α-MSH and Related Synthetic Melanocortins. The Scientific World Journal 6, 178684. https://doi.org/10.1100/tsw.2006.227

Chakravarty, P., Suthar, T.P., Coppock, H.A., Nicholl, C.G., Bloom, S.R., Legon, S., Smith, D.M., 2000. CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) and Receptor Activity Modifying Proteins (RAMPs) in rat tissues. British Journal of Pharmacology 130, 189–195. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702975

Chang, H.-W., Yan, D., Singh, R., Liu, J., Lu, X., Ucmak, D., Lee, K., Afifi, L., Fadrosh, D., Leech, J., Vasquez, K.S., Lowe, M.M., Rosenblum, M.D., Scharschmidt, T.C., Lynch, S.V., Liao, W., 2018. Alteration of the cutaneous microbiome in psoriasis and potential role in Th17 polarization. Microbiome 6, 154. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0533-1

Chang, M.M., Leeman, S.E., Niall, H.D., 1971. Amino-acid Sequence of Substance P. Nature New Biology 232, 86–87. https://doi.org/10.1038/newbio232086a0

Chehoud, C., Rafail, S., Tyldsley, A.S., Seykora, J.T., Lambris, J.D., Grice, E.A., 2013. Complement modulates the cutaneous microbiome and inflammatory milieu. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 15061–15066. https://doi.org/10.1073/pnas.1307855110

Chen, C., Brown, D.R., Xie, Y., Green, B.T., Lyte, M., 2003. Catecholamines Modulate Escherichia coli O157:H7 Adherence to Murine Cecal Mucosa. Shock 20, 183. https://doi.org/10.1097/01.shk.0000073867.66587.e0

Chen, Y.E., Fischbach, M.A., Belkaid, Y., 2018. Skin microbiota–host interactions. Nature 553, 427–436. https://doi.org/10.1038/nature25177

Chiba, T., Yamaguchi, A., Yamatani, T., Nakamura, A., Morishita, T., Inui, T., Fukase, M., Noda, T., Fujita, T., 1989. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 256, E331–E335. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.256.2.E331

Choi, J.E., Di Nardo, A., 2018. Skin neurogenic inflammation. Semin Immunopathol 40, 249–259. https://doi.org/10.1007/s00281-018-0675-z

Chowers, M.Y., Keller, N., Tal, R., Barshack, I., Lang, R., Bar-Meir, S., Chowers, Y., 1999. Human gastrin: A Helicobacter pylori–specific growth factor. Gastroenterology 117, 1113–1118. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70396-3

Christensen, G.J.M., Scholz, C.F.P., Enghild, J., Rohde, H., Kilian, M., Thürmer, A., Brzuszkiewicz, E., Lomholt, H.B., Brüggemann, H., 2016. Antagonism between Staphylococcus

epidermidis and Propionibacterium acnes and its genomic basis. BMC Genomics 17, 152. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2489-5

Christopoulos, G., Perry, K.J., Morfis, M., Tilakaratne, N., Gao, Y., Fraser, N.J., Main, M.J., Foord, S.M., Sexton, P.M., 1999. Multiple Amylin Receptors Arise from Receptor Activity-Modifying Protein Interaction with the Calcitonin Receptor Gene Product. Molecular Pharmacology 56, 235–242. https://doi.org/10.1016/S0026-895X(24)08983-1

Chu, D.M., Ma, J., Prince, A.L., Antony, K.M., Seferovic, M.D., Aagaard, K.M., 2017. Maturation of the Infant Microbiome Community Structure and Function Across Multiple Body Sites and in Relation to Mode of Delivery. Nat Med 23, 314–326. https://doi.org/10.1038/nm.4272

Chung, E., Cook, P.W., Parkos, C.A., Park, Y.-K., Pittelkow, M.R., Coffey, R.J., 2005. Amphiregulin Causes Functional Downregulation of Adherens Junctions in Psoriasis. Journal of Investigative Dermatology 124, 1134–1140. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23762.x

Chung, M.-C., Tonry, J.H., Narayanan, A., Manes, N.P., Mackie, R.S., Gutting, B., Mukherjee, D.V., Popova, T.G., Kashanchi, F., Bailey, C.L., Popov, S.G., 2011. Bacillus anthracis Interacts with Plasmin(ogen) to Evade C3b-Dependent Innate Immunity. PLOS ONE 6, e18119. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018119

Clabaut, M., Boukerb, A.M., Mlouka, A.B., Suet, A., Tahrioui, A., Verdon, J., Barreau, M., Maillot, O., Le Tirant, A., Karsybayeva, M., Kremser, C., Redziniak, G., Duclairoir-Poc, C., Pichon, C., Hardouin, J., Cosette, P., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J., 2021a. Variability of the response of human vaginal Lactobacillus crispatus to 17β-estradiol. Sci Rep 11, 11533. https://doi.org/10.1038/s41598-021-91017-5

Clabaut, M., Suet, A., Racine, P.-J., Tahrioui, A., Verdon, J., Barreau, M., Maillot, O., Le Tirant, A., Karsybayeva, M., Kremser, C., Redziniak, G., Duclairoir-Poc, C., Pichon, C., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J., 2021b. Effect of 17β-estradiol on a human vaginal Lactobacillus crispatus strain. Sci Rep 11, 7133. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86628-x

Claesen, J., Spagnolo, J.B., Ramos, S.F., Kurita, K.L., Byrd, A.L., Aksenov, A.A., Melnik, A.V., Wong, W.R., Wang, S., Hernandez, R.D., Donia, M.S., Dorrestein, P.C., Kong, H.H., Segre, J.A., Linington, R.G., Fischbach, M.A., Lemon, K.P., 2020. A Cutibacterium acnes antibiotic modulates human skin microbiota composition in hair follicles. Sci Transl Med 12, eaay5445. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay5445

Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C., Sperandio, V., 2006. The QseC sensor kinase: A bacterial adrenergic receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 10420–10425. https://doi.org/10.1073/pnas.0604343103

Cogan, T.A., Thomas, A.O., Rees, L.E.N., Taylor, A.H., Jepson, M.A., Williams, P.H., Ketley, J., Humphrey, T.J., 2007. Norepinephrine increases the pathogenic potential of Campylobacter jejuni. https://doi.org/10.1136/gut.2006.114926

Conner, A.C., Hay, D.L., Howitt, S.G., Kilk, K., Langel, Ü., Wheatley, M., Smith, D.M., Poyner, D.R., 2002. Interaction of calcitonin-gene-related peptide with its receptors. Biochemical Society Transactions 30, 451–455. https://doi.org/10.1042/bst0300451

Constantinides, M.G., Link, V.M., Tamoutounour, S., Wong, A.C., Perez-Chaparro, P.J., Han, S.-J., Chen, Y.E., Li, K., Farhat, S., Weckel, A., Krishnamurthy, S.R., Vujkovic-Cvijin, I., Linehan, J.L., Bouladoux, N., Merrill, E.D., Roy, S., Cua, D.J., Adams, E.J., Bhandoola, A., Scharschmidt, T.C., Aubé, J., Fischbach, M.A., Belkaid, Y., 2019. MAIT cells are imprinted by the microbiota in early life and promote tissue repair. Science 366, eaax6624. https://doi.org/10.1126/science.aax6624

Cooper, EvaV., 1946. GAS-GANGRENE FOLLOWING INJECTION OF ADRENALINE. The Lancet, Originally published as Volume 1, Issue 6396 247, 459–461. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(46)91431-6

Coronel-León, J., Marqués, A.M., Bastida, J., Manresa, A., 2016. Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. Journal of Applied Microbiology 120, 99–111. https://doi.org/10.1111/jam.12992

Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., Knight, R., 2009. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. Science 326, 1694–1697. https://doi.org/10.1126/science.1177486

Cottrell, G.S., Padilla, B., Pikios, S., Roosterman, D., Steinhoff, M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., 2007. Post-endocytic Sorting of Calcitonin Receptor-like Receptor and Receptor Activity-modifying Protein 1 *. Journal of Biological Chemistry 282, 12260–12271. https://doi.org/10.1074/jbc.M606338200

Coulanges, V., Andre, P., Vidon, D.J.-M., 1998. Effect of Siderophores, Catecholamines, and Catechol Compounds on*Listeria*spp. Growth in Iron-Complexed Medium. Biochemical and Biophysical Research Communications 249, 526–530. https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9184

Cui, T.-B., Chai, H.-Y., Jiang, L.-X., 2012. Isolation and Partial Characterization of an Antifungal Protein Produced by Bacillus licheniformis BS-3. Molecules 17, 7336–7347. https://doi.org/10.3390/molecules17067336

Cutuli, M., Cristiani, S., Lipton, J.M., Catania, A., 2000. Antimicrobial effects of α-MSH peptides. Journal of Leukocyte Biology 67, 233–239. https://doi.org/10.1002/jlb.67.2.233

Dallo, S.F., Kannan, T.R., Blaylock, M.W., Baseman, J.B., 2002. Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in Mycoplasma pneumoniae. Molecular Microbiology 46, 1041–1051. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03207.x

Dallo, S.F., Zhang, B., Denno, J., Hong, S., Tsai, A., Haskins, W., Ye, J.Y., Weitao, T., 2012. Association of Acinetobacter baumannii EF-Tu with Cell Surface, Outer Membrane Vesicles, and Fibronectin. The Scientific World Journal 2012, 128705. https://doi.org/10.1100/2012/128705

Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M., Li, H., 2021. Twelve years of SAMtools and BCFtools. Gigascience 10, giab008. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008

De Clerck, E., De Vos, P., 2002. Study of the Bacterial Load in a Gelatine Production Process Focussed on *Bacillus* and Related Endosporeforming Genera. Systematic and Applied Microbiology 25, 611–617. https://doi.org/10.1078/07232020260517751

De Clerck, Elke., De Vos, Paul., 2004. Genotypic diversity among Bacillus licheniformis strains from various sources. FEMS Microbiology Letters 231, 91–98. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00935-2

Dekio, I., McDowell, A., Sakamoto, M., Tomida, S., 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. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 69, 1087–1092. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003274

Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P., 2003. Production of Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin 1-beta, Interleukin 2, and Interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to Substance P. Neuropeptides 37, 355–361. https://doi.org/10.1016/j.npep.2003.09.005

Deng, P.-Y., Li, Y.-J., 2005. Calcitonin gene-related peptide and hypertension. Peptides 26, 1676–1685. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.02.002

Desriac, F., Clamens, T., Rosay, T., Rodrigues, S., Tahrioui, A., Enault, J., Roquigny, L., Racine, P.-J., Taupin, L., Bazire, A., Dufour, A., Leprince, J., Bouffartigues, E., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., 2018. Different Dose-Dependent Modes of Action of C-Type Natriuretic Peptide on Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation. Pathogens 7, 47. https://doi.org/10.3390/pathogens7020047

Dictionnaire Médical de l'Académie de Médecine - https://www.academie-medecine.fr/dictionnaire/

Di Domizio, J., Belkhodja, C., Chenuet, P., Fries, A., Murray, T., Mondéjar, P.M., Demaria, O., Conrad, C., Homey, B., Werner, S., Speiser, D.E., Ryffel, B., Gilliet, M., 2020. The commensal skin microbiota triggers type I IFN–dependent innate repair responses in injured skin. Nat Immunol 21, 1034–1045. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0721-6

Dimitriu, P.A., Iker, B., Malik, K., Leung, H., Mohn, W.W., Hillebrand, G.G., 2019. New Insights into the Intrinsic and Extrinsic Factors That Shape the Human Skin Microbiome. mBio 10, 10.1128/mbio.00839-19. https://doi.org/10.1128/mbio.00839-19

Ding, W., Stohl, L.L., Wagner, J.A., Granstein, R.D., 2008. Calcitonin Gene-Related Peptide Biases Langerhans Cells toward Th2-Type Immunity1. The Journal of Immunology 181, 6020–6026. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.9.6020

Diuvenji, E.V., Nevolina, E.D., Mart'yanov, S.V., Zhurina, M.A., Kalmantaeva, O.V., Makarova, M.A., Botchkova, E.A., Firstova, V.V., Plakunov, V.K., Gannesen, A.V., 2022. Binary Biofilms of Staphylococcus aureus 209P and Kytococcus schroeteri H01: Dualistic Role of Kytococci and Cell Adhesion Alterations in the Presence of the A-Type Natriuretic Peptide. Microbiology 91, 563–576. https://doi.org/10.1134/S002626172260118X

Diuvenji, E.V., Nevolina, E.D., Solovyev, I.D., Sukhacheva, M.V., Mart'yanov, S.V., Novikova, A.S., Zhurina, M.V., Plakunov, V.K., Gannesen, A.V., 2023. A-Type Natriuretic Peptide Alters the Impact of Azithromycin on Planktonic Culture and on (Monospecies and Binary) Biofilms of Skin Bacteria Kytococcus schroeteri and Staphylococcus aureus. Microorganisms 11, 2965. https://doi.org/10.3390/microorganisms11122965

Dodick, D.W., Goadsby, P.J., Silberstein, S.D., Lipton, R.B., Olesen, J., Ashina, M., Wilks, K., Kudrow, D., Kroll, R., Kohrman, B., Bargar, R., Hirman, J., Smith, J., 2014. Safety and efficacy of ALD403, an antibody to calcitonin gene-related peptide, for the prevention of frequent episodic migraine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, exploratory phase 2 trial. The Lancet Neurology 13, 1100–1107. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70209-1

Doherty, N.C., Tobias, A., Watson, S., Atherton, J.C., 2009. The Effect of the Human Gut-Signalling Hormone, Norepinephrine, on the Growth of the Gastric Pathogen Helicobacter pylori. Helicobacter 14, 223–230. https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2009.00682.x

Dominguez-Bello, M.G., Costello, E.K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R., 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 11971–11975. https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107

Donadio, V., Nolano, M., Provitera, V., Stancanelli, A., Lullo, F., Liguori, R., Santoro, L., 2006. Skin sympathetic adrenergic innervation: An immunofluorescence confocal study. Annals of Neurology 59, 376–381. https://doi.org/10.1002/ana.20769

Dong, J., He, Y., Zhang, X., Wang, L., Sun, T., Zhang, M., Liang, Y., Qi, M., 2010. Calcitonin gene-related peptide regulates the growth of epidermal stem cells *in vitro*. Peptides 31, 1860–1865. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.07.007

Donnerer, J., Schuligoi, R., Stein, C., 1992. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: Evidence for a regulatory function of nerve growth factor *in vivo*. Neuroscience 49, 693–698. https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90237-V

Donnerer, J., Stein, C., 1992. Evidence for an Increase in the Release of CGRP from Sensory Nerves during Inflammation. Annals of the New York Academy of Sciences 657, 505–506. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb22814.x

D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T., 2013. UV Radiation and the Skin. International Journal of Molecular Sciences 14, 12222–12248. https://doi.org/10.3390/ijms140612222

Dowd, S.E., 2007. Escherichia coli O157:H7 gene expression in the presence of catecholamine norepinephrine. FEMS Microbiology Letters 273, 214–223. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00800.x

Drake, W.M., Ajayi, A., Lowe, S.R., Mirtella, A., Bartlett, T.J., Clark, A.J.L., 1999. Desensitization of CGRP and Adrenomedullin Receptors in SK-N-MC Cells: Implications for the RAMP Hypothesis. Endocrinology 140, 533–537. https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6606

Drake, W.M., Lowe, S.R., Mirtella, A., Bartlett, T.J., Clark, A.J., 2000. Desensitisation of calcitonin gene-related peptide responsiveness but not adrenomedullin responsiveness in vascular smooth muscle cells. J Endocrinol 165, 133–138. https://doi.org/10.1677/joe.0.1650133

Dréno, B., Dagnelie, M.A., Khammari, A., Corvec, S., 2020. The Skin Microbiome: A New Actor in Inflammatory Acne. Am J Clin Dermatol 21, 18–24. https://doi.org/10.1007/s40257-020-00531-1

Dreno, B., Dekio, I., Baldwin, H., Demessant, A.L., Dagnelie, M.-A., Khammari, A., Corvec, S., 2024. Acne microbiome: From phyla to phylotypes. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 38, 657–664. https://doi.org/10.1111/jdv.19540

Dreno, B., Martin, R., Moyal, D., Henley, J.B., Khammari, A., Seité, S., 2017. Skin microbiome and acne vulgaris: Staphylococcus, a new actor in acne. Experimental Dermatology 26, 798–803. https://doi.org/10.1111/exd.13296

Durham, P.L., 2016. Diverse Physiological Roles of Calcitonin Gene-Related Peptide in Migraine Pathology: Modulation of Neuronal-Glial-Immune Cells to Promote Peripheral and Central Sensitization. Curr Pain Headache Rep 20, 48. https://doi.org/10.1007/s11916-016-0578-4

Dusane, D.H., Damare, S.R., Nancharaiah, Y.V., Ramaiah, N., Venugopalan, V.P., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S., 2013. Disruption of Microbial Biofilms by an Extracellular Protein Isolated from Epibiotic Tropical Marine Strain of Bacillus licheniformis. PLOS ONE 8, e64501. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064501

Ebner, K., Sartori, S.B., Singewald, N., n.d. Tachykinin Receptors as Therapeutic Targets in Stress-Related Disorders. Current Pharmaceutical Design 15, 1647–1674. https://doi.org/10.2174/138161209788168074

Ebner, K., Singewald, N., 2006. The role of substance P in stress and anxiety responses. Amino Acids 31, 251–272. https://doi.org/10.1007/s00726-006-0335-9

Edvinsson, L., Haanes, K.A., Warfvinge, K., Krause, D.N., 2018. CGRP as the target of new migraine therapies — successful translation from bench to clinic. Nat Rev Neurol 14, 338–350. https://doi.org/10.1038/s41582-018-0003-1

Eedy, D. j., Shaw, C., Johnston, C. f., Buchanan, K. d., 1994. The regional distribution of neuropeptides in human skin as assessed by radioimmunoassay and high-performance liquid chromatography. Clinical and Experimental Dermatology 19, 463–472. https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1994.tb01248.x

Eftekhari, S., Salvatore, C.A., Calamari, A., Kane, S.A., Tajti, J., Edvinsson, L., 2010. Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion. Neuroscience 169, 683–696. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.016

Egea, S.C., Dickerson, I.M., 2012. Direct Interactions between Calcitonin-Like Receptor (CLR) and CGRP-Receptor Component Protein (RCP) Regulate CGRP Receptor Signaling. Endocrinology 153, 1850–1860. https://doi.org/10.1210/en.2011-1459

Egerton, M., Needham, M., Evans, S., Millest, A., Cerillo, G., McPheat, J., Popplewell, M., Johnstone, D., Hollis, M., 1995. Identification of multiple human calcitonin receptor isoforms: heterologous expression and pharmacological characterization. https://doi.org/10.1677/jme.0.0140179

Eijlander, R.T., van Hekezen, R., Bienvenue, A., Girard, V., Hoornstra, E., Johnson, N.B., Meyer, R., Wagendorp, A., Walker, D.C., Wells-Bennik, M.H.J., 2019. Spores in dairy – new insights in detection, enumeration and risk assessment. International Journal of Dairy Technology 72, 303–315. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12586

El Karim, I.A., Linden, G.J., Orr, D.F., Lundy, F.T., 2008. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. Journal of Neuroimmunology 200, 11–16. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.05.014

Elshaghabee, F.M.F., Rokana, N., Gulhane, R.D., Sharma, C., Panwar, H., 2017. Bacillus As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. Front. Microbiol. 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490

Elston, C.A., Elston, D.M., 2014. *Demodex* mites. Clinics in Dermatology, Red Face Revisited: II 32, 739–743. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.02.012

Espinosa-Hernández, V.M., Morales-Pineda, V., Martínez-Herrera, E., 2020. Skin Infections Caused by Emerging Candida Species. Curr Fungal Infect Rep 14, 99–105. https://doi.org/10.1007/s12281-020-00380-9

EUCAST - Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - Recommandations 2023, V.1.0 Juin - https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf

Evangelista, S., 2009. Role of calcitonin gene-related Peptide in gastric mucosal defence and healing. Curr Pharm Des 15, 3571–3576. https://doi.org/10.2174/138161209789207024

Evans, B.N., Rosenblatt, M.I., Mnayer, L.O., Oliver, K.R., Dickerson, I.M., ‖, 2000. CGRP-RCP, a Novel Protein Required for Signal Transduction at Calcitonin Gene-related Peptide and Adrenomedullin Receptors. J. Biol. Chem. 275, 31438–31443. https://doi.org/10.1074/jbc.M005604200

Evans, D.G., Miles, A.A., Niven, J.S.F., 1948. The Enhancement of Bacterial Infections by Adrenaline. Br J Exp Pathol 29, 20–39.

Eyerich, S., Eyerich, K., Traidl-Hoffmann, C., Biedermann, T., 2018. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. Trends in Immunology, Special Tissues: Local Immune Responses 39, 315–327. https://doi.org/10.1016/j.it.2018.02.004

Fernandez-Patron, C., Stewart, K.G., Zhang, Y., Koivunen, E., Radomski, M.W., Davidge, S.T., 2000. Vascular Matrix Metalloproteinase-2–Dependent Cleavage of Calcitonin Gene-Related Peptide Promotes Vasoconstriction. Circulation Research 87, 670–676. https://doi.org/10.1161/01.RES.87.8.670

Fetissov, S.O., Legrand, R., Lucas, N., n.d. Bacterial Protein Mimetic of Peptide Hormone as a New Class of Protein- based Drugs. Current Medicinal Chemistry 26, 546–553. https://doi.org/10.2174/0929867324666171005110620

Feuilloley, M.G.J., Hadjiev, E., Amegnona, L.J., 2024. Interaction of skin-born mediators with the cutaneous microbiota and beyond. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research 37, 100545. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2024.100545

Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., 2025. Endocrine microbiology: A transdisciplinary approach of the human physiology. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research 38, 100570. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2025.100570

Fierer, N., Hamady, M., Lauber, C.L., Knight, R., 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 17994–17999. https://doi.org/10.1073/pnas.0807920105

Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J.A., Schoenfeld, D., Nomicos, E., Park, M., NIH Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program, Kong, H.H., Segre, J.A., 2013. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. Nature 498, 367–370. https://doi.org/10.1038/nature12171

Fisher, L.A., Kikkawa, D.O., Rivier, J.E., Amara, S.G., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G., Vale, W.W., Brown, M.R., 1983. Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin gene-related peptide. Nature 305, 534–536. https://doi.org/10.1038/305534a0

Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B.-H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfe, M.C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R.L., Miller, J.F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G.M., Li,

H., 2013. *Propionibacterium acnes* Strain Populations in the Human Skin Microbiome Associated with Acne. Journal of Investigative Dermatology 133, 2152–2160. https://doi.org/10.1038/jid.2013.21

Flowers, L., Grice, E.A., 2020. The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward. Cell Host Microbe 28, 190–200. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.017

Fluhmann, B., Muff, R., Hunziker, W., Fischer, J.A., Born, W., 1995. A Human Orphan Calcitonin Receptor-like Structure. Biochemical and Biophysical Research Communications 206, 341–347. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1047

Flynn, T.G., de Bold, M.L., de Bold, A.J., 1983. The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties. Biochemical and Biophysical Research Communications 117, 859–865. https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91675-3

Foitzik, K., Krause, K., Conrad, F., Nakamura, M., Funk, W., Paus, R., 2006. Human Scalp Hair Follicles Are Both a Target and a Source of Prolactin, which Serves as an Autocrine and/or Paracrine Promoter of Apoptosis-Driven Hair Follicle Regression. The American Journal of Pathology 168, 748–756. https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050468

Francuzik, W., Franke, K., Schumann, R., Heine, G., Worm, M., 2018. Propionibacterium acnes Abundance Correlates Inversely with Staphylococcus aureus: Data from Atopic Dermatitis Skin Microbiome. Acta Derm Venerol 98, 490–495. https://doi.org/10.2340/00015555-2896

Frank, K.L., Patel, R., 2008. Intravenously administered pharmaceuticals impact biofilm formation and detachment of *Staphylococcus lugdunensis* and other staphylococci. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 60, 9–16. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.008

Freestone, P., 2013. Communication between Bacteria and Their Hosts. Scientifica 2013, 361073. https://doi.org/10.1155/2013/361073

Freestone, P.P., Williams, P.H., Haigh, R.D., Maggs, A.F., Neal, C.P., Lyte, M., 2002. Growth Stimulation of Intestinal Commensal Escherichia coli by Catecholamines: A Possible Contributory Factor in Trauma-Induced Sepsis. Shock 18, 465.

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Lyte, M., 2008. Catecholamine Inotrope Resuscitation of Antibiotic-Damaged Staphylococci and Its Blockade by Specific Receptor Antagonists. The Journal of Infectious Diseases 197, 1044–1052. https://doi.org/10.1086/529202

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Lyte, M., 2007. Specificity of catecholamine-induced growth in Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica and Yersinia enterocolitica. FEMS Microbiology Letters 269, 221–228. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00619.x

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Williams, P.H., Lyte, M., 2003. Involvement of enterobactin in norepinephrine-mediated iron supply from transferrin to enterohaemorrhagic Escherichia coli. FEMS Microbiology Letters 222, 39–43. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00243-X

Freestone, P.P.E., Haigh, R.D., Williams, P.H., Lyte, M., 1999. Stimulation of bacterial growth by heat-stable, norepinephrine-induced autoinducers. FEMS Microbiology Letters 172, 53–60. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13449.x

Freestone, P.P.E., Lyte, M., Neal, C.P., Maggs, A.F., Haigh, R.D., Williams, P.H., 2000. The Mammalian Neuroendocrine Hormone Norepinephrine Supplies Iron for Bacterial Growth in the Presence of Transferrin or Lactoferrin. Journal of Bacteriology 182, 6091–6098. https://doi.org/10.1128/jb.182.21.6091-6098.2000

Gaitanis, G., Tsiouri, G., Spyridonos, P., Stefos, T., Stamatas, G.N., Velegraki, A., Bassukas, I.D., 2019. Variation of cultured skin microbiota in mothers and their infants during the first year postpartum. Pediatric Dermatology 36, 460–465. https://doi.org/10.1111/pde.13829

Gallo, R.L., 2017. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes. Journal of Investigative Dermatology 137, 1213–1214. https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.045

Gallo, R.L., Hooper, L.V., 2012. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. Nat Rev Immunol 12, 503–516. https://doi.org/10.1038/nri3228

Gannesen, A.V., Borrel, V., Lefeuvre, L., Netrusov, A.I., Plakunov, V.K., Feuilloley, M.G.J., 2019. Effect of two cosmetic compounds on the growth, biofilm formation activity, and surface properties of acneic strains of Cutibacterium acnes and Staphylococcus aureus. MicrobiologyOpen 8, e00659. https://doi.org/10.1002/mbo3.659

Gannesen, A. V., Lesouhaitier, O., Netrusov, A.I., Plakunov, V.K., Feuilloley, M.G.J., 2018. Regulation of Formation of Monospecies and Binary Biofilms by Human Skin Microbiota Components, Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus, by Human Natriuretic Peptides. Microbiology 87, 597–609. https://doi.org/10.1134/S0026261718050090

Gannesen, Andrei Vladislavovich, Lesouhaitier, O., Racine, P.-J., Barreau, M., Netrusov, A.I., Plakunov, V.K., Feuilloley, M.G.J., 2018. Regulation of Monospecies and Mixed Biofilms Formation of Skin Staphylococcus aureus and Cutibacterium acnes by Human Natriuretic Peptides. Front Microbiol 9, 2912. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02912

Gannesen, A.V., Ziganshin, R.H., Ovcharova, M.A., Nevolina, E.D., Klimko, A.I., Martyanov, S.V., Plakunov, V.K., 2023. Epinephrine Affects Ribosomes, Cell Division, and Catabolic Processes in Micrococcus luteus Skin Strain C01: Revelation of the Conditionally Extensive Hormone Effect Using Orbitrap Mass Spectrometry and Proteomic Analysis. Microorganisms 11, 2181. https://doi.org/10.3390/microorganisms11092181

Gannesen, A.V., Ziganshin, R.H., Zdorovenko, E.L., Klimko, A.I., Ianutsevich, E.A., Danilova, O.A., Tereshina, V.M., Gorbachevskii, M.V., Ovcharova, M.A., Nevolina, E.D., Martyanov, S.V., Shashkov, A.S., Dmitrenok, A.S., Novikov, A.A., Zhurina, M.V., Botchkova, E.A., Toukach, P.V., Plakunov, V.K., 2022. Epinephrine extensively changes the biofilm matrix composition in Micrococcus luteus C01 isolated from human skin. Front Microbiol 13, 1003942. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1003942

Gao, X., Zhang, D., Xu, C., Li, H., Caron, K.M., Frenette, P.S., 2021. Nociceptive nerves regulate haematopoietic stem cell mobilization. Nature 589, 591–596. https://doi.org/10.1038/s41586-020-03057-y

Garcia-Recio, S., Gascón, P., 2015. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. BioMed Research International 2015, 495704. https://doi.org/10.1155/2015/495704

Gáspár, E., Nguyen-Thi, K.T., Hardenbicker, C., Tiede, S., Plate, C., Bodó, E., Knuever, J., Funk, W., Bíró, T., Paus, R., 2011. Thyrotropin-Releasing Hormone Selectively Stimulates Human Hair Follicle Pigmentation. Journal of Investigative Dermatology 131, 2368–2377. https://doi.org/10.1038/jid.2011.221

Geoghegan, J.A., Irvine, A.D., Foster, T.J., 2018. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. Trends in Microbiology 26, 484–497. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.008

Gherardini, G., Curinga, G., Colella, G., Freda, N., Rauso, R., 2009. Calcitonin Gene–Related Peptide and Thermal Injury: Review of Literature. Eplasty 9, e30.

Gibbins, I.L., Wattchow, D., Coventry, B., 1987. Two immunohistochemically identified populations of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive axons in human skin. Brain Research 414, 143–148. https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91335-7

Gibson, S.J., Polak, J.M., Bloom, S.R., Sabate, I.M., Mulderry, P.M., Ghatei, M.A., McGregor, G.P., Morrison, J.F., Kelly, J.S., Evans, R.M., 1984. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. J. Neurosci. 4, 3101–3111. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-12-03101.1984

Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., Juarranz, Á., 2016. Chapter 1 - Anatomy and Function of the Skin, in: Hamblin, M.R., Avci, P., Prow, T.W. (Eds.), Nanoscience in Dermatology. Academic Press, Boston, pp. 1–14. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X

Gingell, J.J., Simms, J., Barwell, J., Poyner, D.R., Watkins, H.A., Pioszak, A.A., Sexton, P.M., Hay, D.L., 2016. An allosteric role for receptor activity-modifying proteins in defining GPCR pharmacology. Cell Discov 2, 16020. https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.20

Glatz, M., Buchner, M., von Bartenwerffer, W., Schmid-Grendelmeier, P., Worm, M., Hedderich, J., Fölster-Holst, R., 2015. Malassezia spp.-specific immunoglobulin E level is a marker for severity of atopic dermatitis in adults. Acta Dermato-Venereologica 95, 191–196. https://doi.org/10.2340/00015555-1864

Goadsby, P.J., Edvinsson, L., Ekman, R., 1990. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. Annals of Neurology 28, 183–187. https://doi.org/10.1002/ana.410280213

Goetze, J.P., Bruneau, B.G., Ramos, H.R., Ogawa, T., de Bold, M.K., de Bold, A.J., 2020. Cardiac natriuretic peptides. Nat Rev Cardiol 17, 698–717. https://doi.org/10.1038/s41569-020-0381-0

Graham, G.M., Farrar, M.D., Cruse-Sawyer, J.E., Holland, K.T., Ingham, E., 2004. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with Propionibacterium acnes and P. acnes GroEL. British Journal of Dermatology 150, 421–428. https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2004.05762.x

Granstein, R.D., Wagner, J.A., Stohl, L.L., Ding, W., 2015. Calcitonin gene-related peptide: key regulator of cutaneous immunity. Acta Physiologica 213, 586–594. https://doi.org/10.1111/apha.12442

Grant, G.J., Kohli, I., Mohammad, T.F., 2024. A narrative review of the impact of ultraviolet radiation and sunscreen on the skin microbiome. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine 40, e12943. https://doi.org/10.1111/phpp.12943

Green, B.T., Lyte, M., Chen, C., Xie, Y., Casey, M.A., Kulkarni-Narla, A., Vulchanova, L., Brown, D.R., 2004. Adrenergic modulation of Escherichia coli O157:H7 adherence to the colonic mucosa. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 287, G1238–G1246. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00471.2003

Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., Green, E.D., Turner, M.L., Segre, J.A., 2009. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. Science 324, 1190–1192. https://doi.org/10.1126/science.1171700

Grice, E.A., Kong, H.H., Renaud, G., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Wolfsberg, T.G., Turner, M.L., Segre, J.A., 2008. A diversity profile of the human skin microbiota. Genome Res 18, 1043–1050. https://doi.org/10.1101/gr.075549.107

Grice, E.A., Segre, J.A., 2011. The skin microbiome. Nat Rev Microbiol 9, 244–253. https://doi.org/10.1038/nrmicro2537

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G., 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29, 1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., 2008. Wound repair and regeneration. Nature 453, 314–321. https://doi.org/10.1038/nature07039

Hadjiev, E.B.D., Boukerb, A.M., Ismail, R., Barreau, M., Hajem, N., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J. Identification of a scalp associated *Bacillus licheniformis* strain with unexpected Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sensitivity. Research in Microbiology (in preparation).

Hagner, S., Haberberger, R.V., Overkamp, D., Hoffmann, R., Voigt, K.H., McGregor, G.P., 2002. Expression and distribution of calcitonin receptor-like receptor in human hairy skin. Peptides 23, 109–116. https://doi.org/10.1016/s0196-9781(01)00586-1

Hanko, J., Hardebo, J.E., Kåhrström, J., Owman, C., Sundler, F., 1985. Calcitonin gene-related peptide is present in mammalian cerebrovascular nerve fibres and dilates pial and

peripheral arteries. Neuroscience Letters 57, 91–95. https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90045-X

Hannigan, G.D., Meisel, J.S., Tyldsley, A.S., Zheng, Q., Hodkinson, B.P., SanMiguel, A.J., Minot, S., Bushman, F.D., Grice, E.A., 2015. The Human Skin Double-Stranded DNA Virome: Topographical and Temporal Diversity, Genetic Enrichment, and Dynamic Associations with the Host Microbiome. mBio 6, e01578-15. https://doi.org/10.1128/mBio.01578-15

Hansen, C.J., Burnell, K.K., Brogden, K.A., 2006. Antimicrobial activity of Substance P and Neuropeptide Y against laboratory strains of bacteria and oral microorganisms. Journal of Neuroimmunology 177, 215–218. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.05.011

Hara, M., Toyoda, M., Yaar, M., Bhawan, J., Avila, E.M., Penner, I.R., Gilchrest, B.A., 1996. Innervation of melanocytes in human skin. Journal of Experimental Medicine 184, 1385–1395. https://doi.org/10.1084/jem.184.4.1385

Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J.-M., Schwarz, T., Gläser, R., 2010. Enhanced Expression and Secretion of Antimicrobial Peptides in Atopic Dermatitis and after Superficial Skin Injury. Journal of Investigative Dermatology 130, 1355–1364. https://doi.org/10.1038/jid.2009.432

Harker, M., Carvell, A.-M., Marti, V.P.J., Riazanskaia, S., Kelso, H., Taylor, D., Grimshaw, S., Arnold, D.S., Zillmer, R., Shaw, J., Kirk, J.M., Alcasid, Z.M., Gonzales-Tanon, S., Chan, G.P., Rosing, E.A.E., Smith, A.M., 2014. Functional characterisation of a SNP in the *ABCC11* allele—Effects on axillary skin metabolism, odour generation and associated behaviours. Journal of Dermatological Science 73, 23–30. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.08.016

Harrison, S., Geppetti, P., 2001. Substance P. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 33, 555–576. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00031-0

Harris-Tryon, T.A., Grice, E.A., 2022. Microbiota and maintenance of skin barrier function. Science 376, 940–945. https://doi.org/10.1126/science.abo0693

Hay, D.L., Walker, C.S., 2017. CGRP and its receptors. Headache: The Journal of Head and Face Pain 57, 625–636. https://doi.org/10.1111/head.13064

Haydushka, I.A., Markova, N., Kirina, V., Atanassova, M., 2012. Recurrent Sepsis Due To Bacillus Licheniformis. Journal of Global Infectious Diseases 4, 82. https://doi.org/10.4103/0974-777X.93768

He, L., Chen, W., Liu, Y., 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like pepitdes by *Bacillus licheniformis* ZJU12. Microbiological Research 161, 321–326. https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.12.002

Hendrikse, E.R., Bower, R.L., Hay, D.L., Walker, C.S., 2019. Molecular studies of CGRP and the CGRP family of peptides in the central nervous system. Cephalalgia 39, 403–419. https://doi.org/10.1177/0333102418765787

Henry, J.L., 1976. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. Brain Research 114, 439–451. https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90965-3

Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S., 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. Microbiology 146, 2395–2407. https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2395

Higgins, D., Dworkin, J., 2012. Recent progress in Bacillus subtilis sporulation. FEMS Microbiology Reviews 36, 131–148. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x

Hilairet, S., Bélanger, C., Bertrand, J., Laperrière, A., Foord, S.M., Bouvier, M., 2001. Agonist-promoted Internalization of a Ternary Complex between Calcitonin Receptor-like Receptor, Receptor Activity-modifying Protein 1 (RAMP1), and β-Arrestin *. Journal of Biological Chemistry 276, 42182–42190. https://doi.org/10.1074/jbc.M107323200

Hiller, C.C., Lucca, V., Carvalho, D., Borsoi, A., Borges, K.A., Furian, T.Q., do Nascimento, V.P., 2019. Influence of catecholamines on biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis. Microbial Pathogenesis 130, 54–58. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.032

Hillion, M., Mijouin, L., Diaye, A.N., Percoco, G., Enault, J., Follet-Gueye, M.-L., Yvergnaux, F., Lefeuvre, L., Feuilloley, M.G.J., 2014. Pseudomonas fluorescens, a forgotten member of the human cutaneous microflora sensible to skin communication and defense peptides.

Hillion, M., Mijouin, L., Jaouen, T., Barreau, M., Meunier, P., Lefeuvre, L., Lati, E., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J., 2013. Comparative study of normal and sensitive skin aerobic bacterial populations. MicrobiologyOpen 2, 953–961. https://doi.org/10.1002/mbo3.138

Hiragun, T., Ishii, K., Hiragun, M., Suzuki, H., Kan, T., Mihara, S., Yanase, Y., Bartels, J., Schröder, J.-M., Hide, M., 2013. Fungal protein MGL_1304 in sweat is an allergen for atopic dermatitis patients. Journal of Allergy and Clinical Immunology 132, 608-615.e4. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.03.047

Hirschhausen, N., Schlesier, T., Schmidt, M.A., Götz, F., Peters, G., Heilmann, C., 2010. A novel staphylococcal internalization mechanism involves the major autolysin Atl and heat shock cognate protein Hsc70 as host cell receptor: Atl-mediated staphylococcal internalization. Cellular Microbiology 12, 1746–1764. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01506.x

Ho, T.W., Edvinsson, L., Goadsby, P.J., 2010. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. Nat Rev Neurol 6, 573–582. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.127

Ho, T.W., Ferrari, M.D., Dodick, D.W., Galet, V., Kost, J., Fan, X., Leibensperger, H., Froman, S., Assaid, C., Lines, C., Koppen, H., Winner, P.K., 2008. Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. The Lancet 372, 2115–2123. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61626-8

Holub, B.S., Rauch, I., Radner, S., Sperl, W., Hell, M., Kofler, B., 2011. Effects of galanin message-associated peptide and neuropeptide Y against various non-*albicans Candida* strains. International Journal of Antimicrobial Agents 38, 76–80. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.019

Hommez, J., Wullepit, J., Devriese, L., 1997. *Bacillus licheniformis* associated with abortions in cows. 131-132.

Hosoi, J., Murphy, G.F., Egan, C.L., Lerner, E.A., Grabbe, S., Asahina, A., Granstein, R.D., 1993. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. Nature 363, 159–163. https://doi.org/10.1038/363159a0

Hou, Q., Barr, T., Gee, L., Vickers, J., Wymer, J., Borsani, E., Rodella, L., Getsios, S., Burdo, T., Eisenberg, E., Guha, U., Lavker, R., Kessler, J., Chittur, S., Fiorino, D., Rice, F., Albrecht, P., 2011. Keratinocyte expression of calcitonin gene-related peptide β: Implications for neuropathic and inflammatory pain mechanisms. PAIN 152, 2036–2051. https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.04.033

Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., Yi, H., 2020. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. Front. Microbiol. 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779

Huang, J., Stohl, L.L., Zhou, X., Ding, W., Granstein, R.D., 2011. Calcitonin gene-related peptide inhibits chemokine production by human dermal microvascular endothelial cells. Brain, Behavior, and Immunity 25, 787–799. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.007

Huang, Q., Kahn, C.R., Altindis, E., 2019. Viral Hormones: Expanding Dimensions in Endocrinology. Endocrinology 160, 2165–2179. https://doi.org/10.1210/en.2019-00271

Hulcr, J., Latimer, A.M., Henley, J.B., Rountree, N.R., Fierer, N., Lucky, A., Lowman, M.D., Dunn, R.R., 2012. A Jungle in There: Bacteria in Belly Buttons are Highly Diverse, but Predictable. PLOS ONE 7, e47712. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047712

Ito, N., Ito, T., Kromminga, A., Bettermann, A., Takigawa, M., Kees, F., Straub, R.H., Paus, R., 2005. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-

adrenal (HPA) axis and synthesize cortisol. The FASEB Journal 19, 1332–1334. https://doi.org/10.1096/fj.04-1968fje

Ito, T., Ito, N., Bettermann, A., Tokura, Y., Takigawa, M., Paus, R., 2004. Collapse and Restoration of MHC Class-I-Dependent Immune Privilege. Am J Pathol 164, 623–634.

Iurlina, M.O., Saiz, A.I., Fuselli, S.R., Fritz, R., 2006. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. LWT - Food Science and Technology 39, 105–110. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.01.006

Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe, Y., 2010. Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization. Nature 465, 346–349. https://doi.org/10.1038/nature09074

Iyengar, S., Ossipov, M.H., Johnson, K.W., 2017. The role of calcitonin gene–related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. Pain 158, 543–559. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000831

Jacob, S., VanDaele, M.A., Brown, J.N., 2019. Treatment of Demodex-associated inflammatory skin conditions: A systematic review. Dermatologic Therapy 32, e13103. https://doi.org/10.1111/dth.13103

Jain, C., Rodriguez-R, L.M., Phillippy, A.M., Konstantinidis, K.T., Aluru, S., 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nat Commun 9, 5114. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9

Jamil, M., Zeb, S., Anees, M., Roohi, A., Ahmed, I., ur Rehman, S., Rha, E. shik, 2014. Role of Bacillus licheniformis in Phytoremediation of Nickel Contaminated Soil Cultivated with Rice. International Journal of Phytoremediation 16, 554–571. https://doi.org/10.1080/15226514.2013.798621

Janvier, X., Alexandre, S., Boukerb, A.M., Souak, D., Maillot, O., Barreau, M., Gouriou, F., Grillon, C., Feuilloley, M.G.J., Groboillot, A., 2020. Deleterious Effects of an Air Pollutant (NO2) on a Selection of Commensal Skin Bacterial Strains, Potential Contributor to Dysbiosis? Front. Microbiol. 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.591839

Jensen, M.G., Svraka, L., Baez, E., Lund, M., Poehlein, A., Brüggemann, H., 2023. Species- and strain-level diversity of Corynebacteria isolated from human facial skin. BMC Microbiol 23, 366. https://doi.org/10.1186/s12866-023-03129-9

Ji, X., Jiang, M., Zhang, J., Jiang, X., Zheng, Z., 2018. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. Bioresource Technology 247, 44–50. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.074

Ji, Z.-L., Peng, S., Chen, L.-L., Liu, Y., Yan, C., Zhu, F., 2020. Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent. International Journal of Biological Macromolecules 145, 594–603. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.216

Jia, J., Fu, M., Ji, W., Xiong, N., Chen, P., Lin, J., Yang, Q., 2024. Surfactin from Bacillus subtilis enhances immune response and contributes to the maintenance of intestinal microbial homeostasis. Microbiology Spectrum 12, e00918-24. https://doi.org/10.1128/spectrum.00918-24

Joos, G.F., De Swert, K., 2006. Kinins and Neuropeptides: Tachykinins, in: Janes, S.M. (Ed.), Encyclopedia of Respiratory Medicine (Second Edition). Academic Press, Oxford, pp. 702–709. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102723-3.10639-0

Joshi, A.A., Vocanson, M., Nicolas, J.-F., Wolf, P., Patra, V., 2023. Microbial derived antimicrobial peptides as potential therapeutics in atopic dermatitis. Front Immunol 14, 1125635. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125635

Jović, A., Marinović, B., Kostović, K., Čeović, R., Basta-Juzbašić, A., Bukvić Mokos, Z., 2017. The impact of psychological stress on acne. Acta Dermatovenerologica Croatica 25, 133–133.

Jugé, R., Rouaud-Tinguely, P., Breugnot, J., Servaes, K., Grimaldi, C., Roth, M. -P., Coppin, H., Closs, B., 2018. Shift in skin microbiota of Western European women across aging. Journal of Applied Microbiology 125, 907–916. https://doi.org/10.1111/jam.13929

Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F., Egawa, G., 2019. The immunological anatomy of the skin. Nat Rev Immunol 19, 19–30. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0084-5

Karavolos, M., Spencer, H., Bulmer, D., Thompson, A., Winzer, K., Williams, P., Hinton, J., Khan, C.A., 2008. Adrenaline modulates the global transcriptional profile of Salmonella revealing a role in the antimicrobial peptide and oxidative stress resistance responses. BMC Genomics 9, 458. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-458

Karavolos, M.H., Bulmer, D.M., Spencer, H., Rampioni, G., Schmalen, I., Baker, S., Pickard, D., Gray, J., Fookes, M., Winzer, K., Ivens, A., Dougan, G., Williams, P., Khan, C.M.A., 2011. Salmonella Typhi sense host neuroendocrine stress hormones and release the toxin haemolysin E. EMBO reports 12, 252–258. https://doi.org/10.1038/embor.2011.4

Kashem, S.W., Kaplan, D.H., 2016. Skin Immunity to Candida albicans. Trends in Immunology 37, 440–450. https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.007

Kawasaki, H., Takasaki, K., Saito, A., Goto, K., 1988. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. Nature 335, 164–167. https://doi.org/10.1038/335164a0

Kee, Z., Kodji, X., Brain, S.D., 2018. The Role of Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in Neurogenic Vasodilation and Its Cardioprotective Effects. Front. Physiol. 9. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01249

Kendall, M.M., Rasko, D.A., Sperandio, V., 2007. Global Effects of the Cell-to-Cell Signaling Molecules Autoinducer-2, Autoinducer-3, and Epinephrine in a luxS Mutant of Enterohemorrhagic Escherichia coli. Infection and Immunity 75, 4875–4884. https://doi.org/10.1128/iai.00550-07

Kilian, M., Scholz, C.F.P., Lomholt, H.B., 2012. Multilocus Sequence Typing and Phylogenetic Analysis of Propionibacterium acnes. Journal of Clinical Microbiology 50, 1158–1165. https://doi.org/10.1128/jcm.r06129-11

Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C., Salzberg, S.L., 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat Biotechnol 37, 907–915. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4

Kim, Y.J., Granstein, R.D., 2021. Roles of calcitonin gene-related peptide in the skin, and other physiological and pathophysiological functions. Brain Behav Immun Health 18, 100361. https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100361

King, C.T., Gegg, C.V., Hu, S.N.-Y., Lu, H.S., Chan, B.M., Berry, K.A., Brankow, D.W., Boone, T.J., Kezunovic, N., Kelley, M.R., Shi, L., Xu, C., 2019. Discovery of the Migraine Prevention Therapeutic Aimovig (Erenumab), the First FDA-Approved Antibody against a G-Protein-Coupled Receptor. ACS Pharmacology & Translational Science. https://doi.org/10.1021/acsptsci.9b00061

Knuever, J., Poeggeler, B., Gáspár, E., Klinger, M., Hellwig-Burgel, T., Hardenbicker, C., Tóth, B.I., Bíró, T., Paus, R., 2012. Thyrotropin-Releasing Hormone Controls Mitochondrial Biology in Human Epidermis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 97, 978–986. https://doi.org/10.1210/jc.2011-1096

Koh, L.F., Ong, R.Y., Common, J.E., 2022. Skin microbiome of atopic dermatitis. Allergol Int 71, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.alit.2021.11.001

Kong, H.H., Oh, J., Deming, C., Conlan, S., Grice, E.A., Beatson, M.A., Nomicos, E., Polley, E.C., Komarow, H.D., Murray, P.R., Turner, M.L., Segre, J.A., 2012. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. Genome Res 22, 850–859. https://doi.org/10.1101/gr.131029.111

Konz, D., Doekel, S., Marahiel, M.A., 1999. Molecular and Biochemical Characterization of the Protein Template Controlling Biosynthesis of the Lipopeptide Lichenysin. Journal of Bacteriology 181, 133–140. https://doi.org/10.1128/jb.181.1.133-140.1999

Koskinen, K., Pausan, M.R., Perras, A.K., Beck, M., Bang, C., Mora, M., Schilhabel, A., Schmitz, R., Moissl-Eichinger, C., 2017. First Insights into the Diverse Human Archaeome: Specific Detection of Archaea in the Gastrointestinal Tract, Lung, and Nose and on Skin. mBio 8, 10.1128/mbio.00824-17. https://doi.org/10.1128/mbio.00824-17

Köten, B., Simanski, M., Gläser, R., Podschun, R., Schröder, J.-M., Harder, J., 2009. RNase 7 contributes to the cutaneous defense against Enterococcus faecium. PLoS One 4, e6424. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006424

Kowalska, K., Carr, D.B., Lipkowski, A.W., 2002. Direct antimicrobial properties of substance P. Life Sciences 71, 747–750. https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01740-X

Kraenzlin, M.E., Ch'ng, J.L.C., Mulderry, P.K., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1985. Infusion of a novel peptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) in man. Pharmacokinetics and effects on gastric acid secretion and on gastrointestinal hormones. Regulatory Peptides 10, 189–197. https://doi.org/10.1016/0167-0115(85)90013-8

Krause, A., Liepke, C., Meyer, M., Adermann, K., Forssmann, W.G., Maronde, E., 2001. Human natriuretic peptides exhibit antimicrobial activity. Eur J Med Res 6, 215–218.

Kuhn, M., 2004. Molecular physiology of natriureticpeptide signalling. Basic Res Cardiol 99, 76–82. https://doi.org/10.1007/s00395-004-0460-0

Lai, N.Y., Musser, M.A., Pinho-Ribeiro, F.A., Baral, P., Jacobson, A., Ma, P., Potts, D.E., Chen, Z., Paik, D., Soualhi, S., Yan, Y., Misra, A., Goldstein, K., Lagomarsino, V.N., Nordstrom, A., Sivanathan, K.N., Wallrapp, A., Kuchroo, V.K., Nowarski, R., Starnbach, M.N., Shi, H., Surana, N.K., An, D., Wu, C., Huh, J.R., Rao, M., Chiu, I.M., 2020. Gut-Innervating Nociceptor Neurons Regulate Peyer's Patch Microfold Cells and SFB Levels to Mediate *Salmonella* Host Defense. Cell 180, 33-49.e22. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.014

Lai, X., Wang, Z., Wei, L., Wang, L., 2002. Effect of substance P released from peripheral nerve ending on endogenous expression of epidermal growth factor and its receptor in wound healing. Chin J Traumatol 5, 176–179.

Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A.L., Wu, Z.-R., Hooper, L.V., Schmidt, R.R., von Aulock, S., Radek, K.A., Huang, C.-M., Ryan, A.F., Gallo, R.L., 2009. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3–dependent inflammation after skin injury. Nat Med 15, 1377–1382. https://doi.org/10.1038/nm.2062

Lai, Y., Gallo, R.L., n.d. Toll-Like Receptors in Skin Infections and Inflammatory Diseases. Infectious Disorders - Drug Targets 8, 144–155. https://doi.org/10.2174/1871526510808030144

Lai-Cheong, J.E., McGrath, J.A., 2021. Structure and function of skin, hair and nails. Medicine 49, 337–342. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.03.001

Lalloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J., Gardiner, N., 2007. Isolation and selection of Bacillus spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. Journal of Applied Microbiology 103, 1471–1479. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03360.x

Langan, E.A., Ramot, Y., Hanning, A., Poeggeler, B., Bíró, T., Gaspar, E., Funk, W., Griffiths, C.E.M., Paus, R., 2010. Thyrotropin-releasing hormone and oestrogen differentially regulate prolactin and prolactin receptor expression in female human skin and hair follicles in vitro. British Journal of Dermatology 162, 1127–1131. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09676.x

Langan, E.A., Vidali, S., Pigat, N., Funk, W., Lisztes, E., Bíró, T., Goffin, V., Griffiths, C.E.M., Paus, R., 2013. Tumour Necrosis Factor Alpha, Interferon Gamma and Substance P Are Novel

Modulators of Extrapituitary Prolactin Expression in Human Skin. PLOS ONE 8, e60819. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060819
Laux, C., Peschel, A., Krismer, B., 2019. Staphylococcus aureus Colonization of the Human Nose and Interaction with Other Microbiome Members. Microbiol Spectr 7. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0029-2018
Lawson, S.N., 2002. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Adelta- or Aalpha/beta-fibres. Exp Physiol 87, 239–244. https://doi.org/10.1113/eph8702350
Lee, N.-K., Kim, W.-S., Paik, H.-D., 2019. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. Food Science and Biotechnology 28, 1297. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9
Lee, Y.B., Byun, E.J., Kim, H.S., 2019. Potential Role of the Microbiome in Acne: A Comprehensive Review. J Clin Med 8, 987. https://doi.org/10.3390/jcm8070987
Legoux, F., Bellet, D., Daviaud, C., El Morr, Y., Darbois, A., Niort, K., Procopio, E., Salou, M., Gilet, J., Ryffel, B., Balvay, A., Foussier, A., Sarkis, M., El Marjou, A., Schmidt, F., Rabot, S., Lantz, O., 2019. Microbial metabolites control the thymic development of mucosal-associated invariant T cells. Science 366, 494–499. https://doi.org/10.1126/science.aaw2719
Lei, Y., Rahman, K., Cao, X., Yang, B., Zhou, W., Reheman, A., Cai, L., Wang, Y., Tyagi, R., Wang, Z., Chen, X., Cao, G., 2023. Epinephrine Stimulates Mycobacterium tuberculosis Growth and Biofilm Formation. International Journal of Molecular Sciences 24, 17370. https://doi.org/10.3390/ijms242417370
Lembeck, F., 1953. Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. Naunyn - Schmiedebergs Arch 219, 197–213. https://doi.org/10.1007/BF00246293
LEROITH, D., J, S., J, R., MA, L., 1981. INSULIN OR A CLOSELY RELATED MOLECULE IS NATIVE TO ESCHERICHIA COLI. INSULIN OR A CLOSELY RELATED MOLECULE IS NATIVE TO ESCHERICHIA COLI.
Lesouhaitier, O., Clamens, T., Rosay, T., Desriac, F., Louis, M., Rodrigues, S., Gannesen, A., Plakunov, V.K., Bouffartigues, E., Tahrioui, A., Bazire, A., Dufour, A., Cornelis, P., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J., 2019. Host Peptidic Hormones Affecting Bacterial Biofilm Formation and Virulence. J Innate Immun 11, 227–241. https://doi.org/10.1159/000493926
Lesouhaitier, O., Veron, W., Chapalain, A., Madi, A., Blier, A.-S., Dagorn, A., Connil, N., Chevalier, S., Orange, N., Feuilloley, M., 2009. Gram-Negative Bacterial Sensors for Eukaryotic Signal Molecules. Sensors 9, 6967–6990. https://doi.org/10.3390/s90906967
Leung, M.H.Y., Tong, X., Wilkins, D., Cheung, H.H.L., Lee, P.K.H., 2018. Individual and household attributes influence the dynamics of the personal skin microbiota and its association network. Microbiome 6, 1–15. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0412-9
Levy, M., Kolodziejczyk, A.A., Thaiss, C.A., Elinav, E., 2017. Dysbiosis and the immune system. Nat Rev Immunol 17, 219–232. https://doi.org/10.1038/nri.2017.7
LEYDEN, J.J., MARPLES, R.R., KLIGMAN, A.M., 1974. Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. British Journal of Dermatology 90, 525. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1974.tb06447.x
Leyden, J.J., McGinley, K.J., Mills, O.H., Kligman, A.M., 1975. Propionibacterium Levels In Patients With And Without Acne Vulgaris. Journal of Investigative Dermatology 65, 382–384. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12607634
Li, H., Goh, B.N., Teh, W.K., Jiang, Z., Goh, J.P.Z., Goh, A., Wu, G., Hoon, S.S., Raida, M., Camattari, A., Yang, L., O'Donoghue, A.J., Dawson, T.L., 2018. Skin Commensal *Malassezia globosa* Secreted Protease Attenuates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. Journal of Investigative Dermatology 138, 1137–1145. https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.11.034
Li, M., Budding, A.E., van der Lugt-Degen, M., Du-Thumm, L., Vandeven, M., Fan, A., 2019. The influence of age, gender and race/ethnicity on the composition of the human axillary

microbiome. International Journal of Cosmetic Science 41, 371–377. https://doi.org/10.1111/ics.12549

Liang, Q., Zhang, X., Lee, K.H., Wang, Y., Yu, K., Shen, W., Fu, L., Shu, M., Li, W., 2015. Nitrogen removal and water microbiota in grass carp culture following supplementation with Bacillus licheniformis BSK-4. World J Microbiol Biotechnol 31, 1711–1718. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1921-3

Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Xu, Y., Tao, N., Peng, F., Wong, M., 2013. Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*. Chemosphere 92, 1383–1389. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.014

Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. Bioinformatics 30, 923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656

Liaqat, I., Ali, S., Butt, A., Durrani, A.I., Zafar, U., Saleem, S., Naseem, S., Ahsan, F., 2022. Purification and Characterization of Keratinase from Bacillus licheniformis dcs1 for Poultry Waste Processing. Journal of Oleo Science 71, 693–700. https://doi.org/10.5650/jos.ess21426

Lighvani, S., Huang, X., Trivedi, P.P., Swanborg, R.H., Hazlett, L.D., 2005. Substance P regulates natural killer cell interferon-γ production and resistance to Pseudomonas aeruginosa infection. European Journal of Immunology 35, 1567–1575. https://doi.org/10.1002/eji.200425902

Linscheid, P., Seboek, D., Schaer, D.J., Zulewski, H., Keller, U., Müller, B., 2004. Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes*. Critical Care Medicine 32, 1715. https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000134404.63292.71

Logan, N.A., 2012. Bacillus and relatives in foodborne illness. Journal of Applied Microbiology 112, 417–429. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x

Lomholt, H.B., Kilian, M., 2010. Population Genetic Analysis of Propionibacterium acnes Identifies a Subpopulation and Epidemic Clones Associated with Acne. PLOS ONE 5, e12277. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012277

Lopes, J.G., Sourjik, V., 2018. Chemotaxis of Escherichia coli to major hormones and polyamines present in human gut. The ISME Journal 12, 2736–2747. https://doi.org/10.1038/s41396-018-0227-5

Louis, M., Clamens, T., Tahrioui, A., Desriac, F., Rodrigues, S., Rosay, T., Harmer, N., Diaz, S., Barreau, M., Racine, P.-J., Kipnis, E., Grandjean, T., Vieillard, J., Bouffartigues, E., Cornelis, P., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., 2022. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Dispersion by the Human Atrial Natriuretic Peptide. Advanced Science 9, 2103262. https://doi.org/10.1002/advs.202103262

Lousada, M.B., Lachnit, T., Edelkamp, J., Rouillé, T., Ajdic, D., Uchida, Y., Di Nardo, A., Bosch, T.C.G., Paus, R., 2021. Exploring the human hair follicle microbiome*. British Journal of Dermatology 184, 802–815. https://doi.org/10.1111/bjd.19461

Lovászi, M., Mattii, M., Eyerich, K., Gácsi, A., Csányi, E., Kovács, D., Rühl, R., Szegedi, A., Kemény, L., Ståhle, M., Zouboulis, C.C., Eyerich, S., Törőcsik, D., 2017. Sebum lipids influence macrophage polarization and activation. British Journal of Dermatology 177, 1671–1682. https://doi.org/10.1111/bjd.15754

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology 15, 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Luebke, A.E., Dahl, G.P., Roos, B.A., Dickerson, I.M., 1996. Identification of a protein that confers calcitonin gene-related peptide responsiveness to oocytes by using a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator assay. Proceedings of the National Academy of Sciences 93, 3455–3460. https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3455

Luna, P.C., 2020. Skin Microbiome as Years Go By. Am J Clin Dermatol 21, 12–17. https://doi.org/10.1007/s40257-020-00549-5

Luqman, A., 2023. The orchestra of human bacteriome by hormones. Microbial Pathogenesis 180, 106125. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106125

Lyte, M., 2004. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. Trends in Microbiology 12, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.11.004

Lyte, M., Arulanandam, B.P., Frank, C.D., 1996a. Production of Shiga-like toxins by *Escherichia coli* O157:H7 can be influenced by the neuroendocrine hormone norepinephrine. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 128, 392–398. https://doi.org/10.1016/S0022-2143(96)80011-4

Lyte, M., Erickson, A.K., Arulanandam, B.P., Frank, C.D., Crawford, M.A., Francis, D.H., 1997. Norepinephrine-Induced Expression of the K99 Pilus Adhesin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications 232, 682–686. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6356

Lyte, M., Ernst, S., 1993. Alpha and Beta Adrenergic Receptor Involvement in Catecholamine-Induced Growth of Gram-Negative Bacteria. Biochemical and Biophysical Research Communications 190, 447–452. https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1068

Lyte, M., Ernst, S., 1992. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. Life Sciences 50, 203–212. https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90273-R

Lyte, M., Frank, C.D., Green, B.T., 1996b. Production of an autoinducer of growth by norepinephrine cultured Escherichia coli O157:H7. FEMS Microbiology Letters 139, 155–159. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08196.x

Lyte, M., Freestone, P.P., Neal, C.P., Olson, B.A., Haigh, R.D., Bayston, R., Williams, P.H., 2003. Stimulation of Staphylococcus epidermidis growth and biofilm formation by catecholamine inotropes. The Lancet 361, 130–135. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12231-3

Lyte, M., Nelson, S.G., Thompson, M.L., 1990. Innate and adaptive immune responses in a social conflict paradigm. Clinical Immunology and Immunopathology 57, 137–147. https://doi.org/10.1016/0090-1229(90)90029-P

Lyte, M., Vulchanova, L., Brown, D.R., 2011. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. Cell Tissue Res 343, 23–32. https://doi.org/10.1007/s00441-010-1050-0

Madslien, E.H., Olsen, J.S., Granum, P.E., Blatny, J.M., 2012. Genotyping of B. licheniformisbased on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. BMC Microbiol 12, 230. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-230

Maggi, C.A., 1995. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. Progress in Neurobiology 45, 1–98. https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)E0017-B

Mahajan, R.V., Kumar, V., Rajendran, V., Saran, S., Ghosh, P.C., Saxena, R.K., 2014. Purification and Characterization of a Novel and Robust L-Asparaginase Having Low-Glutaminase Activity from Bacillus licheniformis: In Vitro Evaluation of Anti-Cancerous Properties. PLOS ONE 9, e99037. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099037

Majkowska-Pilip, A., Halik, P.K., Gniazdowska, E., 2019. The Significance of NK1 Receptor Ligands and Their Application in Targeted Radionuclide Tumour Therapy. Pharmaceutics 11, 443. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090443

Maksimovic, S., Baba, Y., Lumpkin, E.A., 2013. Neurotransmitters and synaptic components in the Merkel cell–neurite complex, a gentle-touch receptor. Annals of the New York Academy of Sciences 1279, 13–21. https://doi.org/10.1111/nyas.12057

Mallbris, L., Carlén, L., Wei, T., Heilborn, J., Nilsson, M.F., Granath, F., Ståhle, M., 2010. Injury downregulates the expression of the human cathelicidin protein hCAP18/LL-37 in atopic

dermatitis. Experimental Dermatology 19, 442–449. https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00918.x
Marino, F., Cosentino, M., 2013. Adrenergic modulation of immune cells: an update. Amino Acids 45, 55–71. https://doi.org/10.1007/s00726-011-1186-6
Marks, J.G., Miller, J.J., 2019. 2 - Structure and Function of the Skin, in: Marks, J.G., Miller, J.J. (Eds.), Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology (Sixth Edition). Elsevier, London, pp. 2–10. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43040-1.00002-6
Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G., De Felice, M., 2002. Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of Bacillus licheniformi s. Microb Cell Fact 1, 1. https://doi.org/10.1186/1475-2859-1-1
Mart'yanov, S.V., Botchkova, E.A., Plakunov, V.K., Gannesen, A.V., 2021. The Impact of Norepinephrine on Mono-Species and Dual-Species Staphylococcal Biofilms. Microorganisms 9, 820. https://doi.org/10.3390/microorganisms9040820
Mashaghi, A., Marmalidou, A., Tehrani, M., Grace, P.M., Pothoulakis, C., Dana, R., 2016. Neuropeptide substance P and the immune response. Cell. Mol. Life Sci. 73, 4249–4264. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2293-z
Mason, R.T., Peterfreund, R.A., Sawchenko, P.E., Corrigan, A.Z., Rivier, J.E., Vale, W.W., 1984. Release of the predicted calcitonin gene-related peptide from cultured rat trigeminal ganglion cells. Nature 308, 653–655. https://doi.org/10.1038/308653a0
Mathot, A.G., Postollec, F., Leguerinel, I., 2021. Bacterial spores in spices and dried herbs: The risks for processed food. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 20, 840–862. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12690
Mazzoli, R., Pessione, E., 2016. The Neuro-endocrinological Role of Microbial Glutamate and GABA Signaling. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01934
McDowell, A., Barnard, E., Nagy, I., Gao, A., Tomida, S., Li, H., Eady, A., Cove, J., Nord, C.E., Patrick, S., 2012. An Expanded Multilocus Sequence Typing Scheme for Propionibacterium acnes: Investigation of 'Pathogenic', 'Commensal' and Antibiotic Resistant Strains. PLOS ONE 7, e41480. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041480
McDowell, A., Gao, A., Barnard, E., Fink, C., Murray, P.I., Dowson, C.G., Nagy, I., Lambert, P.A., Patrick, S., 2011. A novel multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen Propionibacterium acnes and characterization of type I cell surface-associated antigens. Microbiology 157, 1990–2003. https://doi.org/10.1099/mic.0.049676-0
McDowell, A., Nagy, I., Magyari, M., Barnard, E., Patrick, S., 2013. The Opportunistic Pathogen Propionibacterium acnes: Insights into Typing, Human Disease, Clonal Diversification and CAMP Factor Evolution. PLOS ONE 8, e70897. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070897
McLatchie, L.M., Fraser, N.J., Main, M.J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M.G., Foord, S.M., 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature 393, 333–339. https://doi.org/10.1038/30666
Meisel, J.S., Sfyroera, G., Bartow-McKenney, C., Gimblet, C., Bugayev, J., Horwinski, J., Kim, B., Brestoff, J.R., Tyldsley, A.S., Zheng, Q., Hodkinson, B.P., Artis, D., Grice, E.A., 2018. Commensal microbiota modulate gene expression in the skin. Microbiome 6, 20. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0404-9
Mercati, F., Dall'Aglio, C., Timperi, L., Scocco, P., Felice, E.D., Maranesi, M., 2019. Epithelial expression of the hormone leptin by bovine skin. Eur J Histochem 63, 2993. https://doi.org/10.4081/ejh.2019.2993
Meyronet, D., Jaber, K., Gentil-Perret, A., Cambazard, F., Misery, L., 2003. Decreased CGRP staining in alopecia areata. British Journal of Dermatology 149, 422–424. https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05425.x
Mias, C., Mengeaud, V., Bessou-Touya, S., Duplan, H., 2023. Recent advances in understanding inflammatory acne: Deciphering the relationship between Cutibacterium acnes and Th17

inflammatory pathway. J Eur Acad Dermatol Venereol 37 Suppl 2, 3–11. https://doi.org/10.1111/jdv.18794
Mijouin, L., Hillion, M., Ramdani, Y., Jaouen, T., Duclairoir-Poc, C., Follet-Gueye, M.-L., Lati, E., Yvergnaux, F., Driouich, A., Lefeuvre, L., Farmer, C., Misery, L., Feuilloley, M.G.J., 2013. Effects of a Skin Neuropeptide (Substance P) on Cutaneous Microflora. PLoS ONE 8, e78773. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078773
Mikami, N., Matsushita, H., Kato, T., Kawasaki, R., Sawazaki, T., Kishimoto, T., Ogitani, Y., Watanabe, K., Miyagi, Y., Sueda, K., Fukada, S., Yamamoto, H., Tsujikawa, K., 2011. Calcitonin Gene-Related Peptide Is an Important Regulator of Cutaneous Immunity: Effect on Dendritic Cell and T Cell Functions. The Journal of Immunology 186, 6886–6893. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100028
Mikkola, R., Kolari, M., Andersson, M.A., Helin, J., Salkinoja-Salonen, M.S., 2000. Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of Bacillus licheniformis. European Journal of Biochemistry 267, 4068–4074. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2000.01467.x
Miller, R.A., Kent, D.J., Watterson, M.J., Boor, K.J., Martin, N.H., Wiedmann, M., 2015. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. Journal of Dairy Science 98, 8492–8504. https://doi.org/10.3168/jds.2015-9943
Mishima, T., Ito, Y., Hosono, K., Tamura, Y., Uchida, Y., Hirata, M., Suzsuki, T., Amano, H., Kato, S., Kurihara, Y., Kurihara, H., Hayashi, I., Watanabe, M., Majima, M., 2011. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 300, H431–H439. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00466.2010
Moissl-Eichinger, C., Probst, A.J., Birarda, G., Auerbach, A., Koskinen, K., Wolf, P., Holman, H.-Y.N., 2017. Human age and skin physiology shape diversity and abundance of Archaea on skin. Sci Rep 7, 4039. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04197-4
Monaco-Shawver, L., Schwartz, L., Tuluc, F., Guo, C.-J., Lai, J.P., Gunnam, S.M., Kilpatrick, L.E., Banerjee, P.P., Douglas, S.D., Orange, J.S., 2011. Substance P inhibits natural killer cell cytotoxicity through the neurokinin-1 receptor. J Leukoc Biol 89, 113–125. https://doi.org/10.1189/jlb.0410200
Moreira, C.G., Sperandio, V., 2012. Interplay between the QseC and QseE Bacterial Adrenergic Sensor Kinases in Salmonella enterica Serovar Typhimurium Pathogenesis. Infection and Immunity 80, 4344–4353. https://doi.org/10.1128/iai.00803-12
Moreira, C.G., Weinshenker, D., Sperandio, V., 2010. QseC Mediates Salmonella enterica Serovar Typhimurium Virulence In Vitro and In Vivo. Infection and Immunity 78, 914–926. https://doi.org/10.1128/iai.01038-09
Morris, H.R., Panico, M., Etienne, T., Tippins, J., Girgis, S.I., MacIntyre, I., 1984. Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. Nature 308, 746–748. https://doi.org/10.1038/308746a0
Muff, R., Bühlmann, N., Fischer, J.A., Born, W., 1999. An Amylin Receptor Is Revealed Following Co-Transfection of a Calcitonin Receptor with Receptor Activity Modifying Proteins-1 or -3. Endocrinology 140, 2924–2927. https://doi.org/10.1210/endo.140.6.6930
Mulderry, P.K., Ghatki, M.A., Spokks, R.A., Jonhs, P.M., Pierson, A.M., Hamid, Q.A., Kanse, S., Amara, S.G., Burrik, J.M., Legon, S., Polak, J.M., Bloom, S.R., 1988. Differential expression of α-CGRP and β-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. Neuroscience 25, 195–205. https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90018-8
Muras, A., Romero, M., Mayer, C., Otero, A., 2021. Biotechnological applications of Bacillus licheniformis. Critical Reviews in Biotechnology 41, 609–627. https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1873239
Myles, I.A., Reckhow, J.D., Williams, K.W., Sastalla, I., Frank, K.M., Datta, S.K., 2016. A method for culturing Gram-negative skin microbiota. BMC Microbiology 16, 60. https://doi.org/10.1186/s12866-016-0684-9

Nafisi, S., Maibach, H.I., 2018. Chapter 3 - Skin penetration of nanoparticles, in: Shegokar, R., Souto, E.B. (Eds.), Emerging Nanotechnologies in Immunology, Micro and Nano Technologies. Elsevier, Boston, pp. 47–88. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40016-9.00003-8

Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A., Seltmann, H., Patrick, S., Zouboulis, C.C., Kemény, L., 2006. Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. Microbes Infect 8, 2195–2205. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.001

Nagy, I., Pivarcsi, A., Koreck, A., Széll, M., Urbán, E., Kemény, L., 2005. Distinct Strains of *Propionibacterium acnes* Induce Selective Human β-Defensin-2 and Interleukin-8 Expression in Human Keratinocytes Through Toll-Like Receptors. Journal of Investigative Dermatology 124, 931–938. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23705.x

Naik, S., Bouladoux, N., Linehan, J.L., Han, S.-J., Harrison, O.J., Wilhelm, C., Conlan, S., Himmelfarb, S., Byrd, A.L., Deming, C., Quinones, M., Brenchley, J.M., Kong, H.H., Tussiwand, R., Murphy, K.M., Merad, M., Segre, J.A., Belkaid, Y., 2015. Commensal–dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. Nature 520, 104–108. https://doi.org/10.1038/nature14052

Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M.J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J.A., Dzutsev, A., Kong, H., Campbell, D.J., Trinchieri, G., Segre, J.A., Belkaid, Y., 2012. Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. Science 337, 1115–1119. https://doi.org/10.1126/science.1225152

Nakamizo, S., Egawa, G., Honda, T., Nakajima, S., Belkaid, Y., Kabashima, K., 2015. Commensal bacteria and cutaneous immunity. Semin Immunopathol 37, 73–80. https://doi.org/10.1007/s00281-014-0452-6

Nakamura, Y., Oscherwitz, J., Cease, K.B., Chan, S.M., Muñoz-Planillo, R., Hasegawa, M., Villaruz, A.E., Cheung, G.Y.C., McGavin, M.J., Travers, J.B., Otto, M., Inohara, N., Núñez, G., 2013. Staphylococcus δ-toxin induces allergic skin disease by activating mast cells. Nature 503, 397–401. https://doi.org/10.1038/nature12655

Nakano, M., Takahashi, A., Sakai, Y., Nakaya, Y., 2007. Modulation of Pathogenicity with Norepinephrine Related to the Type III Secretion System of Vibrio parahaemolyticus. The Journal of Infectious Diseases 195, 1353–1360. https://doi.org/10.1086/513275

Nakano, Y., 2004. Stress-induced modulation of skin immune function: two types of antigen-presenting cells in the epidermis are differentially regulated by chronic stress. British Journal of Dermatology 151, 50–64. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.05980.x

Nakatsuji, T., Chen, T.H., Narala, S., Chun, K.A., Two, A.M., Yun, T., Shafiq, F., Kotol, P.F., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Latif, H., Kim, J.-N., Lockhart, A., Artis, K., David, G., Taylor, P., Streib, J., Dorrestein, P.C., Grier, A., Gill, S.R., Zengler, K., Hata, T.R., Leung, D.Y.M., Gallo, R.L., 2017. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against Staphylococcus aureus and are deficient in atopic dermatitis. Sci Transl Med 9, eaah4680. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4680

National Center for Biotechnology Information (NCBI) - Taxonomy Browser - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi

N'Diaye, A., Gannesen, A., Borrel, V., Maillot, O., Enault, J., Racine, P.-J., Plakunov, V., Chevalier, S., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., 2017. Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide: Key Regulators of Cutaneous Microbiota Homeostasis. Front Endocrinol (Lausanne) 8, 15. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00015

N'Diaye, A., Mijouin, L., Hillion, M., Diaz, S., Konto-Ghiorghi, Y., Percoco, G., Chevalier, S., Lefeuvre, L., Harmer, N.J., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., 2016. Effect of Substance P in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis Virulence: Implication for

Skin Homeostasis. Frontiers in Microbiology 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00506

N'Diaye, A.R., Borrel, V., Racine, P.-J., Clamens, T., Depayras, S., Maillot, O., Schaack, B., Chevalier, S., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., 2019. Mechanism of action of the moonlighting protein EfTu as a Substance P sensor in Bacillus cereus. Sci Rep 9, 1304. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37506-6

N'Diaye, A.R., Leclerc, C., Kentache, T., Hardouin, J., Poc, C.D., Konto-Ghiorghi, Y., Chevalier, S., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., 2016. Skin-bacteria communication: Involvement of the neurohormone Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in the regulation of Staphylococcus epidermidis virulence. Sci Rep 6, 35379. https://doi.org/10.1038/srep35379

Neal, C.P., Freestone, P.P.E., Maggs, A.F., Haigh, R.D., Williams, P.H., Lyte, M., 2001. Catecholamine inotropes as growth factors for Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative staphylococci. FEMS Microbiology Letters 194, 163–169. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb09463.x

Negele, K., Heinrich, J., Borte, M., von Berg, A., Schaaf, B., Lehmann, I., Wichmann, H.-E., Bolte, G., Group, for the L.S., 2004. Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. Pediatric Allergy and Immunology 15, 48–54. https://doi.org/10.1046/j.0905-6157.2003.00101.x

Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., Nickoloff, B.J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. Nat Rev Immunol 9, 679–691. https://doi.org/10.1038/nri2622

Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A.-M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., Priha, O., Salkinoja-Salonen, M., 2007. Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. Veterinary Microbiology 124, 329–339. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.015

Niu, D., Wang, Z.-X., 2007. Development of a pair of bifunctional expression vectors for Escherichia coli and Bacillus licheniformis. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34, 357–362. https://doi.org/10.1007/s10295-007-0204-x

Niu, D., Zuo, Z., Shi, G.-Y., Wang, Z.-X., 2009. High yield recombinant thermostable α-amylase production using an improved Bacillus licheniformis system. Microbial Cell Factories 8, 58. https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-58

Niu, L., Gao, M., Wen, S., Wang, F., Shangguan, H., Guo, Z., Zhang, R., Ge, J., 2023. Effects of Catecholamine Stress Hormones Norepinephrine and Epinephrine on Growth, Antimicrobial Susceptibility, Biofilm Formation, and Gene Expressions of Enterotoxigenic Escherichia coli. International Journal of Molecular Sciences 24, 15646. https://doi.org/10.3390/ijms242115646

Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hashimoto, K., Nagaoka, I., Okumura, K., Ogawa, H., 2007. Antimicrobial Peptides Human *β*-Defensins Stimulate Epidermal Keratinocyte Migration, Proliferation and Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. Journal of Investigative Dermatology 127, 594–604. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700599

O'Connor, T.M., O'Connell, J., O'Brien, D.I., Goode, T., Bredin, C.P., Shanahan, F., 2004. The role of substance P in inflammatory disease. Journal of Cellular Physiology 201, 167–180. https://doi.org/10.1002/jcp.20061

Oh, J., Byrd, A.L., Deming, C., Conlan, S., Kong, H.H., Segre, J.A., 2014. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. Nature 514, 59–64. https://doi.org/10.1038/nature13786

Oh, J., Byrd, A.L., Park, M., NISC Comparative Sequencing Program, Kong, H.H., Segre, J.A., 2016. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. Cell 165, 854–866. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.008

Oh, J., Conlan, S., Polley, E.C., Segre, J.A., Kong, H.H., 2012. Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults. Genome Med 4, 77. https://doi.org/10.1186/gm378

Oh, T.-H., Lee, E.-Y., Lee, S., Lee, W.-S., 2005. Effects of Calcitonin Gene-Related Peptide on the Hair Growth in Human Hair Follicle Organ Culture. Korean Journal of Dermatology 342–351.

Ohno, T., Hattori, Y., Komine, R., Ae, T., Mizuguchi, S., Arai, K., Saeki, T., Suzuki, T., Hosono, K., Hayashi, I., Oh–Hashi, Y., Kurihara, Y., Kurihara, H., Amagase, K., Okabe, S., Saigenji, K., Majima, M., 2008. Roles of Calcitonin Gene–Related Peptide in Maintenance of Gastric Mucosal Integrity and in Enhancement of Ulcer Healing and Angiogenesis. Gastroenterology 134, 215–225. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.10.001

Okabe, T., Hide, M., Koro, O., Yamamoto, S., 2000. Substance P induces tumor necrosis factor-α release from human skin via mitogen-activated protein kinase. European Journal of Pharmacology 398, 309–315. https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00304-6

Olesen, J., Diener, H.-C., Husstedt, I.W., Goadsby, P.J., Hall, D., Meier, U., Pollentier, S., Lesko, L.M., 2004. Calcitonin Gene–Related Peptide Receptor Antagonist BIBN 4096 BS for the Acute Treatment of Migraine. New England Journal of Medicine 350, 1104–1110. https://doi.org/10.1056/NEJMoa030505

Oneal, M.J., Schafer, E.R., Madsen, M.L., Minion, F.C., 2008. Global transcriptional analysis of Mycoplasma hyopneumoniae following exposure to norepinephrine. Microbiology 154, 2581–2588. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/020230-0

Onuoha, G.N., Alpar, E.K., 2001. Levels of vasodilators (SP, CGRP) and vasoconstrictor (NPY) peptides in early human burns. European Journal of Clinical Investigation 31, 253–257. https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2001.00787.x

Orsal, A.S., Blois, S., Labuz, D., Peters, E.M.J., Schaefer, M., Arck, P.C., 2006. The progesterone derivative dydrogesterone down-regulates neurokinin 1 receptor expression on lymphocytes, induces a Th2 skew and exerts hypoalgesic effects in mice. J Mol Med 84, 159–167. https://doi.org/10.1007/s00109-005-0005-5

Otsuka, M., Konishi, S., 1976. Release of substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. Nature 264, 83–84. https://doi.org/10.1038/264083a0

Otsuka, M., Yoshioka, K., 1993. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. Physiological Reviews. https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.2.229

Ovcharova, M.A., Geraskina, O.V., Danilova, N.D., Botchkova, E.A., Martyanov, S.V., Feofanov, A.V., Plakunov, V.K., Gannesen, A.V., 2021. Atrial Natriuretic Peptide Affects Skin Commensal Staphylococcus epidermidis and Cutibacterium acnes Dual-Species Biofilms. Microorganisms 9, 552. https://doi.org/10.3390/microorganisms9030552

Ozaka, T., Doi, Y., Kayashima, K., Fujimoto, S., 1997. Weibel-Palade bodies as a storage site of calcitonin gene-related peptide and endothelin-1 in blood vessels of the rat carotid body. The Anatomical Record 247, 388–394. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<388::AID-AR10>3.0.CO;2-L

Padgett, D.A., Glaser, R., 2003. How stress influences the immune response. Trends in Immunology 24, 444–448. https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00173-X

Padhi, T.R., Sharma, S., Das, S., Das, T., 2012. BACILLUS LICHENIFORMIS AS A CAUSE OF DELAYED-ONSET RECURRENT PSEUDOPHAKIC ENDOPHTHALMITIS—A RARE CASE REPORT. Retinal Cases and Brief Reports 6, 43. https://doi.org/10.1097/ICB.0b013e3182051df9

Paharik, A.E., Parlet, C.P., Chung, N., Todd, D.A., Rodriguez, E.I., Dyke, M.J.V., Cech, N.B., Horswill, A.R., 2017. Coagulase-Negative Staphylococcal Strain Prevents Staphylococcus aureus Colonization and Skin Infection by Blocking Quorum Sensing. Cell Host & Microbe 22, 746-756.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.001

Palmer, C.N.A., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P., Goudie, D.R., Sandilands, A., Campbell, L.E., Smith, F.J.D., O'Regan, G.M., Watson, R.M., Cecil, J.E., Bale, S.J., Compton, J.G., DiGiovanna, J.J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C.S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L.B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W.H.I., 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. Nat Genet 38, 441–446. https://doi.org/10.1038/ng1767

Pan, Y., Tian, T., Park, C.O., Lofftus, S.Y., Mei, S., Liu, X., Luo, C., O'Malley, J.T., Gehad, A., Teague, J.E., Divito, S.J., Fuhlbrigge, R., Puigserver, P., Krueger, J.G., Hotamisligil, G.S., Clark, R.A., Kupper, T.S., 2017. Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism. Nature 543, 252–256. https://doi.org/10.1038/nature21379

Pande, G.S.J., Suong, N.T., Bossier, P., Defoirdt, T., 2014. The catecholamine stress hormones norepinephrine and dopamine increase the virulence of pathogenic Vibrio anguillarum and Vibrio campbellii. FEMS Microbiology Ecology 90, 761–769. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12432

Park, D.J., Yun, J.C., Baek, J.E., Jung, E.Y., Lee, D.W., Kim, M.-A., Chang, S.-H., 2006. Relapsing Bacillus licheniformis peritonitis in a continuous ambulatory peritoneal dialysis patient (Case Report). Nephrology 11, 21–22. https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2006.00539.x

Park, K.A., Fehrenbacher, J.C., Thompson, E.L., Duarte, D.B., Hingtgen, C.M., Vasko, M.R., 2010. Signaling pathways that mediate nerve growth factor-induced increase in expression and release of calcitonin gene-related peptide from sensory neurons. Neuroscience 171, 910–923. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.027

Park, Y.J., Lee, H.K., 2018. The Role of Skin and Orogenital Microbiota in Protective Immunity and Chronic Immune-Mediated Inflammatory Disease. Front. Immunol. 8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01955

Pattnaik, P., Kaushik, J.K., Grover, S., Batish, V.K., 2001. Purification and characterization of a bacteriocin-like compound (Lichenin) produced anaerobically by Bacillus licheniformis isolated from water buffalo. Journal of Applied Microbiology 91, 636–645. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01429.x

Paus, R., Nickoloff, B.J., Ito, T., 2005. A 'hairy' privilege. Trends in Immunology 26, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.014

Pavić, S., Brett, M., Petrić, I., Laštre, D., Smoljanović, M., Atkinson, M., Kovačić, A., Cetinić, E., Ropac, D., 2005. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Archiv Fur Lebensmittelhygiene, 56, 20-22. doi/full/10.5555/20053062498

Peleg, A.Y., Hogan, D.A., Mylonakis, E., 2010. Medically important bacterial–fungal interactions. Nat Rev Microbiol 8, 340–349. https://doi.org/10.1038/nrmicro2313

Peng, Z., Mao, X., Zhang, J., Du, G., Chen, J., 2019. Effective biodegradation of chicken feather waste by co-cultivation of keratinase producing strains. Microbial Cell Factories 18, 84. https://doi.org/10.1186/s12934-019-1134-9

Percival, S.L., Emanuel, C., Cutting, K.F., Williams, D.W., 2012. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. International Wound Journal 9, 14–32. https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00836.x

Perez, G.I.P., Gao, Z., Jourdain, R., Ramirez, J., Gany, F., Clavaud, C., Demaude, J., Breton, L., Blaser, M.J., 2016. Body Site Is a More Determinant Factor than Human Population Diversity in the Healthy Skin Microbiome. PLoS ONE 11. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151990

Persicke, M., Albersmeier, A., Bednarz, H., Niehaus, K., Kalinowski, J., Rückert, C., 2015. Genome sequence of the soil bacterium Corynebacterium callunae type strain DSM 20147T. Standards in Genomic Sciences 10, 5. https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-5

Peters, E.M.J., Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Tobin, D.J., Paus, R., 2001. Hair-Cycle-Associated Remodeling of the Peptidergic Innervation of Murine Skin, and Hair Growth

Modulation by Neuropeptides. Journal of Investigative Dermatology 116, 236–245. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01232.x

Peters, E.M.J., Ericson, M.E., Hosoi, J., Seiffert, K., Hordinsky, M.K., Ansel, J.C., Paus, R., Scholzen, T.E., 2006. Neuropeptide Control Mechanisms in Cutaneous Biology: Physiological and Clinical Significance. Journal of Investigative Dermatology 126, 1937–1947. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700429

Peterson, G., Kumar, A., Gart, E., Narayanan, S., 2011. Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. Microbial Pathogenesis 51, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.03.002

Peterson, P.K., Chao, C.C., Molitor, T., Murtaugh, M., Strgar, F., Sharp, B.M., 1991. Stress and Pathogenesis of Infectious Disease. Reviews of Infectious Diseases 13, 710–720. https://doi.org/10.1093/clinids/13.4.710

Pickering, J., Teo, T.H., Thornton, R.B., Kirkham, L.-A., Zosky, G.R., Clifford, H.D., 2018. Bacillus licheniformis in geogenic dust induces inflammation in respiratory epithelium. Environmental Research 164, 248–254. https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.025

Pin, S.S., Bahr, B.A., 2008. Protein kinase C is a common component of CGRP receptor desensitization induced by distinct agonists. European Journal of Pharmacology 587, 8–15. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.083

Pioszak, A.A., Hay, D.L., 2020. Chapter Five - RAMPs as allosteric modulators of the calcitonin and calcitonin-like class B G protein-coupled receptors, in: Langmead, C.J. (Ed.), Advances in Pharmacology, From Structure to Clinical Development: Allosteric Modulation of G Protein-Coupled Receptors. Academic Press, pp. 115–141. https://doi.org/10.1016/bs.apha.2020.01.001

Plichta, J.K., Gao, X., Lin, H., Dong, Q., Toh, E., Nelson, D.E., Gamelli, R.L., Grice, E.A., Radek, K.A., 2017. Cutaneous Burn Injury Promotes Shifts in the Bacterial Microbiome in Autologous Donor Skin: Implications for Skin Grafting Outcomes. Shock 48, 441. https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000874

Poeggeler, B., Knuever, J., Gáspár, E., Bíró, T., Klinger, M., Bodo, E., Wiesner, R.J., Wenzel, B.E., Paus, R., 2010. Thyrotropin powers human mitochondria. The FASEB Journal 24, 1525–1531. https://doi.org/10.1096/fj.09-147728

Potter, L.R., Yoder, A.R., Flora, D.R., Antos, L.K., Dickey, D.M., 2009. Natriuretic Peptides: Their Structures, Receptors, Physiologic Functions and Therapeutic Applications, in: Schmidt, H.H.H.W., Hofmann, F., Stasch, J.-P. (Eds.), cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 341–366. https://doi.org/10.1007/978-3-540-68964-5_15

Poyner, D.R., Sexton, P.M., Marshall, I., Smith, D.M., Quirion, R., Born, W., Muff, R., Fischer, J.A., Foord, S.M., 2002. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. Pharmacol Rev 54, 233–246. https://doi.org/10.1124/pr.54.2.233

Probst, A.J., Auerbach, A.K., Moissl-Eichinger, C., 2013. Archaea on Human Skin. PLOS ONE 8, e65388. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065388

Pullinger, G.D., Carnell, S.C., Sharaff, F.F., van Diemen, P.M., Dziva, F., Morgan, E., Lyte, M., Freestone, P.P.E., Stevens, M.P., 2010. Norepinephrine Augments Salmonella enterica-Induced Enteritis in a Manner Associated with Increased Net Replication but Independent of the Putative Adrenergic Sensor Kinases QseC and QseE. Infection and Immunity 78, 372–380. https://doi.org/10.1128/iai.01203-09

Qi, T., Dong, M., Watkins, H., Wootten, D., Miller, L., Hay, D., 2013. Receptor activity-modifying protein-dependent impairment of calcitonin receptor splice variant Δ(1–47)hCT(a) function. British Journal of Pharmacology 168, 644–657. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02197.x

Qin, M., Pirouz, A., Kim, M.-H., Krutzik, S.R., Garbán, H.J., Kim, J., 2014. *Propionibacterium acnes* Induces IL-1β Secretion via the NLRP3 Inflammasome in Human Monocytes. Journal of Investigative Dermatology 134, 381–388. https://doi.org/10.1038/jid.2013.309

Quinlan, K.L., Song, I.-S., Bunnett, N.W., Letran, E., Steinhoff, M., Harten, B., Olerud, J.E., Armstrong, C.A., Caughman, S.W., Ansel, J.C., 1998. Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. American Journal of Physiology-Cell Physiology 275, C1580–C1590. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.6.C1580

Quinlan, K.L., Song, I.-S., Naik, S.M., Letran, E.L., Olerud, J.E., Bunnett, N.W., Armstrong, C.A., Caughman, S.W., Ansel, J.C., 1999. VCAM-1 Expression on Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Is Directly and Specifically Up-Regulated by Substance P1. The Journal of Immunology 162, 1656–1661. https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.3.1656

Raap, U., Ständer, S., Metz, M., 2011. Pathophysiology of itch and new treatments. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology 11, 420. https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32834a41c2

Racine, P., Janvier, X., Clabaut, M., Catovic, C., Souak, D., Boukerb, A.M., Groboillot, A., Konto-Ghiorghi, Y., Duclairoir-Poc, C., Lesouhaitier, O., Orange, N., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J., 2020. Dialog between skin and its microbiota: Emergence of "Cutaneous Bacterial Endocrinology." Experimental Dermatology. https://doi.org/10.1111/exd.14158

Rademacher, F., Gläser, R., Harder, J., 2021. Antimicrobial peptides and proteins: Interaction with the skin microbiota. Exp Dermatol 30, 1496–1508. https://doi.org/10.1111/exd.14433

Rademacher, F., Simanski, M., Harder, J., 2016. RNase 7 in Cutaneous Defense. International Journal of Molecular Sciences 17, 560. https://doi.org/10.3390/ijms17040560

Rademacher, F., Simanski, M., Schröder, L., Mildner, M., Harder, J., 2017. The role of RNase 7 in innate cutaneous defense against Pseudomonas aeruginosa. Exp Dermatol 26, 227–233. https://doi.org/10.1111/exd.13166

Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd_Allah, E.F., 2017. Bacillus: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. Front. Physiol. 8. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667

Ramot, Y., Bír¶, T., Tiede, S., To´th, B.I., Langan, E.A., Sugawara, K., Foitzik, K., Ingber, A., Goffin, V., Langbein, L., Paus, R., 2010. Prolactin—a novel neuroendocrine regulator of human keratin expression in situ. The FASEB Journal 24, 1768–1779. https://doi.org/10.1096/fj.09-146415

Ramot, Y., Böhm, M., Paus, R., 2021. Translational Neuroendocrinology of Human Skin: Concepts and Perspectives. Trends in Molecular Medicine 27, 60–74. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.09.002

Ramsey, M.M., Freire, M.O., Gabrilska, R.A., Rumbaugh, K.P., Lemon, K.P., 2016. Staphylococcus aureus Shifts toward Commensalism in Response to Corynebacterium Species. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01230

Reading, N.C., Rasko, D.A., Torres, A.G., Sperandio, V., 2009. The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 5889–5894. https://doi.org/10.1073/pnas.0811409106

REGOLI, D., 1994. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. Pharmacol Rev 46, 551–599.

Renaud, M., Miget, A., 1930. Role favorisant des perturbations locales causées par l'adrénaline sur le développement des infections microbiennes. CR Seances Soc Biol Fil, 103, 1052-1054.

Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., de Leon, A.L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T.,

Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S.D., Berka, R.M., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillusspecies. Genome Biol 5, r77. https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r77

Richards, R.G., Hartman, S.M., 1996. Human Dermal Fibroblast Cells Express Prolactin *In Vitro*. Journal of Investigative Dermatology 106, 1250–1255. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12348944

Richardson, J.D., Vasko, M.R., 2002. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 302, 839–845. https://doi.org/10.1124/jpet.102.032797

Ridaura, V.K., Bouladoux, N., Claesen, J., Chen, Y.E., Byrd, A.L., Constantinides, M.G., Merrill, E.D., Tamoutounour, S., Fischbach, M.A., Belkaid, Y., 2018. Contextual control of skin immunity and inflammation by Corynebacterium. Journal of Experimental Medicine 215, 785–799. https://doi.org/10.1084/jem.20171079

Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., Martinotti, M.G., 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by Bacillus spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. Appl Microbiol Biotechnol 83, 541–553. https://doi.org/10.1007/s00253-009-1987-7

Rodrigues, D.L.N., Ariute, J.C., Rodrigues da Costa, F.M., Benko-Iseppon, A.M., Barh, D., Azevedo, V., Aburjaile, F., 2023. PanViTa: Pan Virulence and resisTance analysis. Front. Bioinform. 3. https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1070406

Roggenkamp, D., Köpnick, S., Stäb, F., Wenck, H., Schmelz, M., Neufang, G., 2013. Epidermal Nerve Fibers Modulate Keratinocyte Growth via Neuropeptide Signaling in an Innervated Skin Model. Journal of Investigative Dermatology 133, 1620–1628. https://doi.org/10.1038/jid.2012.464

Rønning, H.T., Madslien, E.H., Asp, T.N., Granum, P.E., 2015. Identification and quantification of lichenysin – a possible source of food poisoning. Food Additives & Contaminants: Part A 32, 2120–2130. https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1096967

Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S.W., Bunnett, N.W., Steinhoff, M., 2006. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. Physiological Reviews 86, 1309–1379. https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2005

Rosay, T., Bazire, A., Diaz, S., Clamens, T., Blier, A.-S., Mijouin, L., Hoffmann, B., Sergent, J.-A., Bouffartigues, E., Boireau, W., Vieillard, J., Hulen, C., Dufour, A., Harmer, N.J., Feuilloley, M.G.J., Lesouhaitier, O., 2015. Pseudomonas aeruginosa Expresses a Functional Human Natriuretic Peptide Receptor Ortholog: Involvement in Biofilm Formation. mBio 6, 10.1128/mbio.01033-15. https://doi.org/10.1128/mbio.01033-15

Rosenfeld, M.G., Amara, S.G., Roos, B.A., Ong, E.S., Evans, R.M., 1981. Altered expression of the calcitonin gene associated with RNA polymorphism. Nature 290, 63–65. https://doi.org/10.1038/290063a0

Rosenfeld, M.G., Mermod, J.-J., Amara, S.G., Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J., Vale, W.W., Evans, R.M., 1983. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. Nature 304, 129–135. https://doi.org/10.1038/304129a0

Roush, E.D., Kwatra, M.M., 1998. Human substance P receptor expressed in Chinese hamster ovary cells directly activates Gαq/11, Gαs, and Gαo. FEBS Letters 428, 291–294. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00553-5

Ruiz, M., Cocores, A., Tosti, A., Goadsby, P.J., Monteith, T.S., 2023. Alopecia as an emerging adverse event to CGRP monoclonal antibodies: Cases Series, evaluation of FAERS, and literature review. Cephalalgia 43, 033310242211435. https://doi.org/10.1177/03331024221143538

Russell, F.A., King, R., Smillie, S.-J., Kodji, X., Brain, S.D., 2014. Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. Physiological Reviews 94, 1099–1142. https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2013

Russo, A.F., 2015. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP): A New Target for Migraine. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 55, 533–552. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124701

Russo, A.F., Hay, D.L., 2023. CGRP physiology, pharmacology, and therapeutic targets: migraine and beyond. Physiological Reviews 103, 1565–1644. https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2021

Salkinoja-Salonen, M.S., Vuorio, R., Andersson, M.A., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski, T., Scoging, A.C., 1999. Toxigenic Strains of Bacillus licheniformis Related to Food Poisoning. Applied and Environmental Microbiology 65, 4637–4645. https://doi.org/10.1128/AEM.65.10.4637-4645.1999

Samuelov, L., Kinori, M., Bertolini, M., Paus, R., 2012. Neural controls of human hair growth: Calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces catagen. Journal of Dermatological Science 67, 153–155. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.04.006

Sánchez, M.L., Rodríguez, F.D., Coveñas, R., 2023. Peptidergic Systems and Cancer: Focus on Tachykinin and Calcitonin/Calcitonin Gene-Related Peptide Families. Cancers 15, 1694. https://doi.org/10.3390/cancers15061694

Sandrini, S.M., Shergill, R., Woodward, J., Muralikuttan, R., Haigh, R.D., Lyte, M., Freestone, P.P., 2010. Elucidation of the Mechanism by Which Catecholamine Stress Hormones Liberate Iron from the Innate Immune Defense Proteins Transferrin and Lactoferrin. Journal of Bacteriology 192, 587–594. https://doi.org/10.1128/jb.01028-09

Sanford, J.A., Gallo, R.L., 2013. Functions of the skin microbiota in health and disease. Seminars in Immunology, Microbiota and the immune system, an amazing mutualism forged by co-evolution 25, 370–377. https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.005

SanMiguel, A.J., Meisel, J.S., Horwinski, J., Zheng, Q., Grice, E.A., 2017. Topical Antimicrobial Treatments Can Elicit Shifts to Resident Skin Bacterial Communities and Reduce Colonization by Staphylococcus aureus Competitors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 61, 10.1128/aac.00774-17. https://doi.org/10.1128/aac.00774-17

Sarkodie, E.K., Zhou, S., Baidoo, S.A., Chu, W., 2019. Influences of stress hormones on microbial infections. Microbial Pathogenesis 131, 270–276. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.013

Sayem, S.A., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., De Felice, M., Varcamonti, M., 2011. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of Bacillus licheniformis. Microb Cell Fact 10, 74. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-74

Scardaci, R., Varese, F., Manfredi, M., Marengo, E., Mazzoli, R., Pessione, E., 2021. *Enterococcus faecium* NCIMB10415 responds to norepinephrine by altering protein profiles and phenotypic characters. Journal of Proteomics 231, 104003. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104003

Scharschmidt, T.C., Vasquez, K.S., Pauli, M.L., Leitner, E.G., Chu, K., Truong, H.-A., Lowe, M.M., Sanchez Rodriguez, R., Ali, N., Laszik, Z.G., Sonnenburg, J.L., Millar, S.E., Rosenblum, M.D., 2017. Commensal Microbes and Hair Follicle Morphogenesis Coordinately Drive Treg Migration into Neonatal Skin. Cell Host Microbe 21, 467-477.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.001

Scharschmidt, T.C., Vasquez, K.S., Truong, H.-A., Gearty, S.V., Pauli, M.L., Nosbaum, A., Gratz, I.K., Otto, M., Moon, J.J., Liese, J., Abbas, A.K., Fischbach, M.A., Rosenblum, M.D., 2015. A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. Immunity 43, 1011–1021. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.016

Schilcher, K., Horswill, A.R., 2020. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. Microbiology and Molecular Biology Reviews 84, 10.1128/mmbr.00026-19. https://doi.org/10.1128/mmbr.00026-19

Schmelz, M., 2019. Itch Processing in the Skin. Front. Med. 6. https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00167

Schmid-Wendtner, M.-H., Korting, H.C., 2006. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. Skin Pharmacology and Physiology 19, 296–302. https://doi.org/10.1159/000094670

Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9, 671–675. https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Scholz, C.F.P., 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. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 66, 4422–4432. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001367

Schütz, B., Mauer, D., Salmon, A.-M., Changeux, J.-P., Zimmer, A., 2004. Analysis of the cellular expression pattern of β-CGRP in α-CGRP-deficient mice. Journal of Comparative Neurology 476, 32–43. https://doi.org/10.1002/cne.20211

Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M.A., Beyvers, S., Blom, J., Goesmann, A., 2021. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. Microbial Genomics 7, 000685. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685

Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., Erspamer, V., 2002. The tachykinin peptide family. Pharmacol Rev 54, 285–322. https://doi.org/10.1124/pr.54.2.285

Seydlová, G., Svobodová, J., 2008. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. cent.eur.j.med 3, 123–133. https://doi.org/10.2478/s11536-008-0002-5

Sharma, V.K., Akavaram, S., Bayles, D.O., 2022. Genomewide transcriptional response of Escherichia coli O157:H7 to norepinephrine. BMC Genomics 23, 107. https://doi.org/10.1186/s12864-021-08167-z

Shastri, M., Sharma, M., Sharma, K., Sharma, A., Minz, R.W., Dogra, S., Chhabra, S., 2024. Cutaneous-immuno-neuro-endocrine (CINE) system: A complex enterprise transforming skin into a super organ. Experimental Dermatology 33, e15029. https://doi.org/10.1111/exd.15029

Shepherd, A.J., Downing, J.E.G., Miyan, J.A., 2005. Without nerves, immunology remains incomplete –in vivo veritas. Immunology 116, 145–163. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02223.x

Shi, X., Wang, L., Clark, J.D., Kingery, W.S., 2013. Keratinocytes express cytokines and nerve growth factor in response to neuropeptide activation of the ERK1/2 and JNK MAPK transcription pathways. Regulatory Peptides 186, 92–103. https://doi.org/10.1016/j.regpep.2013.08.001

Shibagaki, N., Suda, W., Clavaud, C., Bastien, P., Takayasu, L., Iioka, E., Kurokawa, R., Yamashita, N., Hattori, Y., Shindo, C., Breton, L., Hattori, M., 2017. Aging-related changes in the diversity of women's skin microbiomes associated with oral bacteria. Sci Rep 7, 10567. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10834-9

Simanski, M., Dressel, S., Gläser, R., Harder, J., 2010. RNase 7 Protects Healthy Skin from *Staphylococcus aureus* Colonization. Journal of Investigative Dermatology 130, 2836–2838. https://doi.org/10.1038/jid.2010.217

Siney, L., Brain, S.D., 1996. Involvement of sensory neuropeptides in the development of plasma extravasation in rat dorsal skin following thermal injury. Br J Pharmacol 117, 1065–1070. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb16698.x

Singh, P., Patil, Y., Rale, V., 2019. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. Journal of Applied Microbiology 126, 2–13. https://doi.org/10.1111/jam.14057
Slominski, A., Pisarchik, A., Wortsman, J., Kohn, L., Ain, K.B., Venkataraman, G.M., Chung, J.H., Giuliani, C., Thornton, M., Slugocki, G., Tobin, D.J., 2002. Expression of Hypothalamic–Pituitary–Thyroid Axis RelatedGenes in the Human Skin. Journal of Investigative Dermatology 119, 1449–1455. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.19617.x
Slominski, A., Wortsman, J., 2000. Neuroendocrinology of the Skin. Endocrine Reviews 21, 457–487. https://doi.org/10.1210/edrv.21.5.0410
Slominski, A., Wortsman, J., Luger, T., Paus, R., Solomon, S., 2000. Corticotropin Releasing Hormone and Proopiomelanocortin Involvement in the Cutaneous Response to Stress. Physiological Reviews 80, 979–1020. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.979
Slominski, A., Wortsman, J., Tuckey, R.C., Paus, R., 2007. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. Molecular and Cellular Endocrinology, Adrenal/Molecular Steroidogenesis Conference 2006 265–266, 143–149. https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.012
Slominski, A.T., Slominski, R.M., Raman, C., Chen, J.Y., Athar, M., Elmets, C., 2022. Neuroendocrine signaling in the skin with a special focus on the epidermal neuropeptides. American Journal of Physiology-Cell Physiology 323, C1757–C1776. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00147.2022
Slominski, A.T., Zmijewski, M.A., Zbytek, B., Tobin, D.J., Theoharides, T.C., Rivier, J., 2013. Key Role of CRF in the Skin Stress Response System. Endocrine Reviews 34, 827–884. https://doi.org/10.1210/er.2012-1092
Smillie, S.-J., Brain, S.D., 2011. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hypertension. Neuropeptides 45, 93–104. https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.12.002
Sorokulova, I.B., Pinchuk, I.V., Denayrolles, M., Osipova, I.G., Huang, J.M., Cutting, S.M., Urdaci, M.C., 2008. The Safety of Two Bacillus Probiotic Strains for Human Use. Dig Dis Sci 53, 954–963. https://doi.org/10.1007/s10620-007-9959-1
Spanò, A., Laganà, P., Visalli, G., Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., 2016. In Vitro Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from the Marine Thermophilic Bacillus licheniformis T14. Curr Microbiol 72, 518–528. https://doi.org/10.1007/s00284-015-0981-9
Sparber, F., Gregorio, C.D., Steckholzer, S., Ferreira, F.M., Dolowschiak, T., Ruchti, F., Kirchner, F.R., Mertens, S., Prinz, I., Joller, N., Buch, T., Glatz, M., Sallusto, F., LeibundGut-Landmann, S., 2019. The Skin Commensal Yeast Malassezia Triggers a Type 17 Response that Coordinates Anti-fungal Immunity and Exacerbates Skin Inflammation. Cell Host & Microbe 25, 389-403.e6. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.02.002
Spencer, H., Karavolos, M.H., Bulmer, D.M., Aldridge, P., Chhabra, S.R., Winzer, K., Williams, P., Khan, C.M.A., 2010. Genome-Wide Transposon Mutagenesis Identifies a Role for Host Neuroendocrine Stress Hormones in Regulating the Expression of Virulence Genes in Salmonella. Journal of Bacteriology 192, 714–724. https://doi.org/10.1128/jb.01329-09
Spittaels, K.-J., Ongena, R., Zouboulis, C.C., Crabbé, A., Coenye, T., 2020. Cutibacterium acnes Phylotype I and II Strains Interact Differently With Human Skin Cells. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.575164
Spittaels, K.-J., van Uytfanghe, K., Zouboulis, C.C., Stove, C., Crabbé, A., Coenye, T., 2021. Porphyrins produced by acneic *Cutibacterium acnes* strains activate the inflammasome by inducing K+ leakage. iScience 24, 102575. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102575
Staudinger, T., Pipal, A., Redl, B., 2011. Molecular analysis of the prevalent microbiota of human male and female forehead skin compared to forearm skin and the influence of make-up. Journal of Applied Microbiology 110, 1381–1389. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04991.x
Steinhoff, M., Ständer, S., Seeliger, S., Ansel, J.C., Schmelz, M., Luger, T., 2003. Modern Aspects of Cutaneous Neurogenic Inflammation. Archives of Dermatology 139, 1479–1488. https://doi.org/10.1001/archderm.139.11.1479

Steinhoff, M.S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., Bunnett, N.W., 2014. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. Physiological Reviews 94, 265–301. https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2013

Strosberg, A.D., 1993. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. Protein Science 2, 1198–1209. https://doi.org/10.1002/pro.5560020802

Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., 1988. A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature 332, 78–81. https://doi.org/10.1038/332078a0

Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., 1990. C-Type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. Biochemical and Biophysical Research Communications 168, 863–870. https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92401-K

Suekane, A., Saito, Y., Nakahata, S., Ichikawa, T., Ogoh, H., Tsujikawa, K., Morishita, K., 2019. CGRP-CRLR/RAMP1 signal is important for stress-induced hematopoiesis. Sci Rep 9, 429. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36796-0

Suh, D.H., Eun, H.C., 1995. The Effect of Calcitonin Gene-Related Peptide on Hair Growth in Vitro. Ann Dermatol 7, 308. https://doi.org/10.5021/ad.1995.7.4.308

Suihko, M. -L., Stackebrandt, E., 2003. Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibres. Journal of Applied Microbiology 94, 25–34. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01803.x

Sun, H., Dodick, D.W., Silberstein, S., Goadsby, P.J., Reuter, U., Ashina, M., Saper, J., Cady, R., Chon, Y., Dietrich, J., Lenz, R., 2016. Safety and efficacy of AMG 334 for prevention of episodic migraine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. The Lancet Neurology 15, 382–390. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00019-3

Swe, P.M., Heng, N.C.K., Ting, Y.-T., Baird, H.J., Carne, A., Tauch, A., Tagg, J.R., Jack, R.W., 2007. ef1097 and ypkK encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. Microbiology 153, 3218–3227. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010777-0

Tachdjian, G., Brisset, S., Courtot, A.-M., Schoëvaërt, D., Tosca, L.B.T., 2016. Chapitre 6 - Peau et annexes cutanées, in : Embryologie et Histologie Humaines. Elsevier Masson, Paris, 121–142. doi:https://doi.org/10.1016/B978-2-294 73779-4.00006-8

Tainio, H., Vaalasti, A., Rechardt, L., 1987. The distribution of substance P-, CGRP-, galanin- and ANP-like immunoreactive nerves in human sweat glands. Histochem J 19, 375–380. https://doi.org/10.1007/BF01680455

Tamari, M., Heul, A.M.V., Kim, B.S., 2021. Immunosensation: Neuroimmune Cross Talk in the Skin. Annual Review of Immunology 39, 369–393. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101719-113805

Tareq, F.S., Lee, H.-S., Lee, Y.-J., Lee, J.S., Shin, H.J., 2015. Ieodoglucomide C and Ieodoglycolipid, New Glycolipids from a Marine-Derived Bacterium Bacillus licheniformis 09IDYM23. Lipids 50, 513–519. https://doi.org/10.1007/s11745-015-4014-z

Tennoune, N., Chan, P., Breton, J., Legrand, R., Chabane, Y.N., Akkermann, K., Järv, A., Ouelaa, W., Takagi, K., Ghouzali, I., Francois, M., Lucas, N., Bole-Feysot, C., Pestel-Caron, M., do Rego, J.-C., Vaudry, D., Harro, J., Dé, E., Déchelotte, P., Fetissov, S.O., 2014. Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide α-MSH, at the origin of eating disorders. Transl Psychiatry 4, e458–e458. https://doi.org/10.1038/tp.2014.98

Theoharides, T.C., Stewart, J.M., Taracanova, A., Conti, P., Zouboulis, C.C., 2016. Neuroendocrinology of the skin. Rev Endocr Metab Disord 17, 287–294. https://doi.org/10.1007/s11154-016-9369-9

Tilakaratne, N., Christopoulos, G., Zumpe, E.T., Foord, S.M., Sexton, P.M., 2000. Amylin Receptor Phenotypes Derived from Human Calcitonin Receptor/RAMP Coexpression Exhibit

Pharmacological Differences Dependent on Receptor Isoform and Host Cell Environment1. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 294, 61–72. https://doi.org/10.1016/S0022-3565(24)39040-8

Tjabringa, G.S., Rabe, K.F., Hiemstra, P.S., 2005. The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung. Pulm Pharmacol Ther 18, 321–327. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2005.01.001

Toda, M., Suzuki, T., Hosono, K., Kurihara, Y., Kurihara, H., Hayashi, I., Kitasato, H., Hoka, S., Majima, M., 2008. Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. Biomedicine & Pharmacotherapy 62, 352–359. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.02.003

Toubal, A., Nel, I., Lotersztajn, S., Lehuen, A., 2019. Mucosal-associated invariant T cells and disease. Nat Rev Immunol 19, 643–657. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0191-y

Toulouse, C., Schmucker, S., Metesch, K., Pfannstiel, J., Michel, B., Starke, I., Möller, H.M., Stefanski, V., Steuber, J., 2019. Mechanism and impact of catecholamine conversion by *Vibrio cholerae*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1860, 478–487. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2019.04.003

Toyoda, M., Luo, Y., Makino, T., Matsui, C., Morohashi, M., 1999. Calcitonin Gene-Related Peptide Upregulates Melanogenesis and Enhances Melanocyte Dendricity via Induction of Keratinocyte-Derived Melanotrophic Factors. Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 4, 116–125. https://doi.org/10.1038/sj.jidsp.5640194

Tozzo, P., D'Angiolella, G., Brun, P., Castagliuolo, I., Gino, S., Caenazzo, L., 2020. Skin Microbiome Analysis for Forensic Human Identification: What Do We Know So Far? Microorganisms 8, 873. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060873

Trier, A.M., Mack, M.R., Kim, B.S., 2019. The Neuroimmune Axis in Skin Sensation, Inflammation, and Immunity. The Journal of Immunology 202, 2829–2835. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801473

Truccollo, B., Whyte, P., Bolton, D.J., 2020. An Investigation of the Effect of Catecholamines and Glucocorticoids on the Growth and Pathogenicity of Campylobacter jejuni. Pathogens 9, 555. https://doi.org/10.3390/pathogens9070555

Twarog, C., 2017. Particules Janus pour des applications industrielles: stabilités et incorporation de principes actifs.

Van Dongen, R.M., Zielman, R., Noga, M., Dekkers, O.M., Hankemeier, T., van den Maagdenberg, A.M., Terwindt, G.M., Ferrari, M.D., 2017. Migraine biomarkers in cerebrospinal fluid: A systematic review and meta-analysis. Cephalalgia 37, 49–63. https://doi.org/10.1177/0333102415625614

Van rossum, D., Hanisch, U.-K., Quirion, R., 1997. Neuroanatomical Localization, Pharmacological Characterization and Functions of CGRP, Related Peptides and Their Receptors. Neuroscience & Biobehavioral Reviews 21, 649–678. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00023-1

Venus, M., Waterman, J., McNab, I., 2010. Basic physiology of the skin. Surgery (Oxford), Orthopaedic surgery: lower limb 28, 469–472. https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.07.011

Veron, W., Lesouhaitier, O., Pennanec, X., Rehel, K., Leroux, P., Orange, N., Feuilloley, M.G.J., 2007. Natriuretic peptides affect Pseudomonas aeruginosa and specifically modify lipopolysaccharide biosynthesis. The FEBS Journal 274, 5852–5864. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06109.x

Veron, W., Orange, N., Feuilloley, M.G., Lesouhaitier, O., 2008. Natriuretic peptides modify Pseudomonas fluorescens cytotoxicity by regulating cyclic nucleotides and modifying LPS structure. BMC Microbiol 8, 114. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-114

Vidali, S., Knuever, J., Lerchner, J., Giesen, M., Bíró, T., Klinger, M., Kofler, B., Funk, W., Poeggeler, B., Paus, R., 2014. Hypothalamic–Pituitary–Thyroid Axis Hormones Stimulate

Mitochondrial Function and Biogenesis in Human Hair Follicles. Journal of Investigative Dermatology 134, 33–42. https://doi.org/10.1038/jid.2013.286

Vijaya Chandra, S.H., Srinivas, R., Dawson, T.L., Common, J.E., 2020. Cutaneous Malassezia: Commensal, Pathogen, or Protector? Front Cell Infect Microbiol 10, 614446. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.614446

Visser, M.J.E., Kell, D.B., Pretorius, E., 2019. Bacterial Dysbiosis and Translocation in Psoriasis Vulgaris. Front Cell Infect Microbiol 9, 7. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00007

Vörös, A., Horváth, B., Hunyadkürti, J., McDowell, A., Barnard, E., Patrick, S., Nagy, I., 2012. Complete Genome Sequences of Three Propionibacterium acnes Isolates from the Type IA2 Cluster. Journal of Bacteriology 194, 1621–1622. https://doi.org/10.1128/jb.06758-11

Vorregaard, M., n.d. Comstat2 - a modern 3D image analysis environment for biofilms.

Vouldoukis, I., Shai, Y., Nicolas, P., Mor, A., 1996. Broad spectrum antibiotic activity of skin-PYY. FEBS Letters 380, 237–240. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00050-6

Wadhwa, P.D., Culhane, J.F., Rauh, V., Barve, S.S., 2001. Stress and Preterm Birth: Neuroendocrine, Immune/Inflammatory, and Vascular Mechanisms. Matern Child Health J 5, 119–125. https://doi.org/10.1023/A:1011353216619

Walker, A.M., Robertson, M.T., Jones, C.J., 1989. Distribution of a Prolactinlike Material in Human Eccrine Sweat Glands. Journal of Investigative Dermatology 93, 50–53. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12277346

Walter, S., Rademacher, F., Kobinger, N., Simanski, M., Gläser, R., Harder, J., 2017. RNase 7 participates in cutaneous innate control of Corynebacterium amycolatum. Sci Rep 7, 13862. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14383-z

Wang, G., Sweren, E., Liu, H., Wier, E., Alphonse, M.P., Chen, R., Islam, N., Li, A., Xue, Y., Chen, J., Park, S., Chen, Y., Lee, S., Wang, Y., Wang, S., Archer, N.K., Andrews, W., Kane, M.A., Dare, E., Reddy, S.K., Hu, Z., Grice, E.A., Miller, L.S., Garza, L.A., 2021. Bacteria induce skin regeneration via IL-1β signaling. Cell Host & Microbe 29, 777-791.e6. https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.003

Wang, H., Xing, L., Li, W., Hou, L., Guo, J., Wang, X., 2002. Production and secretion of calcitonin gene-related peptide from human lymphocytes. Journal of Neuroimmunology 130, 155–162. https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00221-7

Wang, Q., Cui, S., Zhou, L., He, K., Song, L., Liang, H., He, C., 2019. Effect of cosmetic chemical preservatives on resident flora isolated from healthy facial skin. Journal of Cosmetic Dermatology 18, 652–658. https://doi.org/10.1111/jocd.12822

Wang, Y., Kuo, S., Shu, M., Yu, J., Huang, S., Dai, A., Two, A., Gallo, R.L., Huang, C.-M., 2014. Staphylococcus epidermidis in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of Propionibacterium acnes: implications of probiotics in acne vulgaris. Appl Microbiol Biotechnol 98, 411–424. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5394-8

Wang, Z., He, Z., Beauchemin, K.A., Tang, S., Zhou, C., Han, X., Wang, M., Kang, J., Odongo, N.E., Tan, Z., 2016. Comparison of two live acillus species as feed additives for improving in vitro fermentation of cereal straws. Animal Science Journal 87, 27–36. https://doi.org/10.1111/asj.12346

Watanabe, R., Gehad, A., Yang, C., Scott, L.L., Teague, J.E., Schlapbach, C., Elco, C.P., Huang, V., Matos, T.R., Kupper, T.S., Clark, R.A., 2015. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. Science Translational Medicine 7, 279ra39-279ra39. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010302

Watkins, H.A., Rathbone, D.L., Barwell, J., Hay, D.L., Poyner, D.R., 2013. Structure-activity relationships for α-calcitonin gene-related peptide: CGRP structure-activity relationship. Br J Pharmacol 170, 1308–1322. https://doi.org/10.1111/bph.12072

Wei, X., Zhou, Y., Chen, J., Cai, D., Wang, D., Qi, G., Chen, S., 2015. Efficient expression of nattokinase in Bacillus licheniformis: host strain construction and signal peptide

optimization. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 42, 287–295. https://doi.org/10.1007/s10295-014-1559-4

Weigert Muñoz, A., Hoyer, E., Schumacher, K., Grognot, M., Taute, K.M., Hacker, S.M., Sieber, S.A., Jung, K., 2022. Eukaryotic catecholamine hormones influence the chemotactic control of Vibrio campbellii by binding to the coupling protein CheW. Proceedings of the National Academy of Sciences 119, e2118227119. https://doi.org/10.1073/pnas.2118227119

Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLOS Computational Biology 13, e1005595. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595

William Tank, A., Lee Wong, D., 2014. Peripheral and Central Effects of Circulating Catecholamines, in: Comprehensive Physiology. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–15. https://doi.org/10.1002/cphy.c140007

Williams, M.R., Costa, S.K., Zaramela, L.S., Khalil, S., Todd, D.A., Winter, H.L., Sanford, J.A., O'Neill, A.M., Liggins, M.C., Nakatsuji, T., Cech, N.B., Cheung, A.L., Zengler, K., Horswill, A.R., Gallo, R.L., 2019. Quorum sensing between bacterial species on the skin protects against epidermal injury in atopic dermatitis. Sci Transl Med 11, eaat8329. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat8329

Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J.-C., Wong, J.K., 2016. The dynamic anatomy and patterning of skin. Experimental Dermatology 25, 92–98. https://doi.org/10.1111/exd.12832

Wright, M.H., Fetzer, C., Sieber, S.A., 2017. Chemical Probes Unravel an Antimicrobial Defense Response Triggered by Binding of the Human Opioid Dynorphin to a Bacterial Sensor Kinase. J. Am. Chem. Soc. 139, 6152–6159. https://doi.org/10.1021/jacs.7b01072

Wu, G., Zhao, H., Li, C., Rajapakse, M.P., Wong, W.C., Xu, J., Saunders, C.W., Reeder, N.L., Reilman, R.A., Scheynius, A., Sun, S., Billmyre, B.R., Li, W., Averette, A.F., Mieczkowski, P., Heitman, J., Theelen, B., Schröder, M.S., Sessions, P.F.D., Butler, G., Maurer-Stroh, S., Boekhout, T., Nagarajan, N., Jr, T.L.D., 2015. Genus-Wide Comparative Genomics of Malassezia Delineates Its Phylogeny, Physiology, and Niche Adaptation on Human Skin. PLOS Genetics 11, e1005614. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005614

Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J.E., Patel, N., Musch, M.W., Chang, E.B., Fu, Y.-X., Jacobs, M.A., Nishimura, M.I., Hancock, R.E.W., Turner, J.R., Alverdy, J.C., 2005. Recognition of Host Immune Activation by Pseudomonas aeruginosa. Science 309, 774–777. https://doi.org/10.1126/science.1112422

Xia, X., Li, Z., Liu, K., Wu, Y., Jiang, D., Lai, Y., 2016. Staphylococcal LTA-Induced miR-143 Inhibits *Propionibacterium acnes*-Mediated Inflammatory Response in Skin. Journal of Investigative Dermatology 136, 621–630. https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.12.024

Xu, F., Wu, C., Guo, F., Cui, G., Zeng, X., Yang, B., Lin, J., 2015. Transcriptomic analysis of Campylobacter jejuni NCTC 11168 in response to epinephrine and norepinephrine. Front. Microbiol. 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00452

Xu, H., Timares, L., Elmets, C.A., 2019. 19 - Host Defenses in Skin, in: Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Schroeder, H.W., Frew, A.J., Weyand, C.M. (Eds.), Clinical Immunology (Fifth Edition). Elsevier, London, pp. 273-283.e1. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00019-3

Yamashima, T., 2003. Jokichi Takamine (1854–1922), The Samurai Chemist, and His Work on Adrenalin. J Med Biogr 11, 95–102. https://doi.org/10.1177/096777200301100211

Yamashita, K., Kaneko, H., Yamamoto, S., Konagaya, T., Kusugami, K., Mitsuma, T., 1998. Inhibitory effect of somatostatin on Helicobacter pylori proliferation in vitro. Gastroenterology 115, 1123–1130. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70083-6

Yang, C.-C., Sheu, H.-M., Chung, P.-L., Chang, C.-H., Tsai, Y.-S., Hughes, M.W., Tuan, T.-L., Huang, L.L.H., 2015. Leptin of dermal adipose tissue is differentially expressed during the hair cycle and contributes to adipocyte-mediated growth inhibition of anagen-phase vibrissa hair. Experimental Dermatology 24, 57–60. https://doi.org/10.1111/exd.12566

Yang, D., Jacobson, A., Meerschaert, K.A., Sifakis, J.J., Wu, M., Chen, X., Yang, T., Zhou, Y., Anekal, P.V., Rucker, R.A., Sharma, D., Sontheimer-Phelps, A., Wu, G.S., Deng, L., Anderson, M.D., Choi, S., Neel, D., Lee, N., Kasper, D.L., Jabri, B., Huh, J.R., Johansson, M., Thiagarajah, J.R., Riesenfeld, S.J., Chiu, I.M., 2022. Nociceptor neurons direct goblet cells via a CGRP-RAMP1 axis to drive mucus production and gut barrier protection. Cell 185, 4190-4205.e25. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.024

Yang, Q., Anh, N.D.Q., Bossier, P., Defoirdt, T., 2014. Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of Vibrio harveyi. Front. Microbiol. 5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00584

Yang, Q., Zou, P., Cao, Z., Wang, Q., Fu, S., Xie, G., Huang, J., 2021. QseC Inhibition as a Novel Antivirulence Strategy for the Prevention of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)-Causing Vibrio parahaemolyticus. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.594652

Yang, Y., Huang, J., Zeng, A., Long, X., Yu, N., Wang, X., 2024. The role of the skin microbiome in wound healing. Burns Trauma 12, tkad059. https://doi.org/10.1093/burnst/tkad059

Yasin, M., El-Mehdawi, A.F., Pilon-Smits, E.A.H., Faisal, M., 2015. Selenium-Fortified Wheat: Potential of Microbes for Biofortification of Selenium and Other Essential Nutrients. International Journal of Phytoremediation 17, 777–786. https://doi.org/10.1080/15226514.2014.987372

Yeak, K.Y.C., Perko, M., Staring, G., Fernandez-Ciruelos, B.M., Wells, J.M., Abee, T., Wells-Bennik, M.H.J., 2022. Lichenysin Production by Bacillus licheniformis Food Isolates and Toxicity to Human Cells. Front. Microbiol. 13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.831033

Ying, S., Zeng, D.-N., Chi, L., Tan, Y., Galzote, C., Cardona, C., Lax, S., Gilbert, J., Quan, Z.-X., 2015. The Influence of Age and Gender on Skin-Associated Microbial Communities in Urban and Rural Human Populations. PLoS One 10, e0141842. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141842

Yokoi, K., Harada, Y., Shozen, K.-I., Satomi, M., Taketo, A., Kodaira, K.-I., 2011. Characterization of the histidine decarboxylase gene of *Staphylococcus epidermidis* TYH1 coded on the staphylococcal cassette chromosome. Gene 477, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.01.003

Yu, X.-J., Li, C.-Y., Wang, K.-Y., Dai, H.-Y., 2006. Calcitonin gene-related peptide regulates the expression of vascular endothelial growth factor in human HaCaT keratinocytes by activation of ERK1/2 MAPK. Regulatory Peptides 137, 134–139. https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.07.001

Yu, X.-J., Li, C.-Y., Xu, Y.-H., Chen, L.-M., Zhou, C.-L., 2009. Calcitonin gene-related peptide increases proliferation of human HaCaT keratinocytes by activation of MAP kinases. Cell Biology International 33, 1144–1148. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2009.07.003

Yuki, T., Yoshida, H., Akazawa, Y., Komiya, A., Sugiyama, Y., Inoue, S., 2011. Activation of TLR2 Enhances Tight Junction Barrier in Epidermal Keratinocytes. The Journal of Immunology 187, 3230–3237. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100058

Yuste, J.R., Franco, S.E., Sanders, C., Cruz, S., Fernández-Rivero, M.E., Mora, G., 2016. Bacillus licheniformis as a cause of a deep skin abscess in a 5-year-old girl: An exceptional case following a plant thorn injury. J Microbiol Immunol Infect 49, 819–821. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.08.031

Zaborina, O., Lepine, F., Xiao, G., Valuckaite, V., Chen, Y., Li, T., Ciancio, M., Zaborin, A., Petroff, E., Turner, J.R., Rahme, L.G., Chang, E., Alverdy, J.C., 2007. Dynorphin Activates Quorum

Sensing Quinolone Signaling in Pseudomonas aeruginosa. PLOS Pathogens 3, e35. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030035

Zhang, M., Jiang, Z., Li, D., Jiang, D., Wu, Y., Ren, H., Peng, H., Lai, Y., 2015. Oral Antibiotic Treatment Induces Skin Microbiota Dysbiosis and Influences Wound Healing. Microb Ecol 69, 415–421. https://doi.org/10.1007/s00248-014-0504-4

Zhang, X., Zhuang, J., Wu, H., Chen, Z., Su, J., Chen, S., Chen, J., 2010. Inhibitory Effects of Calcitonin Gene-Related Peptides on Experimental Vein Graft Disease. The Annals of Thoracic Surgery 90, 117–123. https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2010.03.063

Zhang, Z., Winborn, C.S., Prado, B.M. de, Russo, A.F., 2007. Sensitization of Calcitonin Gene-Related Peptide Receptors by Receptor Activity-Modifying Protein-1 in the Trigeminal Ganglion. J. Neurosci. 27, 2693–2703. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4542-06.2007

Zhu, T., Liu, X., Kong, F.-Q., Duan, Y.-Y., Yee, A.L., Kim, M., Galzote, C., Gilbert, J.A., Quan, Z.-X., 2019. Age and Mothers: Potent Influences of Children's Skin Microbiota. J Invest Dermatol 139, 2497-2505.e6. https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.05.018

Zieglgänsberger, W., 2019. Substance P and pain chronicity. Cell Tissue Res 375, 227–241. https://doi.org/10.1007/s00441-018-2922-y

Zipperer, A., Konnerth, M.C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., Burian, M., Schilling, N.A., Slavetinsky, C., Marschal, M., Willmann, M., Kalbacher, H., Schittek, B., Brötz-Oesterhelt, H., Grond, S., Peschel, A., Krismer, B., 2016. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. Nature 535, 511–516. https://doi.org/10.1038/nature18634

Zmijewski, M.A., Slominski, A.T., 2011. Neuroendocrinology of the skin. Dermato-Endocrinology. https://doi.org/10.4161/derm.3.1.14617

ANNEXE : CURRICULUM VITAE



EMILIE HADJIEV

Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche au Laboratoire Communication Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses (UR4312 CBSA URN), travaillant sur l'interaction neurohormones et bactéries du microbiote cutané.

hadjiev.emilie@gmail.com

06.02.26.50.79

78 avenue Charles de Gaulle
56100 Lorient

www.linkedin.com/in/emilie-hadjiev

FORMATION

2020-2025 Doctorat en Microbiologie
Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement
Université de Rouen Normandie

- Mention Sciences de la Vie et de la Santé.

2022-2023 DNM2IP
Diplôme Numérique des Maladies Infectieuses de l'Institut Pasteur

- Formations en ligne certifiées, en anglais, sur la plateforme FUN MOOC : Innate Immunity (8 semaines), Emerging and Re-Emerging Viruses (8 semaines), Vaccinology (8 semaines), Malaria (32 jours), Tuberculosis (9 semaines).

2018-2020 Master Sciences Technologies Santé
Université de Bretagne Occidentale

- Mention Microbiologie, parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée.

2015-2018 Licence Sciences Technologies Santé
Université de Bretagne Sud

- Mention Sciences de la Vie et de la Terre, parcours Biotechnologies.

EXPÉRIENCES

2023-2025 Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche
IUT Evreux, Université de Rouen Normandie
Laboratoire Communication Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses
UR4312 CBSA URN, Axe "Communication dans le Microbiote Humain"

- 192 h d'enseignements équivalents TD par année universitaire.
- Département Génie Biologique, 1ère, 2ème et 3ème année de BUT, options "Biologie Médicale et Biotechnologies" (BMB), "Sciences de l'Aliment et Biotechnologies" (SAB), "Diététique et Nutrition" (DN).
- Enseignements en Biochimie, Immunologie, Biologie Cellulaire, Anatomie/Physiologie Humaine et Microbiologie Alimentaire :
  - Responsabilité de ressource, participation aux commissions enseignement.
  - Préparation des cours magistraux, des travaux dirigés et des séances de TP.
  - Réalisation des enseignements.
  - Vérification des acquis et correction des comptes-rendus.
  - Surveillance d'examens.

2020-2025 Doctorat en Microbiologie | CBSA
Laboratoire Communication Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses
UR4312 CBSA URN, Axe "Communication dans le Microbiote Humain"

- Sujet : Impact du Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sur le potentiel inflammatoire des microorganismes associés aux épithéliums de surface.
- Thèse effectuée sous la direction du Pr. Marc Feuilloley.
- **Mots clés** : Endocrinologie microbienne, microbiote cutané, CGRP, biofilm, cytotoxicité, inflammation.
- Encadrement d'un stage de Master 2 (6 mois) et d'un stage d'observation de Seconde (2 semaines).

2019-2020 Stage de Master 2 | CBSA
Laboratoire Communication Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses
UR4312 CBSA URN, Axe "Communication dans le Microbiote Humain"
06/01/2020 - 26/06/2020

- Sujet : Etude de la protéine DnaK en tant que système senseur du microbiote cutané.
- Stage effectué sous la direction du Dr. Yoan Konto-Ghiorghi.
- **Mots clés** : Protéine recombinante, biofilm, MicroScale Thermophoresis.

COMPÉTENCES PROFESSIONNELLES

Techniques

- **Microbiologie** : Culture bactérienne (aérobiose et anaérobiose), identification bactérienne (microscopique, macroscopique, biochimique), suivi de croissance, formation de biofilm (adhésion, statique, quantification par la technique de Cristal Violet ou coloration au Syto9), tests d'inhibition, étude des profils de résistance aux antibiotiques (dilutions en milieu liquide (CMI) selon l'EUCAST).
- **Biochimie** : Extraction et purification de protéines, Chromatographie d'Affinité avec ions Métalliques Immobilisés (IMAC), Gel Filtration, SDS-Page, MicroScale Thermophoresis (MST), Microbial Adhesion To Solvants (MATS), extraction des protéines du surnageant à l'Acide TriChloroAcétique (TCA).
- **Biologie cellulaire** : Culture de la lignée cellulaire immortalisée HaCaT, quantification de la cytotoxicité (test LDH), test d'adhésion.
- **Immunologie** : Dosage d'interleukine par ELISA, identification bactérienne par Dot Blot, Western Blot.
- **Biologie moléculaire** : Transformation bactérienne, Extraction d'ADN (kit) et d'ARN (kit, phénol-chloroforme), électrophorèse sur gel d'agarose, design d'amorces (Primer3Plus), PCR.
- **Microscopie** : Microscope confocal à balayage laser.
- **Physique** : Mesure de tension interfaciale par la technique de la goutte pendante.

Transversales

- **Veille bibliographique.**
- **Elaboration et mise en oeuvre de protocoles expérimentaux.**
- **Traitement et mise en forme des données expérimentales.**

- **Valorisation des résultats scientifiques** : rédaction de rapports techniques et scientifiques, communications orales et posters.
- **Vulgarisation de données scientifiques.**
- **Respect des règles d'hygiène et de sécurité.**

Linguistique

- **Français** (langue natale)
- **Bulgare** (bilingue)
- **Anglais** (niveau B1-B2)
- **Espagnol** (niveau B1)

Informatique

- **Pack Office** (Word, PowerPoint, Excel)
- **ZEN Microscopy Software** (ZEISS), **Comstat 2**
- Logiciel de gestion de références **Zotero**
- **GraphPad Prism**

RESPONSABILITÉS

2024-2025 Référente ATER au conseil de laboratoire du CBSA

2021-2022 Vice-Trésorière - Association Normandie Doc' (01/2021 - 01/2022)

- Association de doctorants et jeunes docteurs de la région Normandie.

2021-2022 Animatrice Fête de la Science 2021 - Village des Sciences d'Evreux
07/10/2021 - 10/10/2021

2020-2021 Organisatrice d'un congrès scientifique pour doctorants
17/05/2021 - 18/05/2021

- Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement (JED nBISE).

2020-2021 Vice-Présidente - Association NormaDoc (01/2021 - 06/2021)

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Articles, revues et chapitres d'ouvrages

Articles

- **Hadjiev E.B.D.**, Boukerb A.M., Ismail R., Barreau M., Hajem N., Chevalier S., Feuilloley M.G.J. Identification of a scalp associated *Bacillus licheniformis* strain with unexpected Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sensitivity. Research in Microbiology (in preparation).
- **Hadjiev E.**, Boukerb A.M., Ismail R., Barreau M., Hajem N., Chevalier S., Feuilloley M.G.J. Re-evaluating the sensitivity of cutaneous bacteria to Calcitonin Gene-Related Peptide. Microbiology (in preparation).
- Feuilloley M.G.J., **Hadjiev E.**, Amegnona L.J. (2024). Interaction of skin-born mediators with the cutaneous microbiota and beyond. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research, 37:100545. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2024.100545.
- Soree M., Kolypczuk L., **Hadjiev E.**, Lozach S., Verrez-Bagnis V., Delbarre-Ladrat C., Hervio Heath D., Passerini D. (2023). Screening of marine lactic acid bacteria for *Vibrio parahaemolyticus* inhibition and application to depuration in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Journal of Applied Microbiology , 134(2), 1-9. doi: 10.1093/jambio/lxac081.

Chapitres d'ouvrages scientifiques

- Ismail R., Catovic C., **Hadjiev E.**, Amegnona L.J., Bohuon V., David A., Boukerb A., Chevalier S., Duclairoir-Poc C., Feuilloley M.G.J. Microbiote cutané et pigmentation. In "Biologie Cutanée, CoBiP 2025" Marek Haftek Ed., Editions MatriX, pages XX-XX, 2025 (In press).
- Ismail R., Boukerb A.M., Catovic C., **Hadjiev E.**, Amegnona J., Groboillot A., Chevalier S., Feuilloley M. Chapitre X : Le microbiote capillaire, un acteur majeur, sous-estimé, de la santé du cheveu. In « Biologie Capillaire » Rataj V. Ed., Cosmetic Valley Editions (In press).
- **Hadjiev E.**, Souak D., Barreau M., Catovic C., Racine P-J., Alekhova T.A., Konto-Ghiorghi Y., Chevalier S., Lesouhaitier O., Boukerb A., Feuilloley M.G.J. Le microbiote cutané au clair de la lune et des étoiles. In "Biologie Cutanée, CoBiP 2022 " Marek Haftek Ed., Editions MatriX, 31-40.

Communications Orales

- **Hadjiev E.**, Amegnona L.J., Ismail R., Barreau M., Boukerb A., Chevalier S., Feuilloley M.G.J. Skin/microbiota interactions: perspectives of microbial endocrinology for cosmeceuticals. 7th Congress Skin Microbiome and Cosmeceuticals, 28-29 April 2025, La Haye, Netherlands.
- **Hadjiev E.**, Amegnona L.J., Ismail R., Barreau M., Chevalier S., Boukerb A., Feuilloley M.G.J. *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas juntendi*, deux espèces du microbiote capillaire sensibles aux hormones de l'épithélium capillaire. 8ème colloque du GDR Cosm'actifs (GDR 3711), 21-22 novembre 2024, Montpelllier.
- **Hadjiev E.**, Ismail R., Boukerb A.M., Barreau M., Chevalier S., Feuilloley M.G.J. Study of skin immunity and host-microbiota communication: potential role of the Calcitonin Gene-Related Peptide. Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB), 11 juin 2024, Rouen.
- Amegnona L.J., Ismail R., **Hadjiev E.**, Barreau M., Chevalier S., Boukerb A., Feuilloley M.G.J. Substance P: Impact in the physiology of *Pseudomonas* genus bacteria. Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRB), 11 juin 2024, Rouen.
- Amegnona L.J., Ismail R., **Hadjiev E.**, Barreau M., Chevalier S., Boukerb A., Feuilloley M.G.J. Substance P, modulatrice de la physiologie des bactéries du genre *Pseudomonas* ? Rencontres Normandes de Microbiologie, 21 mai 2024, Rouen.
- **Hadjiev E.**, Ismail R., Boukerb A.M., Catovic C., Barreau M., Chevalier S., Feuilloley M.G.J. Study of skin immunity and microbiota communication: potential role of the Calcitonin Gene-Related Peptide. Microbiology Society Annual Conference 2024, 8-11 April 2024, Edinburgh, Scotland.
- **Hadjiev E.**, Amegnona J., Catovic C., Ismail R., Souak D., Groboillot A., Chevalier S., Boukerb A.M., Feuilloley M.G.J. The cutaneous microbiota, a skin integrated component essential in protection, reparation and immunity. SFC International Symposium 2023, 5-6 décembre 2023, Paris.
- **Hadjiev E.**, Ismail R., Catovic C., Barreau M., Chevalier S., Feuilloley M.G.J. Étude du rôle potentiel du Calcitonin Gene-Related Peptide dans l'interaction peau/microbiote. 7ème Colloque du GDR CNRS 3711 Cosm'Actifs, 15-16 novembre 2023, Evreux.
- Amegnona L.J., Ismail R., **Hadjiev E.**, Barreau M., Chevalier S., Boukerb A., Feuilloley M.G.J. Effets de la Substance P sur la physiologie des bactéries du genre *Pseudomonas*. 7ème Colloque du GDR CNRS 3711 Cosm'Actifs, 15-16 novembre 2023, Evreux.
- Amegnona L.J., Ismail R., **Hadjiev E.**, Barreau M., Chevalier S., Boukerb A., Feuilloley M.G.J. Effet de la Substance P sur les bactéries du genre *Pseudomonas*. Colloque *Pseudomonas*, 9-10 octobre 2023, Mittelwihr.

- Ismail R., **Hadjiev E.**, Catovic C., Souak D., Groboillot A., Chevalier S., Alekhova T., Boukerb A.M., Feuilloley M.G.J. Le microbiote cutané : de la peau, aux textiles et à la conquête spatiale. Séminaire de l'Institut Brestois en Santé Agro et Matière (ISBAM), Webinar, 3 octobre 2023.

Communications par Affiches

- Amegnona L.J., Ismail R., **Hadjiev E.**, Barreau M., Chevalier S., Boukerb A., Feuilloley M.G.J. Microbial endocrinology: SP an actor in host-bacteria communication in *Pseudomonas*? Journées de l'Ecole Doctorale nBISE, 24-25 avril 2025, Le Havre.
- **Hadjiev E.**, Ismail R., Catovic C., Barreau M., Konto-Ghiorghi Y., Chevalier S., Feuilloley M.G.J. Study of skin/microbiota interactions: potential role of the Calcitonin Gene-Related Peptide and the chaperone protein DnaK. 18ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), 4-6 octobre 2023, Rennes.

Impact du Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sur le potentiel inflammatoire des microorganismes associés aux épithéliums de surface

Résumé

La peau étant le plus grand organe neuroendocrinien du corps humain, de nombreuses hormones et neurohormones y sont présentes en abondance, exposant ainsi le microbiote cutané aux facteurs de l'hôte. L'Endocrinologie Microbienne étudie, entre autres, la capacité des bactéries à répondre à ces neuropeptides. Dans ce contexte, il a été démontré que le Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) induit une augmentation de la virulence de *Staphylococcus epidermidis* MFP04. Ces travaux de thèse ont donc eu pour but d'explorer davantage les effets de cette molécule en s'intéressant notamment à *Bacillus licheniformis* MIC004, une souche isolée du cuir chevelu. Il apparaît, au premier abord, que celle-ci semble insensible à la présence de CGRP et ne montre aucune modification de ses paramètres physiologiques ou de sa virulence. Cependant, une étude transcriptomique sur la lignée cellulaire HaCaT a démontré un intéressant potentiel inflammatoire chez cette bactérie, même sans exposition à la molécule. A cela vient s'ajouter une éventuelle altération de l'intégrité de la monocouche de kératinocytes, après infection des cellules avec *B. licheniformis* prétraitée au CGRP. D'autres microorganismes commensaux, tels que *Staphylococcus capitis* MFP08, *Pseudomonas fluorescens* MFP05, *Micrococcus luteus* MFP06 et *Cutibacterium acnes* RT4 516 et RT6 554, ne montrent peu ou pas de sensibilité au neuropeptide. Ces travaux ont permis d'approfondir les connaissances sur ce domaine d'étude complexe, à l'interface entre la physiologie humaine et la microbiologie, et laissent place à d'autres pistes qui restent encore à explorer concernant l'impact des hormones humaines sur les microorganismes.

Mots clés : Endocrinologie microbienne, CGRP, microbiote cutané, communication hôte – bactéries.

Abstract

The skin being considered as the largest neuroendocrine organ of the human body, hormones and neurohormones are abundant and constantly expose the skin microbiota to host factors. Microbial Endocrinology studies the ability of bacteria to respond to these neuropeptides. In this context, it has been shown that the Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) induces an increase in the virulence of *Staphylococcus epidermidis* MFP04. Therefore, this research work focused on investigating other potential effects of this molecule, focusing at first on *Bacillus licheniformis* MIC004, a strain isolated from the scalp. At first, it appears that this strain does not respond to the presence of CGRP and shows no change in its physiology or virulence. However, a transcriptomic study performed on the HaCaT keratinocyte cell line demonstrated an interesting inflammatory potential for this bacterium, even without exposure to the molecule. In addition, it appears that there might be an alteration in the integrity of the keratinocyte monolayer after infection of the cells with *B. licheniformis* pretreated with CGRP. Other commensal microorganisms, such as *Staphylococcus capitis* MFP08, *Pseudomonas fluorescens* MFP05, *Micrococcus luteus* MFP06 and *Cutibacterium acnes* RT4 516 and RT6 554, show little to no response to the neuropeptide. This research work has deepened our understanding of this complex field of study, at the interface between human physiology and microbiology, and gives way to other possibilities for further exploration of the impact of human hormones on microorganisms.

Keywords: Microbial Endocrinology, CGRP, cutaneous microbiota, host – bacteria communication.