



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة مننوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

### Département de Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biologie moléculaire des microorganismes*

#### Thème :

---

## *La Teixobactine: une nouvelle classe d'antibiotiques et une solution prometteuse pour l'antibiorésistance.*

---

Présenté et soutenu par : KHAINNAR AbdelHakim

Le : 22/09/2021

DIB Halla Ouissem

#### Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. Hamidechi A. (Professeur - UFM Constantine1).

Rapporteur : M<sup>me</sup> Sekhri-Arafa N. (MCA - UFM Constantine1).

Examineurs : Boulahrouf K. (MCB - UFM Constantine1).

Année universitaire

2020 - 2021



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine I  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

## Département de Microbiologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biologie moléculaire des microorganismes*

Thème :

---

# *La Teixobactine: une nouvelle classe d'antibiotiques et une solution prometteuse pour l'antibiorésistance.*

---

Présenté et soutenu par : **KHAINNAR AbdelHakim**

Le : 22/09/2021

**DIB Halla Ouissem**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mr. Hamidechi A. (Professeur - UFM Constantine1).

**Rapporteur :** M<sup>me</sup> Sekhri-Arafa N. (MCA - UFM Constantine1).

**Examineurs :** Boulahrouf K. (MCB - UFM Constantine1).

Année universitaire

2020 - 2021

## Remerciements

*Au nom de DIEU clément et miséricordieux, le plus grand merci lui revient de nous avoir guidé vers le droit chemin et de nous avoir aidé tout le long de nos études.*

*Nous voulons tout d'abord exprimer nos remerciements les plus sincères et nos respects les plus profonds qui s'adressent particulièrement à notre professeur Dr. Sekhri Nedjoua qui nous a soutenu, encouragé, et transmis tout son savoir pendant ces trois dernières années, et d'avoir été toujours présente durant la réalisation de notre mémoire.*

*Nous voulons également exprimer notre profonde reconnaissance au Dr. Alena Charvátová, pour nous avoir offert l'opportunité de réaliser la partie importante de notre mémoire. Nous avons pu bénéficier de ses précieux conseils, de son sens critique et de sa rigueur dans le travail.*

*Et un grand merci à Mme Kerrad Maroua pour l'aide et le soutien qu'elle nous a présenté tout au long de ses derniers mois, et toute l'équipe du laboratoire de bactériologie du centre hospitalier universitaire (CHU).*

*Nous remercions également le professeur Hamidechi Abdelhafid qui nous fait l'immense plaisir et honneur en acceptant de présider notre jury. Nous remercions également le Dr. Boulahrouf Khaled de nous avoir consacré du temps afin d'examiner notre travail*

# *Dédicaces:*

*Je dédie ce mémoire à:*

*Maman chérie, la lumière de ma vie.*

*Mon cher père, mon inspiration et mon idole.*

*Mes chers frères : Abdenacer, Abdelhadi, Med El-Amine et ma sœur Zaineb pour leurs encouragements, leur présence et leur soutien.*

*A mon petit neveu Waïl et ma petite Salsabil.*

*A mes chères amies : Dina, Houda, Amira et à mon binôme et partenaire Halla avec qui j'ai partagé de très belles années.*

*Je vous aime.*

*Abdelhakim.*

# *Dédicaces:*

*Je dédie ce travail à :*

*Ma raison de vivre ma mère, quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*Mon cher père qui est mon ami très proche et qui a été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que ce travail traduit mon gratitude et mon affection.*

*Particulièrement à ma jolie grande mère Fatima, ceci est ma gratitude pour ton éternel amour.*

*Mes frères Aymen, Abdelmouiz et ma petite sœur Maya, ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.*

*Mon ami et binôme Abdelhakim pour son appui et son encouragement.*

*Mes meilleures amies Khadidja et Rayane.*

*Merci pour tout.*

*Halla Ouïssem.*

*„ Le bonheur est parfois  
caché dans l'inconnu.. ”*  
*Victor Hugo*

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Chapitre 1: Les antibiotiques</b> .....	03
1. Définition .....	03
2. La découverte des antibiotiques .....	03
3. Méthodes actuelles de développement d'antibiotiques .....	03
4. Les principales classes et familles d'antibiotiques .....	04
5. Les critères d'efficacité d'un antibiotique .....	06
6. Le mode d'action des antibiotiques .....	06
6.1. Les antibiotiques agissant sur la paroi .....	06
6.2. Les antibiotiques actifs sur la membrane .....	06
6.3. Les antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines .....	07
6.4. les antibiotiques actifs sur la synthèse des acides nucléiques .....	07
7. Les effets secondaires des antibiotiques .....	07
<b>Chapitre 2: L'antibiorésistance</b> .....	08
1. Définition .....	08
2. Causes actuelle / anthropique .....	08
3. Types de résistance .....	09
3.1. Résistance innée ou naturelle .....	09
3.2. Résistance acquise .....	09
4. Mécanismes de résistance .....	10
4.1. Modification de la cible .....	10
4.2. Inactivation de l'antibiotique .....	10
4.3. Diminution de la quantité d'antibiotique .....	10
4.4. Autre mécanisme « l'altruisme » .....	10
5. Les BMR ou bactéries multi-résistantes .....	10

5.1 Définition de bactéries multi-résistantes (BMR) .....	10
5.2 Principales bactéries multi-résistantes (BMR) .....	11
5.2.1 Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) .....	11
5.2.2 Les PAR ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multirésistants .....	11
5.2.3 Les entérocoques: <i>Enterococcus faecium</i> vancomycine-résistant ou ERV : .....	12
5.2.4 PSDP, Pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline .....	12
5.2.5 SARM ( <i>Staphylococcus aureus</i> méticilline-résistant) et VRSA ( <i>Staphylococcus aureus</i> vancomycine-résistant) .....	12
5.3. Les « Superbactéries » .....	13
6. La solution de l'antibiorésistance: .....	14
<b>Chapitre 3: <i>Eleftheria terrae</i></b> .....	15
1. Définition .....	15
2. Historique et Découverte .....	15
2.1. Puce d'isolement - Isolation chip (iChip) .....	16
3. Caractéristiques générales .....	17
3.1. Le bouillon de fermentation R4 .....	17
4. Phylogénie .....	17
5. Génomique .....	19
6. Profil de résistance et activité antibactérienne .....	20
6.1. Profil de résistance .....	20
6.2. L'activité antibactérienne .....	21
<b>Chapitre 4: La Teixobactine</b> .....	22
1. Définition .....	22
2. Découverte .....	22
3. Propriétés moléculaire et physicochimiques .....	23
3.1 Biosynthèse .....	23



3.2 Propriétés Structurales / Physicochimiques .....	24
4. Activité antibactérienne .....	25
4.1. Mécanisme d'action .....	25
4.2. Spectre d'activité .....	26
4.3. Induction de résistance .....	28
5. La synthèse de la Teixobactine .....	29
<b>Chapitre 5: Méthodologie d'étude de la souche productrice de l'ATB .....</b>	<b>30</b>
1. Isolement et culture des souches productrices .....	30
2. Préparation d'extraits et dépistage de l'activité .....	30
3. Séquençage et Identification des souches .....	31
4. Augmentation de la biomasse par fermentation et purification de la Teixobactine.....	31
5. Concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	32
6. Concentration bactéricide minimale (MBC) .....	33
7. Etudes de résistance .....	33
8. Cytotoxicité chez les mammifères .....	33
9. Tests d'antagonisation .....	34
10. Formation complexe de Teixobactine .....	34
11. Test d'inhibition hERG .....	35
12. Génotoxicité in vitro .....	35
13. Liaison à l'ADN .....	35
14. Liaison aux protéines plasmatiques .....	35
15. Études animales .....	36
16. Modèle de protection contre la septicémie de la souris .....	36
17. Modèle d'infection pulmonaire de souris .....	36

<b>Chapitre 6: Production de la Teixobactine et proposition d'une nouvelle méthode de synthèse.....</b>	<b>37</b>
1. Avantages de la Teixobactine .....	37
2. Biosynthèse de la Teixobactine .....	37
• Les difficultés rencontrées lors de sa production .....	37
3. La solution au problème de biosynthèse .....	38
3.1. Notre Proposition .....	38
3.2. Définition du clonage .....	39
3.3. Les étapes du clonage .....	39
3.4. Quelques notes importantes sur le gène à cloner .....	39
4. les études préliminaires de la procédure .....	40
4.1. L'isolement de l'opéron de l'expression biosynthétique de la Teixobactine.....	41
• La découverte de l'enzyme de restriction appropriée .....	41
4.1.1. Définition des enzymes de restriction .....	41
4.1.2. Les critères de choix de l'enzyme .....	41
4.1.3. Le choix de l'enzyme appropriée .....	41
4.2. Le choix du vecteur approprié pour l'insert .....	42
4.2.1. Critères de choix .....	43
4.2.2. le vecteur cosmide navette pHZ1358 .....	43
4.2.3. La taille des fragments à insérer .....	44
4.2.4. Les sites polylinker .....	44
4.3. La sélection de la cellule hôte appropriée .....	47
4.3.1. Le choix de la cellule hôte .....	47
4.3.2. Caractéristiques et avantages d' <i>E.coli</i> comme hôte .....	48
4.4. La méthode proposée pour la production industrielle de la Teixobactine .....	49
• Remarque .....	51

<b>Protocole proposé pour la méthode du clonage:</b> .....	52
1. Isolement et purification de l'ADN d' <i>E. terrae</i> .....	53
• Matériel / Réactifs .....	53
• Procédure .....	53
2. Digestion par l'enzyme de restriction .....	54
• Matériel .....	54
• Réactifs .....	54
2.1 Digestion de l'ADN d' <i>E. terrae</i> .....	54
2.2 Digestion du cosmide pHZ1358 .....	55
3. Électrophorèse sur gel d'agarose .....	55
• Matériel / Réactifs .....	55
3.1 Chargement des échantillons d'ADN et l'utilisation du gel d'agarose .....	56
3.2 L'analyse du gel .....	56
3.3 Purification du Gel .....	56
3.4 Nettoyage des fragments d'ADN de gel .....	57
4. Ligation insert-vecteur .....	57
5. La transduction génétique .....	57
• Matériel .....	57
• Réactifs .....	58
• Procédure .....	58
6. Détection des cellules qui contiennent le gène d'intérêt .....	58
7. Conservation de la souche bactérienne productrice .....	59
7.1. Composition du milieu .....	59
7.2. Protocole .....	59
8. Production à l'échelle industrielle .....	60

<b>Discussion</b> .....	62
<b>Conclusion</b> .....	64
<b>Références bibliographiques</b> .....	65
<b>Annexes</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> dessin représentatif des composants et la fonction d'une Ichip .....	16
<b>Figure 02:</b> observation microscopique d' <i>Eleftheria terrae</i> .....	17
<b>Figure 03:</b> la position phylogénétique d' <i>E. terrae</i> au sein de la classe $\beta$ -protéobactéries .....	18
<b>Figure 04:</b> la position phylogénétique d' <i>E. terrae</i> parmi ses plus proches parents connus .....	19
<b>Figure 05:</b> les deux gènes NRPs (non ribosomal peptides), les domaines catalytiques qu'ils codent et les acides aminés incorporés par les modules respectifs. ....	23
<b>Figure 06:</b> structure chimique de la Teixobactine .....	24
<b>Figure 07:</b> structure chimique tridimensionnelle de la Teixobactine .....	24
<b>Figure 08:</b> une étude comparative de la lyse de <i>S. aureus</i> induite par la Teixobactine et d'autres antibiotiques puissants .....	27
<b>Figure 09:</b> capture d'écran de la page web de GenBank qui montre le groupe de gènes biosynthétiques de la Teixobactine .....	40
<b>Figure 10:</b> plan explicatif des différences entre les cosmides et les autres vecteurs. ....	44
<b>Figure 11:</b> La carte génétique du cosmide pHZ1358 .....	46
<b>Figure 12:</b> schéma représentatif de la production des produits pharmaceutiques à l'aide de fermenteurs .....	50
<b>Figure 13:</b> schéma du processus de la production de la Teixobactine par fermentation .....	60
<b>Figure 14:</b> schéma de fabrication de comprimés contraceptifs pour administration par voie orale .....	61

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> la classification taxonomique d' <i>E.terrae</i> .....	18
<b>Tableau 02:</b> les principaux gènes qui ont été déterminés dans le génome d' <i>E. terrae</i> . .....	20
<b>Tableau 03:</b> l'activité de la Teixobactine contre les micro-organismes pathogènes .....	28
<b>Tableau 04:</b> différents milieux utilisés pour la culture de divers micro-organismes pathogènes .....	32

## Liste des abréviations

ASHP: The American Society of Health-System Pharmacist.

ATB: Antibiotique.

BLSE: Bêta Lactamase à Spectre Etendu

BMR: Bactérie Multi-Résistante.

BHRE: Bactérie Hautement Résistante émergente.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

C<sub>max</sub>: Concentration plasmatique au pic.

C<sub>min</sub>: Concentration résiduelle.

CMB: Concentration Minimale Bactéricide

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CYP : Les enzymes du cytochrome.

DO: Densité optique.

LC-MS-MS : La chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem.

NAG: N-acétyl-glucosamine.

NAM: acide N-acétyl-muramique.

PLP: Protéines de liaison aux Pénicillines.

PSDP: Pneumocoque de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline.

RED: Dialyse à équilibre rapide.

SARM: *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

SAMS: *Staphylococcus aureus* Méthicilline-Sensible.

VISA : Vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*.

VRE: Entérocoque Vancomycine Résistant.

## Résumé

La Teixobactine est un nouvel antibiotique récemment découvert qui est produit par une bactérie à Gram négatif nommée *Eleftheria terrae*, un type de micro-organisme du sol non cultivé qui a été isolé avec un nouvel outil, l'iChip, qui permet l'isolement et la culture de la bactérie de type VNC.

La Teixobactine est efficace contre les bactéries à Gram-positif (mais pas à Gram-négatif) et les mycobactéries en utilisant un nouveau mode d'action qui inhibe la biosynthèse du peptidoglycane. Les recherches *in vitro* actuelles ont montré qu'aucune résistance n'a été développée contre la Teixobactine par les souches résistantes de *Staphylococcus aureus* ou de *Mycobacterium tuberculosis*. L'utilisation de la Teixobactine a été totalement efficace dans les infections expérimentales de souris en réduisant la charge bactérienne des BMR, ce qui en fait un candidat prometteur pour créer une solution à la menace d'antibiorésistance.

Même si la Teixobactine est encore à un stade précoce de développement et qu'elle rencontre encore quelques difficultés avec sa production, elle peut néanmoins contribuer en tant que modèle de recherche pour découvrir des molécules similaires.

De plus, ce travail est une tentative de proposer une nouvelle façon de résoudre le problème de la production d'antibiotiques à partir de bactéries de type VNC par la méthode du clonage, ça peut être un grand pas pour découvrir de nouvelles molécules qui peuvent être une solution à la menace d'infections résistantes.

**Mots clés:** Teixobactine, *Eleftheria terrae*, Antibiorésistance, BMR, iChip, bactéries VNC, Biosynthèse de la Teixobactine, antibiotiques, clonage



## Summary

Teixobactin is a newly discovered antibiotic that is produced by a Gram-negative bacteria called *Eleftheria terrae*, a type of uncultivated soil microorganism that has been isolated with a new tool, the iChip, which allows isolation and the culture of the VNC type bacteria.

Teixobactin is effective against Gram-positive (but not Gram-negative) bacteria and mycobacteria using a novel mode of action which inhibits peptidoglycan biosynthesis. Current in vitro research has shown that no resistance has been developed against Teixobactin by resistant strains of *Staphylococcus aureus* or *Mycobacterium tuberculosis*. and the use of Teixobactin was fully effective in experimental infections of mice by reducing the bacterial load of BMRs, making it a promising candidate for creating a solution to the threat of antibiotic resistance.

Even though Teixobactin is still at an early stage of development and still has some difficulties with its production, it can nonetheless contribute as a research model to discover similar molecules.

Moreover, this work is an attempt to propose a new way to solve the problem of the production of antibiotics from VNC-type bacteria by the method of cloning, it can be a big step to discover new molecules that can be a solution to the threat of resistant infections.

**Keywords:** Teixobactin, *Eleftheria terrae*, Antibiotic resistance, BMR, iChip, VBNC, Teixobactin biosynthesis, antibiotics, cloning

## Zusammenfassung

Teixobactin ist ein neu entdecktes Antibiotikum, das von einem gramnegativen Bakterium namens *Eleftheria terrae* produziert wird, einer Art unkultivierter Bodenmikroorganismen, die mit einem neuen Werkzeug, dem iChip, isoliert wurde, der die Isolierung und Kultivierung von Bakterien des VNC-Typs ermöglicht.

Teixobactin ist wirksam gegen Gram-positive (aber nicht Gram-negative) Bakterien und Mykobakterien mit einem neuartigen Wirkmechanismus, der die Peptidoglycan-Biosynthese hemmt. Aktuelle In-vitro-Forschungen haben gezeigt, dass keine Resistenz gegen Teixobactin durch resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* oder *Mycobacterium tuberculosis* entwickelt wurde, und die Verwendung von Teixobactin war bei experimentellen Infektionen von Mäusen voll wirksam, indem es die bakterielle Belastung von BMRs reduzierte, was es zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung einer Lösung für die Bedrohung durch Antibiotikaresistenz macht.

Auch wenn sich Teixobactin noch in einem frühen Entwicklungsstadium befindet und noch einige Schwierigkeiten bei seiner Herstellung hat, kann es dennoch als Forschungsmodell dazu beitragen, ähnliche Moleküle zu entdecken.

Darüber hinaus ist diese Arbeit ein Versuch, einen neuen Weg zur Lösung des Problems der Herstellung von Antibiotika aus Bakterien vom VNC-Typ durch die Klonierungsmethode vorzuschlagen. Es kann ein großer Schritt sein, neue Moleküle zu entdecken, die eine Lösung für die Bedrohung sein können von resistenten Infektionen.

**Schlüsselwörter:** Teixobactin, *Eleftheria terrae*, Antibiotikaresistenz, BMR, iChip, VBNC, Teixobactin-Biosynthese, Antibiotika, Klonen

## ملخص

تيكسوباكنتين هو مضاد حيوي تم اكتشافه حديثاً، يتم إنتاجه بواسطة بكتيريا سالبة الجرام تسمى *البيفثريا تيرا* ، وهي نوع من الكائنات الحية الدقيقة الآتية من التربة و الغير قابلة للزراعة، قد تم عزلها بأداة جديدة تدعى بالـ 'الأي شيب'، والتي تسمح بعزل زراعة البكتيريا من هذا النوع.

تيكسوباكنتين فعال ضد البكتيريا موجبة الجرام (و ليس سالبة الجرام) والميكوبكتيريا باستخدام طريقة عمل جديدة تمنع التخليق الحيوي للبيبتيدوغليكان. أظهرت الأبحاث الحالية في المختبر أنه لم يتم تطوير أي مقاومة ضد التيكسوباكنتين بواسطة سلالات مقاومة من ميكوباكتريوم *تريبازكيلوزيس* أو *ستافيلوكوكيس اوربوس*. وكان استخدام تيكسوباكنتين فعالاً تمامًا في العدوى التجريبية للفئران عن طريق تقليل الحمل البكتيري لمعدلات الأبيض الأساسي ، مما يجعله مرشحاً واعدًا لإيجاد حل لتهديد مقاومة المضادات الحيوية. على الرغم من أن تيكسوباكنتين لا يزال في مرحلة مبكرة من التطور ولا يزال يواجه بعض الصعوبات في إنتاجه ، إلا أنه يمكن أن يساهم كنموذج بحث لاكتشاف جزيئات مماثلة.

علاوة على ذلك ، فإن هذا العمل هو محاولة لاقتراح طريقة جديدة لحل مشكلة إنتاج المضادات الحيوية من البكتيريا من النوع غير القابل للزراعة، وذلك عن طريق عملية الاستنساخ ، و التي يمكن أن تكون خطوة كبيرة لاكتشاف جزيئات جديدة التي من الممكن أن تكون حلاً لمقاومة المضادات الحيوية.

**الكلمات المفتاحية:** تيكسوباكنتين، *البيفثريا تيرا* ، مقاومة المضادات الحيوية، الأي شيب، بكتيريا مقاومة، بكتيريا غير قابلة للزراعة،

تخليق تيكسوباكنتين الحيوي، المضادات الحيوية، الاستنساخ

## Introduction:

Niché dans nos corps, nos vêtements, nos maisons et tous les autres écosystèmes, les microorganismes sont tout simplement partout. Ils représentent une partie essentielle du monde vivant et ont une grande influence dans nos vies. Jouant le rôle d'une pièce de monnaie double face, les microbes peuvent être à la fois bénéfiques et fatals à l'humanité. En parlant de leur côté dangereux, des maladies infectieuses dues aux microbes de potentiel pathogène élevé restent toujours une menace constante pour la santé humaine et animale. L'un des plus grands exemples est la grippe espagnole en 1918 qui a tué des millions de vies dans la guerre mondiale, la tuberculose, la nasopharyngite, l'angine à streptocoque, l'hépatite B et la pneumonie ... mais d'un autre coté, les microorganismes peuvent être en même temps la solution pour ces menaces, c'est notamment l'exemple de l'antibiothérapie grâce à leur capacité de synthétiser des agents antibiotiques (Cushnie, 2020).

Depuis la découverte de la pénicilline par Fleming en 1928, les microorganismes des trois domaines: les bactéries, les archaeobactéries et les eucaryotes sont exploités pour les productions des antibiotiques afin de lutter contre l'effet néfaste des agents pathogènes, et ils ont vraiment aidé à sauver des millions de vie depuis. Mais peu importe un antibiotique peut être puissant, le sujet de l'antibiorésistance reste toujours inévitable, car les micro-organismes trouveront toujours un moyen pour créer une résistance contre eux. Les études montrent que chaque année, 700 000 personnes dans le monde meurent à cause de l'antibiorésistance, si les tendances se confirment dans les années à venir, ce nombre pourrait atteindre 10 millions de décès dans le monde en 2050 chaque année. Les infections résistantes feraient alors plus de morts que le cancer (8,2 millions) (de Kraker *et al.*, 2016).

Ces chiffres nécessitent des découvertes constantes de nouveaux agents antibiotiques pour limiter l'antibiorésistance, plus que nous pouvons découvrir des nouveaux antibiotiques, mieux que ça sera la possibilité de réduire l'effet de cette résistance, mais ce processus est lent en raison de la méthode classique utilisée pour découvrir de nouveaux ATB, qui n'est limité que sur des ressources de bactéries cultivables, ces dernières représentent seulement 1% des bactéries totales découvertes jusqu'à présent. Bien que des bactéries non- cultivables représentent environ 99% de toutes les espèces dans les environnements externes et représentent une source inexploitée de nouveaux antibiotiques. Malheureusement, de telles bactéries sont extrêmement exigeantes et nécessitent des conditions de croissance stricte ce

qui rend leur culture dans des milieux de laboratoire ordinaires (*In vitro*) extrêmement difficile (Lechaudee, 2010).

Mais le concept de tous les points précédents a été complètement reconsidéré après la récente découverte révolutionnaire d'une nouvelle bactérie non-cultivable par un groupe de scientifiques à l'université de Boston, aux États-Unis, tout en utilisant une nouvelle procédure élégante qui permet l'isolement de ce type de bactéries. En 2015, le groupe de recherche du Dr Ling avec la collaboration d'autres scientifiques ont annoncé une découverte d'une nouvelle espèce bactérienne à Gram négatif appelée *Eleftheria terrae* qui a été rapporté pour produire une nouvelle molécule appelée la Teixobactine, un nouvel antibiotique efficace sur les bactéries multirésistantes sans effet secondaire et dont aucune résistance bactérienne n'a pu être mise en évidence contre lui pour le moment. C'est un mécanisme rare qui en fait l'antibiotique le plus puissant de notre époque. Les études sur cette antibiotique sont encore en phase de développement et ils rencontrent encore quelques difficultés avec la phase de production, mais c'est inévitable de dire que cette découverte peut être une solution prometteuse pour la menace d'antibiorésistance et l'utilisation de cette nouvelle molécule aidera à sauver des millions de vies à l'avenir, et contribuera également en tant que modèle de recherche qui peut être utilisé comme référence pour découvrir de nouvelles molécules similaires (Ling *et al.*, 2015).

Dans cette optique nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- 1/ Faire une synthèse bibliographique sur la Teixobactine et la bactérie *Eleftheria terrae*.
- 2/ Proposition d'un protocole d'usage futur d'une nouvelle méthode pour l'isolement et la synthèse de la Teixobactine.

## Chapitre 1: Les antibiotiques

### 1. Définition :

Un antibiotique est une substance chimique, organique, naturelle, qui peut être synthétique ou semi-synthétique, leurs rôle consiste à détruire ou bloquer la croissance des bactéries pathogènes à faible concentration. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique (Bryskier, 2005). Le terme antibiotique lui-même vient du grec: «bios» qui signifie la vie et «anti» qui signifie contre. Le rôle d'un antibiotique vient de son nom: c'est donc littéralement «agir contre la vie» (Vuillemin, 1890).

Un grand nombre des antibiotiques existants sont constitués de molécules naturelles, fabriquées par des micro-organismes : des champignons ou d'autres bactéries. Ces dernières les produisent pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles elles sont en compétition dans leur biotope (Bryskier, 2005).

### 2. La découverte des antibiotiques :

En 1887, le Français Ernest Duchesne fut le premier à remarquer le pouvoir antibactérien des moisissures mais sa découverte n'eut pas de suite. La découverte « officielle » de la pénicilline tient du hasard en effet; en 1928, Sir Alexander Fleming, qui cultivait des *staphylocoques* sur des boîtes de Pétri, a observé une inhibition de la croissance de ces bactéries sur des boîtes contaminées par un champignon, le *Penicillium*. Il émet alors l'hypothèse que ce champignon est capable de synthétiser une substance aux propriétés antibactériennes, qu'il nomme « pénicilline ».

Dès lors, la pénicilline a été massivement utilisée, et a permis de sauver des millions de vie. Par la suite, de nombreuses autres molécules antibiotiques ont été découvertes conduisant à l'essor de cette classe thérapeutique, permettant de traiter nombre d'infections jusqu'à lors considérées comme mortelles (Bovet, 1988).

### 3. Méthodes actuelles de développement d'antibiotiques :

Cette section se concentre sur les stratégies actuelles bien testées pour la sélection de composés antibiotiques à partir de sources naturelles et non naturelles et de modification des classes existantes.

- Les méthodes actuelles sont concentrées sur la sélection des composés produits par des micro-organismes à multiplication logarithmiques. Par exemple, des composés naturels, comme la pénicilline, ont été découverts par observation scientifique des *pénicillium* ou en recherchant de tels composés. Ces composés naturels ont fourni des structures de base, que les chimistes ont utilisées pour produire des analogues, tels que l'amoxicilline (analogue de la pénicilline) (Coates et Hu, 2006).
- La voie analogique a été très fructueuse pour le développement de nouveaux antibiotiques, et continue de l'être. De nouveaux composés ont également été développés à partir de la voie chimique non naturelle, par exemple le prontosil, le métronidazole et les quinolones (Coates et Hu, 2002).
- La voie génomique s'est avérée riche en cibles ; Le criblage de collections de composés avec des enzymes ou des cellules entières, comme la régulation négative de la cible par l'ARN antisens, mais n'ont pas encore conduit à un antibiotique commercialisé (Coates et Hu, 2006).
- Les bactéries non cultivables peuvent être une source alternative de nouveaux antibiotiques. À ce jour, les antibiotiques commercialisés tels que la streptomycine proviennent de bactéries qui se développent sur des milieux artificiels solides ou liquides. Cependant, la plupart des espèces de bactéries ne poussent pas sur des milieux artificiels. Les antibiotiques commercialisés n'ont pas été isolés de bactéries non cultivables, car la croissance sur milieu solide a été une étape essentielle dans le développement des antibiotiques. **Désormais, il est possible de cloner de grands fragments de génomes bactériens non cultivables et de les exprimer à l'aide de la technologie de l'ADN recombinant** (Coates et Hu, 2006).

#### 4. Les principales classes et familles d'antibiotiques :

Il existe cinq classes principales d'antibiotiques, certaines sont divisées en sous-classes :

- Les bêta-lactamines comprenant les pénicillines des groupes G/V, M, A, les Carboxypénicillines, les Uréidopénicillines et les Amidinopénicillines, les Carbapénèmes, un Monobactam et les Céphalosporines.
- Les Aminosides.
- Les Macrolides et apparentés.
- Les quinolones et fluoroquinolones.
- Les cyclines.

Ces classes se différencient par :

- Leur spectre d'activité qui signifie l'ensemble des microorganismes sensibles à chaque classe d'antibiotiques.
- Leurs indications, liées directement au spectre d'activité et à la diffusion de l'antibiotique dans les différents organes : par exemple, certains antibiotiques se concentrent dans les urines et sont notamment utilisés en cas d'infection urinaire.
- Leur voie d'utilisation : on peut prendre les antibiotiques par voie orale, sauf les aminosides car ils peuvent être détruits dans l'intestin. On retrouve notamment des antibiotiques dans des solutions auriculaires ou nasales, des collyres et des pommades.
- Leurs contre-indications.
- Leur mode d'emploi et leur fréquence d'utilisation.
- Leurs effets indésirables : parmi les effets ennuyants pouvant caractériser certaines familles d'antibiotique on peut citer : la réaction allergique, diarrhée, photosensibilisation, tendinite, toxicité rénale. L'apparition d'un effet indésirable grave limite l'utilisation postérieure des médicaments reliés à la même famille (Gilbert et co, 2013).

En dehors de ces cinq classes on retrouve aussi les *glycopeptides* ou *lipoglycopeptides* (vancomycine, teicoplanine, dalbavancine), la *fosfomycine*, un lipopeptide (*daptomycine*), les *polymyxines*, les *phénicolés*, l'*acide fusidique*, les *oxazolidinones*, les *quinoléines*, la *mupirocine*, les *sulfamides* et *triméthoprime*, les produits nitrés et les *antituberculeux*.

Le spectre d'activité antibactérien regroupe l'ensemble des bactéries sur lesquelles l'antibiotique est habituellement actif. Leurs indications sont liées au spectre d'activité et aux caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Ces paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques conditionnent leur mode d'emploi et leur fréquence d'utilisation. Par exemple il existe pour certaines infections des traitements monodoses (Gilbert et co, 2013).



### 5. Les critères d'efficacité d'un antibiotique :

Le choix de l'antibiotique à utiliser repose sur plusieurs critères :

- ◆ qu'il possède un mode d'action qui lui permette d'agir sur cette bactérie
- ◆ qu'il parvienne là où est la bactérie et à des concentrations suffisamment élevées
- ◆ qu'il y reste le temps suffisant pour lui permettre soit de la détruire, c'est ce que l'on appelle la bactéricidie soit d'en arrêter la multiplication, c'est la bactériostase.
- ◆ que son utilisation ne causera aucune toxicité pour le corps du patient (Perozziello *et al.*, 2017).

### 6. Le mode d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant une ou des étapes essentielle(s) de leur développement comme : la synthèse de leur ADN, des protéines, de la paroi, ou la production d'énergie... Ce mécanisme de blocage s'aboutit lorsque l'antibiotique s'attache sur sa cible qui est représentée sous forme d'une molécule de la bactérie qui participe à l'un de ces processus métaboliques essentiels (Gilbert et co, 2013).

#### 6.1. Les antibiotiques agissant sur la paroi :

Parmi les mécanismes d'action, on retrouve les antibiotiques agissant sur la paroi :

- **Les bêta lactamines** : s'attachent sur les (PLPs); des protéines qui lient la pénicilline (Ruppé, 2013).
- **Les glycopeptides** : entraînent aussi l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane (Bertrand, 2015).
- **-La fosfomycine** : agit sur une enzyme précurseur du peptidoglycane (phase cytoplasmique) (Sanschagrín, 2003).

#### 6.2. Les antibiotiques actifs sur la membrane :

- **La daptomycine** : elle crée une dépolarisation rapide par fuite de potassium en s'intégrant progressivement à la membrane (Gaubé, 2015).
- **La colistine** : ce polypeptide cationique agit sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Werth, 2020).

### 6.3. Les antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines :

- Les aminosides.
- Les macrolides.
- Les cyclines et les tigécyclines.
- Le linézolide.

### 6.4. les antibiotiques actifs sur la synthèse des acides nucléiques:

- **La rifampicine** : bloque l'ARN polymérase qui participe à la transcription de l'ADN en ARN (Limosin, 2004).

- **Sulfamides-triméthoprimes** : agissent eux en amont de la synthèse des acides nucléiques (Reitz *et al.*, 2009).

### 7. Les effets secondaires des antibiotiques :

Ces dernières années, il y a eu de plus en plus de preuves que les antibiotiques, en addition de leur action antimicrobienne, ont potentiellement un certain nombre d'effets secondaires indésirables qui peuvent, au moins dans certains cas, favoriser la variabilité génétique des bactéries. Il a également été démontré que les antibiotiques stimulent l'évolution vers une résistance supplémentaire en sélectionnant les clones mutateurs. En outre, les mutations, la recombinaison et le transfert horizontal de gènes sont en quelque sorte affectés lorsque les bactéries sont exposées à des concentrations sous-inhibitrices de certains antibiotiques. Ces résultats peuvent avoir des implications pour l'utilisation d'antibiotiques, car ils peuvent avoir des effets secondaires indésirables, lesquels sont :

- La toxicité.
- Des manifestations pulmonaires.
- Des manifestations rénales.
- Des manifestations neurologiques.
- Des manifestations hématologiques.
- Des manifestations hépatiques.
- Des allergies.
- Au niveau du système digestif.
- Cancer.
- Obésité.

## **Chapitre 2: L'antibiorésistance**

### **1. Définition:**

L'antibiorésistance ou bien la résistance aux antibiotiques c'est le cas où des germes comme les bactéries et les champignons développent une capacité à échapper aux mécanismes des médicaments conçus pour les tuer. Cela signifie que les microbes ne sont pas tués et continuent de croître. C'est donc lorsque les bactéries sont devenues insensibles aux antibiotiques que l'on parle de résistance (WHO, 2020).

Une infection produite par des agents pathogènes résistants aux antibiotiques est considérée comme un cas très dangereux, car elle est difficile et parfois impossible à traiter. Dans la plupart des cas, lorsqu'un patient est confronté à des infections résistantes aux antibiotiques, cela exige des séjours prolongés à l'hôpital, des visites de suivi supplémentaires chez le médecin et des alternatives coûteuses et toxiques (WHO, 2020).

### **2. Causes actuelles / anthropique:**

L'antibiorésistance est un caractère inné et naturel pour certains germes, mais pour la plupart des autres c'est un caractère induit. La cause principale de l'acquisition de cette résistance est l'utilisation excessive d'antibiotiques dans les différents domaines, ce qui permettra aux germes de s'y habituer et éventuellement de développer une résistance contre eux (Goossens, 2009). Parmi les domaines qui ont contribué à l'antibiorésistance, on peut citer:

- L'utilisation excessive des ATB comme médicament chez l'Homme (Acar et Moulin, 2012).
- L'utilisation massive d'ATB comme des médicaments vétérinaires et/ou adjuvants alimentaires dits préventifs (Economou et Gousia, 2015).
- L'utilisation massive en plein air dans l'agriculture et l'horticulture (Almakki, 2019).
- L'utilisation inappropriée de biocides chimiquement proche d'antibiotiques (Goossens, 2009).

L'utilisation excessive des ATB n'est pas la seule cause, la dispersion des souches microbiennes résistantes est favorisée par le transport des aliments, des biens, personnes ou animaux qui représentent des vecteurs porteurs de ces souches (Acar et Moulin, 2012).

### 3. Types de résistance:

La résistance existe sous deux formes: une résistance naturelle et une résistance acquise.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel pour certaines bactéries, elles sont résistantes à des antibiotiques de manière innée et spontanée, c'est le cas de la résistance naturelle qui constitue également un marqueur d'identification de la bactérie.

D'autres échappent à l'action d'antibiotiques auxquels elles étaient jusqu'alors sensibles par des modifications génétiques: c'est le cas de résistance acquise qui constitue un marqueur épidémiologique (WHO, 2020).

#### 3.1. Résistance innée ou naturelle

Lorsque toutes les souches d'une même espèce bactérienne sont résistantes à un antibiotique donné, on parle alors d'une antibiorésistance naturelle, le génome de ces souches les rend insensibles à certaines familles d'antibiotiques et elles transmettent ces résistances à leur descendance, c'est donc un caractère d'espèce (Drancourt, 2016).

Le caractère de la résistance naturelle est stable dans le génome, et il est transmis à la descendance, mais elle n'est pas ou peu transmissible d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes.

Exemple de résistance naturelle :

- Le bacille de la tuberculose qui n'est sensible qu'à quelques antibiotiques bien précis.
- *K. pneumoniae* est naturellement résistante aux pénicillines (amoxicilline, ticarcilline).
- *S. pneumoniae* résistante aux quinolones et certaines fluoroquinolones (lévofloxacine et moxifloxacine).
- les bactéries anaérobies qui possèdent une résistance naturelle aux aminosides (Drancourt, 2016).

#### 3.2. Résistance acquise

Lorsqu'une ou plusieurs souches d'une espèce bactérienne qui est naturellement sensible à un antibiotique y deviennent résistantes, On parle d'une antibiorésistance acquise. Cette résistance est caractérisée par l'apparition d'une insensibilité envers un ou plusieurs antibiotiques chez certaines bactéries qui en était à l'origine sensibles.

La résistance acquise résulte grâce à des mécanismes qui touchent l'ADN bactérien, ces mécanismes sont caractérisés par des mutations ou des transferts de gènes résistants à partir d'une bactérie résistante vers une bactérie sensible.

Ce mécanisme est le plus fréquent et le plus préoccupant car il peut simultanément concerner plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques.

Lorsqu'une souche bactérienne peut acquérir les mécanismes de résistance, mutation ou acquisition de gènes, on parle alors de multi résistance. Les BMR ou les bactéries multi résistantes, résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques et les bactéries pan-résistantes sont celles qui conduisent à des difficultés thérapeutiques (Cavallo, 2015).

### **4. Mécanismes de résistance**

Plusieurs mécanismes peuvent résulter la résistance aux antibiotiques: modification de la cible de l'antibiotique, production d'une enzyme modifiant ou détruisant l'ATB, qui rends la membrane de la bactérie imperméable... Tous ces mécanismes peuvent être isolés ou associés et c'est dans ce dernier cas de figure qu'ils vont être difficiles à contourner (Inserm, 2018).

#### **4.1. Modification de la cible**

- Modification qualitative
- Modification quantitative

#### **4.2. Inactivation de l'antibiotique**

#### **4.3. Diminution de la quantité d'antibiotique**

- L'efflux des antibiotiques
- La réduction de la perméabilité membranaire

#### **4.4 Autre mécanisme : « l'altruisme »**

### **5. Les BMR ou bactéries multi-résistantes:**

#### **5.1 Définition de bactéries multi-résistantes (BMR)**

Lorsque les bactéries sont capables d'acquérir de résistances à plusieurs familles d'antibiotiques, elles sont dites BMR, ou bactéries multi-résistantes, elles sont sensibles

uniquement pour peu d'antibiotiques utilisés dans l'antibiothérapie (une résistance pour plus de 3 familles différentes d'ATB) (Meunier, 2015).

## **5.2 Principales bactéries multi-résistantes (BMR)**

Les BMR les plus reconnus en microbiologie (par ordre de fréquence) sont: Les entérobactéries avec les bêta-lactamases à spectre étendu ou élargi (BLSE). *Staphylococcus aureus* méticilline-résistant ou SARM, les entérocoques, *Enterococcus faecium* vancomycine-résistant ou VRE. Dans cette catégorie, il existe un autre acronyme les PSDP ou pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline (Meunier *et al.*, 2015).

### **5.2.1 Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)**

Les BLSE sont une grande famille d'enzymes bactériennes très hétérogène produites par certains microbes ou bactéries qui les rend résistants à certains antibiotiques. Généralement les Entérobactéries (des bacilles à Gram négatif) sont les souches responsables de la sécrétion de ces enzymes et portent le nom de EBLSE ou Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu. Ces bactéries ou microbes se trouvent dans l'intestin de plusieurs personnes, découvertes dans les années 80 en France, puis en Allemagne. Leurs induction a été causée par des plasmides, ou par une mutation du génome naturel (chez *Klebsiella spp*), codant pour une bêta-lactamase SHV. Les bactéries portant ces mécanismes sont capables d'hydrolyser une grande variété de céphalosporines et de pénicillines.

Les bactéries produisant une BLSE ne sont pas efficaces contre les céphamycines (céfoxitine) et les carbapénèmes (imipénem), elles peuvent être inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam et le tazobactam, ces trois derniers sont des inhibiteurs de bêta-lactamases (Vora et Auckenthaler, 2009).

### **5.2.2 Les PAR ou *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants**

Les *Pseudomonas aeruginosa* sont des bactéries à Gram négatif qui représentent 1/10 des bactéries responsables d'infections nosocomiales. Diffusées par le tube digestif et l'oropharynx, ces souches sont naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C, ces pathogènes opportunistes sont impliqués dans des infections, cutanées, urinaires ou respiratoires (Barbier, 2010).

### **5.2.3 Les entérocoques: *Enterococcus faecium* vancomycine-résistant ou ERV :**

Les ERV représentent un groupe des bactéries (des cocci à Gram positif) qui ont développé une résistance aux glycopeptide comme la Vancomycine et la Teicoplanine. La Vancomycine a été considérée comme l'un des ATB les plus puissants, quand elle ne peut plus tuer les entérocoques, cela veut dire que ces bactéries sont devenues multi-résistantes. Cette résistance est dû à une modification de la paroi (peptidoglycane) qui représente la cible d'action des glycopeptides comme la vancomycine. Ce type de bactérie est considéré rebelle et incurable (Cattoir, 2010).

### **5.2.4 PSDP, Pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline**

*Streptococcus pneumoniae*, connu aussi sous le nom de pneumocoque ou streptocoque, est une bactérie à Gram positif qui présente de nombreuses résistances croisées aux antibiotiques. telle que la pénicilline, l'érythromycine, la tétracycline et pour le cotrimoxazole. La résistance des PSDP (Pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline) se produit par une modification quantitative et qualitative des PLP après un transfert génétique, transformation et recombinaison de l'ADN de streptocoques oraux avec l'ADN des pneumocoques. Cette résistance est exprimée selon la bêta-lactamine concernée à des niveaux différents. Les bêta-lactamines les plus efficaces sur les PSDP sont l'amoxicilline, le céfotaxime, la ceftriaxone, et l'imipénèm (Thierry *et al.*, 2000).

### **5.2.5 SARM (*Staphylococcus aureus* méticilline-résistant) et VRSA (*Staphylococcus aureus* vancomycine-résistant)**

*Staphylococcus aureus* résistant représente un groupe de bactéries à Gram-positif qui sont génétiquement différents des autres souches de *Staphylococcus aureus*. Les SARM et les SARV sont des souches pathogènes qui peuvent causer des infections qui sont difficiles à traiter chez l'homme.

Pour lutter contre ces effets, les scientifiques ont développés un nouvel ATB très puissant, un dérivé semi-synthétique issue de la pénicilline; la méticilline (pénicilline M) à peine un an plus tard, après l'introduction de cet ATB, les premières souches hospitalières de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) sont apparues, et le même scénario s'est produit avec la vancomycine qui a conduit à l'apparition des VRSA, *Staphylococcus aureus* vancomycine-résistant (Dumitrescu *et al.*, 2010).

### 5.3 Les « Superbactéries »

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a listé 12 familles de bactéries multi-résistantes contre lesquelles elle juge urgent de développer de nouveaux traitements : ce sont les superbactéries

Parmi ces 12 familles de bactéries on cite:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter baumannii*
- Les Enterobacteriaceae (dont l'*E.coli* et *K. pneumoniae*)
- *Enterococcus faecium*
- Le staphylocoque doré
- Les Salmonelles
- *Helicobacter pylori* (bactérie responsable notamment des ulcères de l'estomac et de cancer)
- Campylobacter
- La *Neisseria gonorrhoeae* (responsable de la gonorrhée)
- Les pneumocoques, qui peuvent conduire à des pneumonies et des méningites.
- l'*Haemophilus influenzae*, responsable d'infections comme les otites.
- *Shigella spp*, responsable des maladies intestinales tel que la dysentérie.

L'OMS reclasse les trois premières bactéries citées en "priorité critique", les six suivants sont classé en tant que "priorité élevée". elles sont responsables d'infections résistantes à plusieurs types d'antibiotiques généralement contractées à l'extérieur de l'hôpital.

Outre ces bactéries multi-résistantes, il est aussi défini des bactéries **hautement résistantes émergentes (BHRe)** ou plus communément appelées **XDR** pour **Extensively Drug Resistant** qui sont des bactéries sensibles à une ou deux classes d'antibiotiques maximum, ce sont donc des bactéries pour lesquels la thérapeutique va s'avérer très restreinte afin d'éviter de transformer ces bactéries en bactéries pandrug-resistant ou PDR c'est-à-dire des bactéries résistantes à toutes les classes d'antibiotiques et pour lesquelles nous n'aurions plus de solutions thérapeutiques à apporter (Pulcini, 2017).



Parmi les BHRé on retrouve :

- le *Mycobacterium tuberculosis*, des bactéries à Gram positif responsables de la tuberculose.
- *Clostridium difficile* qui provoquent une diarrhée et une colite potentiellement mortelles (une inflammation du côlon), principalement chez les personnes qui ont reçu à la fois des soins médicaux récents et des antibiotiques.
- *Enterococcus faecium* résistant aux glycopeptides (ERG). et les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) (Pulcini, 2017).

### 6. La solution à l'antibiorésistance:

Les BMR représentent une menace constante pour notre communauté au quotidien. l'OMS tente en permanence de sensibiliser les populations aux dangers de ces microorganismes, et les scientifiques tentent toujours de trouver une voie alternative pour lutter contre l'effet néfaste de ces micro-organismes.

Seuls quelques antibiotiques peuvent résister à ces germes multi-résistants, quel que soit le nombre d'antibiotiques puissants découverts, ces super-bactéries trouveront toujours un moyen pour créer une résistance contre lui.

Le fait de trouver un antibiotique capable d'éliminer les BMR sans résistance détectable était impossible jusqu'en 2015. parmi tous les antibiotiques découverts, un seul peut réellement éliminer les bactéries pathogènes les plus puissantes sans être détecté, il est connu sous le nom de **Teixobactine**, synthétisée par des bactéries à Gram négatif appelées *Eleftheria terrae* qui peuvent donner au monde l'espoir de se dresser contre ces dangereux microorganismes. (Ling *et al.*, 2015).

## Chapitre 3: *Eleftheria terrae*

### 1. Définition:

*Eleftheria terrae* est le nom temporaire donné pour le microorganisme récemment découvert en 2014 par *L. Ling* et un groupe des scientifiques américains de l'université du nord-est de Boston.

Le terme *Eleftheria* du grec " *ελευθερία*" qui signifie la liberté, et le terme *terrae* ou "*terræ*" ( pluriel de "*terra*" ) un mot latin qui signifie la terre, ensemble ils forment "la terre libre" ou "libre de terre" cela réfère à une bactérie Gram-négative incultivable isolée du sol, qui est encore au cours de développement (*Ling et al.*, 2015).

*Eleftheria terrae* produit un nouvel antibiotique puissant appelé Teixobactine qui reste toujours un objet d'études. Cette découverte pourrait représenter une nouvelle ère d'antibiotiques, car la Teixobactine est le premier nouvel antibiotique découvert depuis l'ère synthétique des années 80 (*Gerard et Wright*, 2015).

Les recherches indiquent que ce type de bactéries incultivables ont le potentiel d'être une source pour créer de nouveaux agents antimicrobiens (*Ling et al.*, 2015).

### 2. Historique et Découverte:

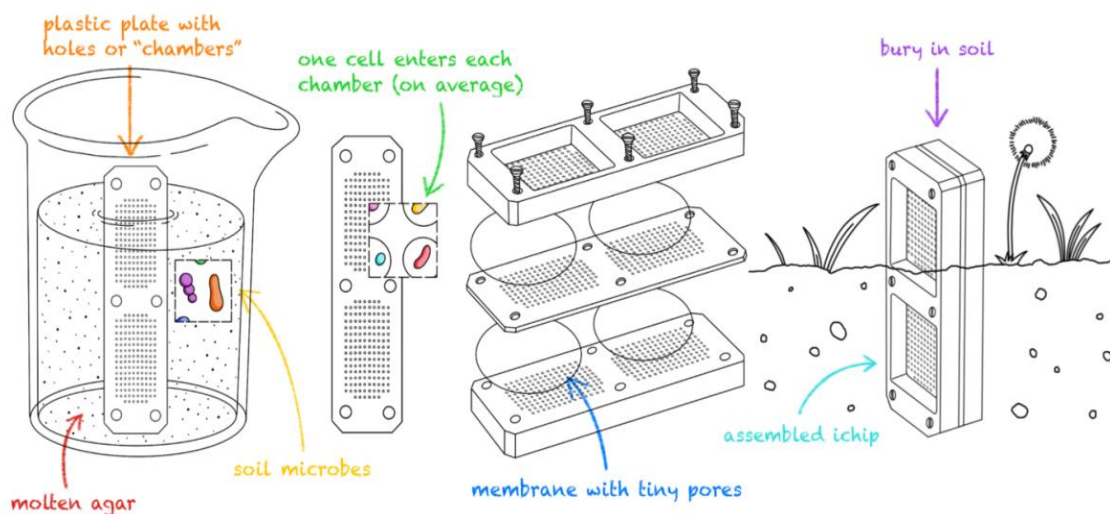
Pour découvrir de nouveaux antibiotiques, les scientifiques utilisent le procédé traditionnel qui consiste à isoler des micro-organismes, bactéries et moisissures d'environnements variés en les cultivant dans des milieux stériles adaptés à leurs besoins nutritifs. La production de substances antibactériennes est ensuite recherchée dans le milieu de culture en évaluant l'inhibition de la croissance de souches pathogènes pour l'homme. C'est le même procédé qui a été utilisé par Alexander Fleming lors de la découverte de la pénicilline (*Arthur*, 2016).

Les microbiologistes environnementaux estiment que moins de 1% des bactéries seulement peuvent être cultivées en laboratoire, ce qui signifie que les 99% restantes présentes dans l'environnement, en particulier dans les sols sont incultivables. Car on ne parvient pas, dans ces conditions, à satisfaire leurs besoins nutritifs qui sont complexes, la culture de tels bactéries nécessitent des moyens très avancés et exigeantes pour être isolées (*Nichols et al.*, 2010).

Nommée par les scientifiques comme une "matière noire microbienne" ou "microbial dark matter", *E. terrae* est une bactérie exceptionnelle cultivée par des méthodes scientifiques émergentes (Ling, 2015). En automne de 2014, Une équipe de Novobiotic Pharmaceuticals dirigée par L. Ling a découvert *Eleftheria terrae* dans un champ à Maine (une ville à Boston) en utilisant une technique développée dans l'université Northeastern de Boston appelée la technique d'iChip ou puce d'isolement: (Annexe 05) un instrument révolutionnaire qui permet d'isoler et cultiver les micro-organismes incultivables . C'est un procédé qui consiste de la mise en culture des bactéries non pas en laboratoire mais dans leur milieu naturel "*in situ*", c'est-à-dire dans le sol où elles ont été prélevées (Servick et Kelly, 2015).

### 2.1. Puce d'isolement - Isolation chip (iChip):

L'iChip est un appareil multicanal qui est utilisé pour cultiver et isoler simultanément des bactéries incultivables. C'est un petit bloc en plastique qui contient 192 trous qui le traversent. Les trous sont remplis d'un milieu de culture qui est ensuite inoculé avec de la terre diluée pour ne déposer qu'une seule bactérie dans chaque trou. Après avoir déposé la bactérie dans les trous, l'iChip est recouverte des deux côtés par une membrane semi-perméable et placée dans une boîte du sol d'origine. Les membranes perméables permettent aux nutriments et aux facteurs de croissance du sol de diffuser et de permettre la croissance d'une seule espèce (Annexe 05). *Ling et coll.*, ont criblé environ 10,000 isolats de croissance iChip pour une activité antimicrobienne potentielle. et *E. terrae* semblait être pleine d'espoir. Cette technologie a le potentiel de découvrir encore plus d'antibiotiques en permettant aux laboratoires de cultiver des micro-organismes auparavant «non cultivables» (Lewis, 2017).



**Figure 01:** Dessin représentatif des composants et la fonction d'une Ichip. (Bumgarner, 2010).

### 3. Caractéristiques générales:

*E. terrae* est une bactérie à Gram négatif, non cultivable qui pousse dans les sols herbeux à Maine, Boston. Une bactérie qui produit un antibiotique très puissant connu sous le nom de Teixobactine.

*E. terrae* se développe et produit une activité antibactérienne dans de nombreuses conditions de croissance différentes, mais de manière optimale dans le bouillon de fermentation R4. Le métabolisme et l'écologie d'*E. terrae* n'ont pas encore été largement documentés (Ling *et al.*, 2015).



**Figure 02:** Observation microscopique d'*Eleftheria terrae* (Snyder, 2016).

#### 3.1. Le bouillon de fermentation R4:

Le bouillon de fermentation R4 est le milieu le plus répondant aux besoins d'*E. terrae*, il se compose de: 10 g de glucose, 1 g d'extrait de levure, 0,1 g d'acides casamino, 3 g de proline, 10 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 4 g de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,2 g de  $K_2SO_4$ , 5,6 g d'acide libre TES (Tampon) par litre de  $H_2O$  désionisée à pH 7 (Ling *et al.*, 2015).

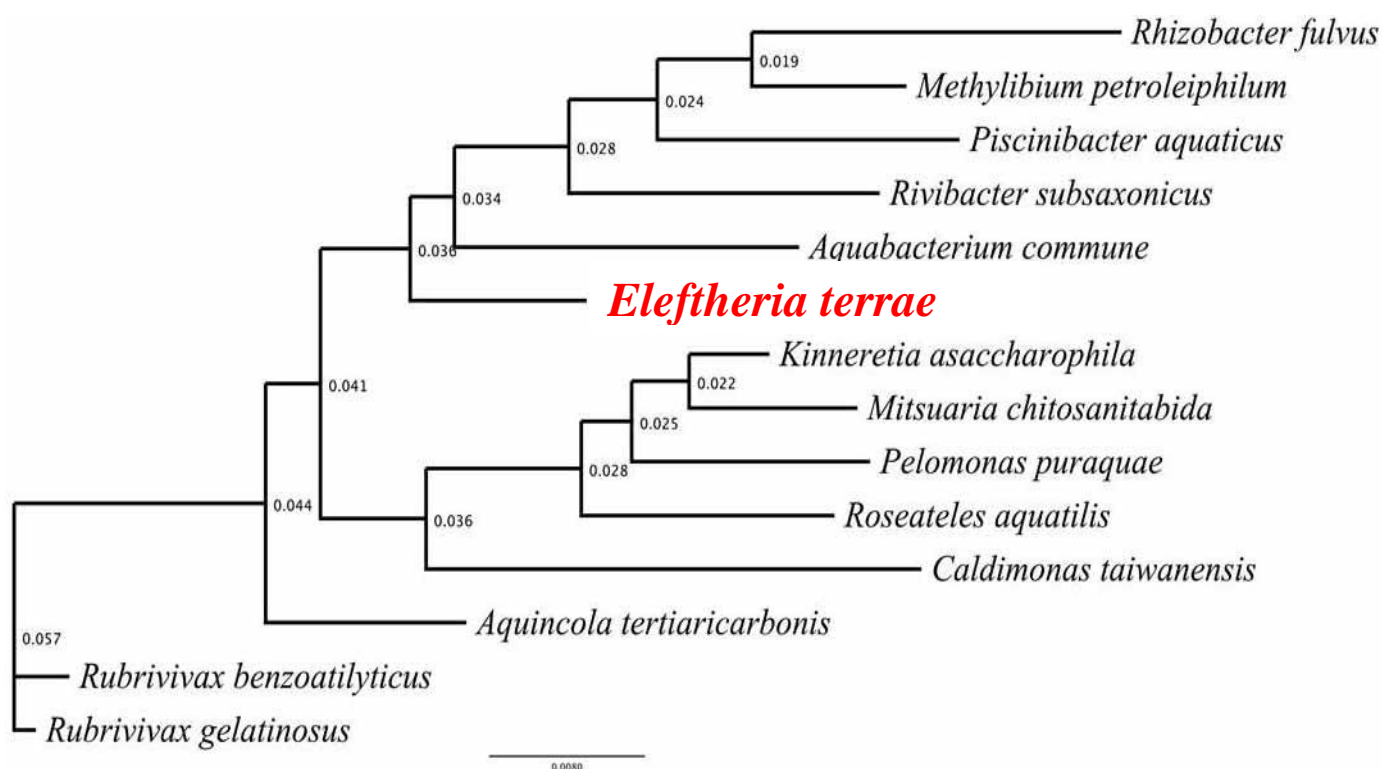
### 4. Phylogénie:

*E. terrae* appartient à la classe des bêta-protéobactéries. Après avoir séquencé le génome de l'organisme, les scientifiques ont conclu qu'*E. terrae* est un membre d'un genre auparavant inconnu proche de la constitution génétique des Aquabacteria sur la base de son séquençage

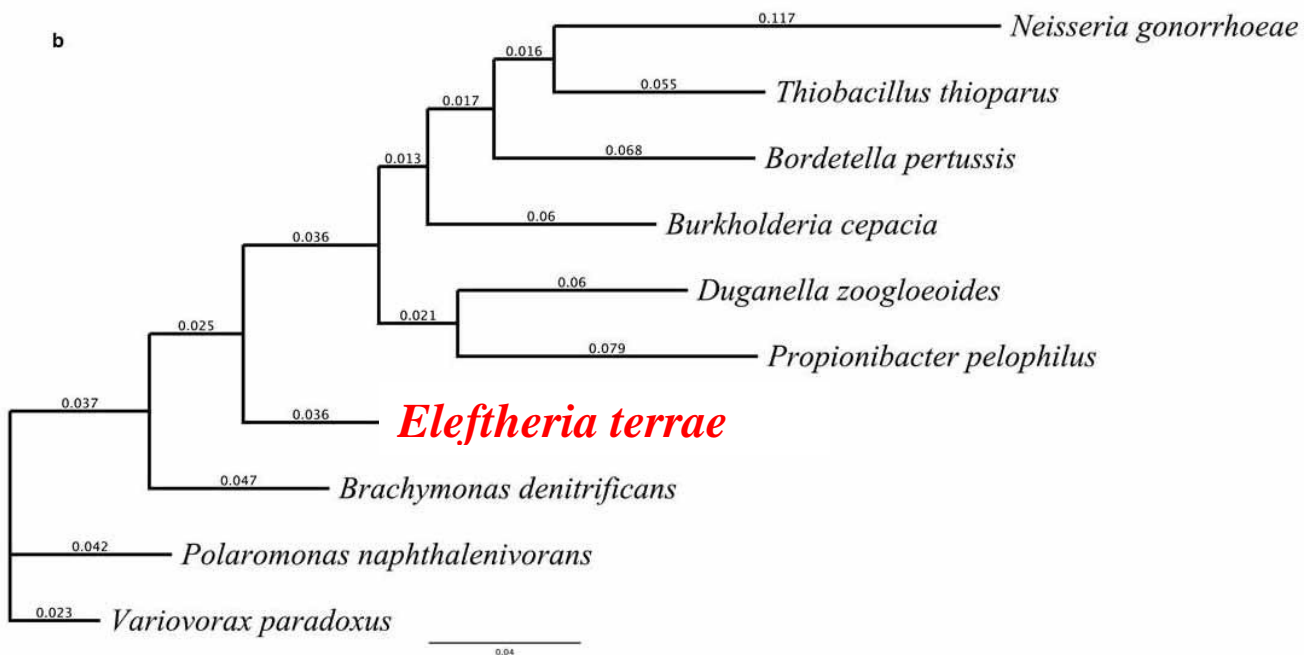
du gène de l'ARNr 16S et de l'hybridation ADN-ADN réalisée par analyse informatique. Les espèces du genre *Aquabacteria* n'étaient pas connues pour produire des antibiotiques jusqu'à la découverte d'*E.terrae* (Ling *et al.*, 2015).

**Tableau 01:** La classification taxonomique d' *E.terrae* (Ling *et al.*, 2015).

Domaine:	<i>Bacteria</i>
Phylum:	<i>Proteobacteria</i>
Classe:	<i>B-proteobacteria</i>
Genre:	<i>Eleftheria</i>
Espèce:	<i>Eleftheria terrae</i>



**Figure 03:** La position phylogénétique d'*E. terrae* au sein de la classe b-protéobactéries (Ling *et al.*, 2015).



**Figure 04:** La position phylogénétique d'*E. terrae* parmi ses plus proches parents connus (Ling *et al.*, 2015).

## 5. Génomique:

Ling et son équipe ont séquencé le génome d'*E. terrae* et l'ont estimé à 6,6 Mpb de longueur, en utilisant un pipeline interne de TUCF Genomics. Une fois la cible de génome assemblée, il a été criblé pour des séquences étroitement liées aux domaines d'adénylation. Les contigs (des série de séquences d'ADN chevauchantes utilisées pour créer une carte physique qui reconstruit la séquence d'ADN d'origine d'un chromosome ou d'une région d'un chromosome) qui codaient pour les voies de biosynthèse de la Teixobactine ont été détectés et marqué. Toutes les lacunes qui restaient dans le génome ont été comblées à l'aide de fragments de pontage développés par PCR et séquençage Sanger (Ling *et al.*, 2015).

**Tableau 02:** Les principaux gènes qui ont été déterminés dans le génome d'*E. terrae* (Ling *et al.*, 2015).

Gene	Fonction putative
Orf1	Superoxyde dismutase
Orf2	Protéine de membrane externe
Orf3	Sous-unité MFP du transporteur d'efflux de la famille RND
Orf4	Protéine de résistance à l'Acridavine
Orf5	Transporteur abc
Txo1	Peptide synthétase non ribosomique
Txo2	Peptide synthétase non ribosomique
Orf6	Désaturase d'acide gras
Orf7	Cystathionine bêta lyase
Orf8	Protéine hypothétique

l'ensemble des gènes *Txo1* et *Txo2* forment un opéron responsable à la synthèse d'un peptide synthétase non ribosomique, c'est l'antibiotique de la Teixobactine (Ling *et al.*, 2015).

## 6. Profil de résistance et activité antibactérienne :

### 6.1. Profil de résistance:

*Eleftheria terrae* est une bactérie qui est en cours d'études, son profil de résistance n'a pas encore été largement documenté. Les études actuelles ont montré qu'il avait des gènes qui confèrent certaines mesures de résistance, telles que:

- La protéine de résistance à l'Acridavine, un système d'efflux multi-médicaments censé protéger la bactérie contre les inhibiteurs hydrophobes (Ling *et al.*, 2015).
- Le superoxyde dismutase, une enzyme qui permet de protéger la bactérie durant une infection contre les effets oxydatifs externes qui peuvent la tuer (Ling *et al.*, 2015).

d'autres mécanismes sont encore inconnus en raison des ressources et des informations limitées, du fait que la bactérie est en cours d'étude.

## 6.2. L'activité antibactérienne:

Concernant l'activité antibactérienne, *E. terrae* est capable de synthétiser la Teixobactine, un antibiotique très puissant similaire à la Vancomycine qui peut agir contre les BMR les plus puissantes tels que *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium difficile*. Cet ATB se lie différemment à la plupart des antibiotiques normalement utilisés, ce qui rend si difficile pour les bactéries attaquées de développer une résistance. Jusqu'à présent les résultats n'ont montré aucune résistance à la Teixobactine dans les organismes étudiés.

Grâce à cet ATB, *Eleftheria terrae* possède une activité antibactérienne très puissante contre la population bactérienne qui l'entoure (Schneider *et al.*, 2015).



## Chapitre 4: La Teixobactine

### 1. Définition:

La Teixobactine est un agent antibiotique naturel de type peptide, et un métabolite secondaire synthétisé par une bactérie à Gram négatif incultivable appelée *Eleftheria terrea* qui a été découverte en 2014 dans un sol herbeux à Maine, Boston, USA (Grady, 2015).

Ce nouvel antibiotique récemment découvert semble d'être très actif contre les BMRs, particulièrement contre les bactéries à Gram positif Multi-résistantes aux antibiotiques tels que *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* sans les laisser créer une résistance contre lui. Et ceci grâce à un mécanisme spécial qui se base sur la liaison à des molécules précurseurs au niveau des lipide II et lipide III qui sont importantes pour la formation de la paroi cellulaire.

La Teixobactine est le premier membre d'une nouvelle classe d'antibiotiques qui a été annoncée pour la première fois depuis des décennies en raison de la limitation des découvertes de nouvelles molécules, et il montre un énorme potentiel prometteur pour trouver une solution à l'antibiorésistance (Ling *et al.*, 2015).

### 2. Découverte:

Afin de synthétiser cet antibiotique, des cellules d'*E terreae* ont été isolées avec succès par l'inoculation des multiples trous de culture iChip avec la terre diluée qui contient cette bactérie afin de déposer environ une bactérie dans chaque trou, et puis couvrir la puce avec des membranes semi-perméables pour assurer la disposition des bactéries. Une fois l'iChip est placé dans le sol, les éléments nutritifs et les facteurs de croissance diffusés du sol ambiant dans chaque trou de culture à travers les membranes favorisent la croissance de la bactérie dans une colonie qui est alors "auto-entretenu" (*in vitro*). Cette disposition permet seulement la croissance d'une seule espèce dans chaque cellule de culture. (Lewis *et al.*, 2015)

Ensuite, des tests d'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* ont mis en évidence une bactérie qui a été nommé *Eleftheria terreae*, Il s'est avéré produire un nouveau composé antibiotique que les chercheurs ont appelé la Teixobactine qui a montré une activité inhabituelle qui a conduit à éliminer cette souche résistante de *S. aureus*, ce qui a attiré

l'attention du groupe de recherche pour découvrir plus de choses sur cette nouvelle molécule synthétisé, dans l'espoir de l'utiliser à l'avenir pour éliminer ce type de souches résistantes. La stéréochimie de la Teixobactine a été déterminée en utilisant des techniques qui comprenaient la dégradation chimique avec l'analyse avancée de *Marfey*, ainsi que des autres tests préliminaires pour mettre en évidence son spectre d'activité et son pouvoir antibactériens.

La Teixobactine est le premier nouvel antibiotique à potentiel médicamenteux isolé à partir de bactéries depuis des décennies. Il représente une nouvelle classe d'antibiotiques, suscitant l'espoir que les nouvelles techniques d'isolement employées pourraient mener à de nouvelles découvertes d'antibiotiques similaires (Gallagher et James, 2015).

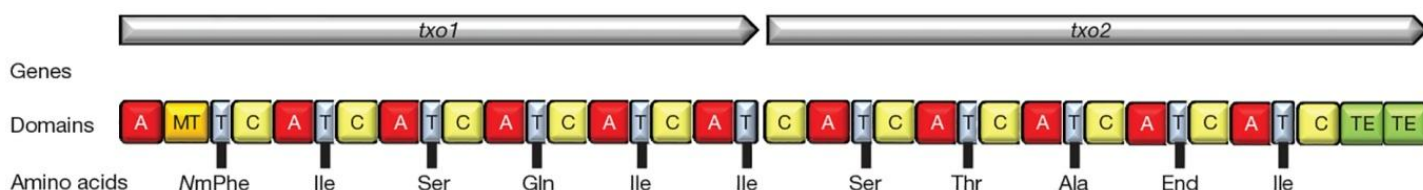
### 3. Propriétés moléculaire et physicochimiques:

La formule chimique de la Teixobactine est défini comme  $C_{58}H_{95}N_{15}O_{15}$ , une molécule qui possède une masse molaire de 1242.488 g/mol (Ling *et al.*, 2015).

#### 3.1 Biosynthèse:

La Teixobactine est un depsipeptide (un peptide dans lequel une ou plusieurs des liaisons amide (-CONH-) sont remplacées par des liaisons ester (-COO-)) macrocyclique à 11 résidus synthétisé par *E. terrae* par les peptides synthétases non ribosomales *Txo1* et *Txo2* (codées par les gènes *txo1* et *txo2*) (Ling *et al.*, 2015).

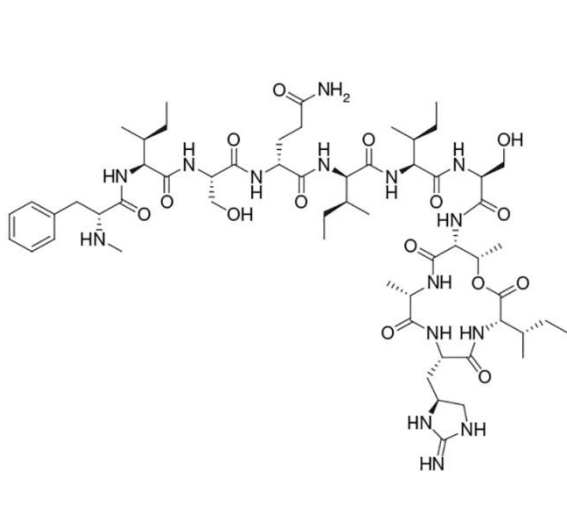
- L'ensemble des gènes *txo1* et *txo2* forment un opéron qui existe dans le génome d'*E. terrae* qui code pour la Teixobactine (Ling *et al.*, 2015).



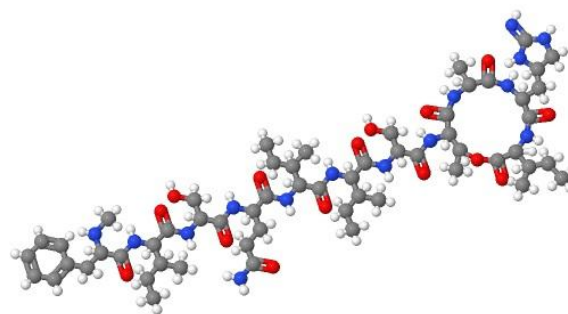
**Figure 05:** Les deux gènes NRPs (non ribosomal peptides), les domaines catalytiques qu'ils codent et les acides aminés incorporés par les modules respectifs: Domaines : A, adénylation ; C, condensation ; MT, méthylation (de la phénylalanine) ; T, thiolation (support) ; et TE, thioestérase (fermeture de cycle Ile-Thr). NmPhe, phénylalanine N-méthylée (Ling *et al.*, 2015).

### 3.2. Propriétés Structurales / Physicochimiques:

La structure a été déterminée par des méthodes d'analyse physico-chimique classiques. Il s'agit d'un peptide qui possède plusieurs caractéristiques inhabituelles, y compris quatre acides aminés D, une phénylalanine méthylée et un acide  $\alpha$ -aminé enduracididine non protéinogène (Ling *et al.*, 2015).



**Figure 06:** Structure chimique de la Teixobactine.  
(Ling *et al.*, 2015)



**Figure 07:** Structure chimique tridimensionnelle de la Teixobactine.  
(Ling *et al.*, 2015)

La séquence d'acides aminés de la téixobactine est:

**MeHN-d-Phe-Ile-Ser-d-Gln-d-Ile-Ile-Ser-d-Thr \* -Ala-enduracididine-Ile-COO- \*.**

L'extrémité carboxy forme une lactone avec le résidu l-thréonine (indiqué par l'astérisque), comme cela est courant dans les peptides microbiens non ribosomaux.

Cette réaction de fermeture de cycle de formation de lactone est catalysée par deux composants de thioestérase C-terminaux de Txo2, formant une lactone. Txo1 et Txo2 sont ensemble composés de 11 modules, et chaque module est sensé ajouter séquentiellement un acide aminé à une chaîne peptidique en croissance. Le premier module a un domaine méthyltransférase qui méthylise la phénylalanine N-terminale (Ling *et al.*, 2015).

## **4. Activité antibactérienne :**

### **4.1. Mécanisme d'action :**

L'une des étapes importantes de la caractérisation d'un nouvel antibiotique est l'identification de sa cible, c'est-à-dire du constituant sur lequel il se fixe pour inhiber la croissance de la bactérie pathogène. Cette étape s'est d'abord reposé sur l'identification de la voie métabolique (ensemble de réactions chimiques) qui est inhibée par la Teixobactine. Pour cette molécule, il ne s'agit pas de la synthèse des protéines, ni de celle de l'ADN ou de l'ARN (Stone, 2015).

En effet, la Teixobactine bloque, de façon semblable à la pénicilline, la synthèse du peptidoglycane (un composant essentiel de la paroi bactérienne) mais par un mécanisme radicalement différent, alors que la pénicilline se fixe à des enzymes responsables de la formation du peptidoglycane en mimant leur substrat, la Teixobactine se fixe, à un substrat de ces enzymes, l'intermédiaire lipidique II ou "Lip-II" (Annexe 03) des motifs structurels hautement conservés (peu sensibles aux mutations des bactéries), une liaison qui entraîne la lyse des bactéries vulnérables sans que ces dernières détectent l'effet du mécanisme de cet antibiotique (Annexe 01), c'est ce qu'on appelle en anglais "Killing without detectable resistance" (Ling *et al.*, 2015).

Les intermédiaires lipidiques II sont des précurseurs lipidiques du peptidoglycane et également des précurseurs lipidiques de l'acide teichoïque, c'est ce qui fait l'intérêt de la Teixobactine pour lutter contre les souches résistantes des bactéries à Gram positif. (Annexe 01) Ce mode d'action explique également l'inefficacité de cette molécule contre les bactéries à Gram négatif (Shukla *et al.*, 2020).

Ce mode d'action original de la Teixobactine a deux conséquences potentiellement très importantes:

- D'une part, les mécanismes développés par les bactéries pathogènes pour résister à la pénicilline et aux autres antibiotiques utilisés en thérapeutique sont inopérants vis-à-vis de la Teixobactine.

- D'autre part, la structure sur laquelle se fixe la Teixobactine est très conservée dans le monde bactérien et il est donc peu probable que les bactéries puissent la modifier pour acquérir une résistance.

Malgré les variations génétiques des bactéries, les mutations n'altèrent quasiment pas les molécules cibles de la Teixobactine. Donc ce mode d'action inhabituelle de la Teixobactine est l'origine de la protection et la conservation de l'activité antibactérienne de cette molécule.

Ce type de mode d'action rappelle celui de la Vancomycine, un antibiotique qui a été utilisé avec succès pendant plus de vingt-cinq ans, de 1958 à 1984, avant l'émergence des premières résistances chez des souches pathogènes (Annexe 01). Cependant, il n'existe à ce jour aucun antibiotique resté totalement indemne de problèmes de résistance, parfois parce que les bactéries pathogènes acquièrent les mécanismes de résistance qui leur permettent d'éviter de s'auto-intoxiquer avec les antibiotiques qu'elles produisent. Mais jusqu'à présent, la Teixobactine reste toujours invincible contre ces bactéries (Shukla *et al.*, 2020).

### **4.2. Spectre d'activité :**

La Teixobactine s'est révélée puissante *in vitro* contre toutes les bactéries à Gram positif testées, y compris *Staphylococcus aureus* et les *entérocoques* difficiles à traiter, *Clostridium difficile* et *Bacillus anthracis* étant exceptionnellement vulnérables. Elle a également tué *Mycobacterium tuberculosis*. Elle s'est également avérée efficace *in vivo* (Annexe 02), lorsqu'elle est utilisée pour traiter des souris infectées par *S. aureus* résistant à la *méthicilline* (SARM) et *Streptococcus pneumoniae* (Ling *et al.*, 2015).

La dose requise pour atteindre 50 % de survie contre le SARM n'est que de 10 % de la dose de vancomycine, un antibiotique généralement utilisé pour le SARM (Annexe 02).

La Teixobactine a également été comparée à d'autres antibiotiques puissants tels que la vancomycine et l'oxacilline pour prouver son efficacité sur l'élimination d'une souche résistante de *S. aureus*, contrairement aux autres antibiotiques mentionnés, la Teixobactine était capable de provoquer une lyse remarquable dans la solution bactérienne de *S. aureus* (un éclaircissement évident dans la solution bactérienne) , alors que les autres antibiotiques semblaient peu efficaces comme il n'y a pas de changement dans la solution bactérienne de *S.aureus* (absence de lyse).

La figure suivante explique l'expérience :



**Figure 08:** Une étude comparative de la lyse de *S. aureus* induite par la Teixobactine et d'autres antibiotiques puissants (vancomycine, oxacilline) (Con: souche de contrôle / Ox: oxacilline, Teix: Teixobactine) (Ling *et al.*, 2015).

Les études ont montré que la Teixobactine n'est pas actif contre les bactéries à membrane externe tel que les agents pathogènes à Gram négatif, en particulier les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, mais a montré une bonne activité contre une souche d' *E. coli asmBI* avec une barrière de perméabilité de la membrane externe défectueuse (Stone, 2015).

Le tableau suivant représente l'activité de la Teixobactine contre les micro-organismes pathogènes:

**Tableau 03:** l'activité de la Teixobactine contre les micro-organismes pathogènes

La CMI a été déterminée par microdilution en bouillon. MSSA, *S. aureus* sensible à la méthicilline ; ERV, entérocoques résistants à la vancomycine (Ling *et al.*, 2015)

Organism and genotype	Teixobactin MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )
<i>S. aureus</i> (MSSA)	0.25
<i>S. aureus</i> +10% serum	0.25
<i>S. aureus</i> (MRSA)	0.25
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE)	0.5
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE)	0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (penicillin <sup>R</sup> )	$\leq 0.03$
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.06
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.12
Viridans group streptococci	0.12
<i>B. anthracis</i>	$\leq 0.06$
<i>Clostridium difficile</i>	0.005
<i>Propionibacterium acnes</i>	0.08
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0.125
<i>Haemophilus influenzae</i>	4
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	25
<i>Escherichia coli</i> (asmB1)	2.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>32

### 4.3. Induction de résistance:

Aucune souche résistante de *S. aureus* ou de *M. tuberculosis* n'a été générée *in vitro* lors de l'administration de doses sub-létales, jusqu'à 27 jours dans le cas du Staphylocoque (Annexe 07) (Ling *et al.*, 2015).

Il est postulé que la Teixobactine est plus robuste contre la mutation des agents pathogènes cibles, en raison de son mécanisme antibiotique inhabituel de liaison à des molécules lipidiques moins mutables plutôt qu'à des protéines relativement mutables dans la cellule bactérienne (Annexe 02).

Cependant, plusieurs scientifiques avertissent qu'il est trop tôt pour conclure que la résistance à la Teixobactine ne se développerait pas en milieu clinique. Des allégations similaires ont été faites pour la vancomycine, mais une résistance est apparue peu de temps après son utilisation à grande échelle dans les années 1980. Il est possible que des gènes codant pour la résistance à la Teixobactine soient déjà présents dans les bactéries du sol. La résistance pourrait également survenir par mutation après une utilisation prolongée chez les patients (Ling *et al.*, 2015).

### **5. La synthèse de la Teixobactine:**

Jusqu'à présent, Toutes les méthodes qui ont été employées ont utilisé des procédures **chimiques** pour synthétiser la Teixobactine sur la base de la composition peptidique d'origine de l'antibiotique, des procédures qui tentaient de créer un composé similaire à la molécule d'origine (Ling *et al.*, 2015).

On dénombre à ce jour plus de quatre synthèses totales (Giltrap *et al.*, 2016) soit de la Teixobactine elle-même (qui a été réalisée par la voie chimique de la synthèse peptidique en phase solide), soit d'analogues comportant à la place de l'acide aminé C-terminal: l'allo-enduracididine ou une arginine, (Jad *et al.*, 2015) soit comportant cette même arginine mais présentant simultanément des modifications au sein de la chaîne peptidique. Cette dernière synthèse a permis de préciser que les trois acides aminés de configuration D sont essentiels pour une activité antibactérienne, le troisième analogue étant pratiquement dépourvu d'activité. Pour sa part, l'acide aminé, la L-allo-enduracididine, a fait l'objet de deux synthèses : celle de Giltrap *et coll.* à partir de la Boc-L-Asp-OtBu, et celle de William Craig *et coll.* à partir de l'hydroxyproline (dix étapes et 31 % de rendement global) (Annexe 07).



## Chapitre 5: Méthodologie d'étude de la souche productrice de l'ATB

La Teixobactine est l'un des premiers antibiotiques qui ont été isolés d'une bactérie VNC grâce à la nouvelle procédure créée par Kim Lewis qui permet la culture de ce type de bactérie.

Comme nous l'avons mentionné dans le premier chapitre, la découverte d'un nouvel antibiotique nécessite un certain nombre de mesures et de procédures afin de l'utiliser, Le groupe de recherche du Dr Ling et Schneider des laboratoires du centre de recherche Novobiotic avec la collaboration d'autres laboratoires d'Allemagne et d'Angleterre ont utilisé de nombreuses procédures et méthodes afin d'isoler et de synthétiser la Teixobactine, ainsi de tester son activité contre les souches BMR, son CMI et sa toxicité et aussi d'autres procédures pour assurer l'efficacité de cette molécule (Ling *et al.*, 2015).

Dans cette partie, on va mentionner les méthodes principales qui ont été utilisées par ce groupe de recherche et qui peuvent être un modèle de recherche pour découvrir de nouvelles molécules similaires :

### 1. Isolement et culture des souches productrices :

Pour effectuer cette méthode les chercheurs ont passés par les étapes qui se suivent :

- Prélèvement d'un échantillon de sol dans un champ herbeux dans Maine.
- Agiter soigneusement 1g de cet échantillon dans 10 ml d'H<sub>2</sub>O désionisé.
- Laisser les particules de sol se déposer pendant 10min.
- Dilution de surnageant dans un milieu SMS (Simple Method For Salmonella) fondu pour obtenir une concentration moyenne d'une cellule pour 20 µl de milieu.
- Distribution des aliquotes de 20 µl dans les puits d'une iChip (Annexe 05).
- Mettre l'iChip en contact directe avec le sol.
- Incubation pendant 1 mois.
- Démontez les iChips et étalez les colonies individuelles pour tester la capacité de propagation à l'extérieur de l'iChip et pour la purification des colonies (Ling *et al.*, 2015).

### 2. Préparation d'extraits et dépistage de l'activité.

- Culture des isolats poussés bien en dehors de l'iChip dans un bouillon de graine pour augmenter la biomasse suivie d'une dilution à 1/20 dans 4 bouillons de fermentation différents.
- Agitation pendant 11 jours à 29°C
- Séchage et remises en suspension les fermentations dans un volume égal de 100% de DMSO (Diméthylsulfoxyde).

- Le dépôt de 5µl d'extraits sur une pelouse de cellules en croissance de *S.aureus* NCTC8325-4 dans des plaques de gélose Mueller-Hinton (MHA).
- L'observation des zones de dégagement visibles indiquaient une activité antibactérienne après une incubation de 20h à 37 °C.

L'extrait de cet isolat, provisoirement nommé *Eleftheria terrae* sp, a produit une large zone de défrichement. Bien qu'*E.terrae* sp produise une activité antibactérienne dans plusieurs conditions de croissance et la meilleure activité a été observée avec le bouillon de fermentation R4 pour 1 litre d'H<sub>2</sub>O désionisé et un pH 7 (Ling *et al.*, 2015).

### 3. Séquençage et Identification des souches :

Après l'isolement du génome d'*Eleftheria terrae*, Le séquençage a été effectué à la Tufts University Core Facility (Boston, MA).

Une bibliothèque appariée avec une taille d'insert d'environ 800 bases a été générée et séquencée en utilisant la technologie Illumina. La longueur de lecture était de 251 bases par lecture.

Une agitation puissante d'une suspension de cellules a été effectuée avec des billes de verre (106 nm ou moins), et le surnageant obtenu a été utilisé en tant que matrice pour amplifier le gène de l'ARN 16S, en utilisant GoTaq Green Master Mix (Promega M7122), et les amorces universelles E8F et U1510R33.

Le fragment d'ADN amplifié a été séquencé par Macrogen USA (Cambridge, MA), la séquence de cet fragment a été comparée ensuite par BLAST à des isolats cultivés dans le Ribosomal Database Project pour détecter la famille la plus proche de cette souche.

Le génome d'*E.terrae* a été soumis au serveur d'annotation du génome RAST qui a produit une liste des plus proches parents avec des génomes publiés. Ce sont *Alicyclophilus denitrificans*, *Leptothrix cholodnii*, *Methylobium petroleiphilum* et *Rubrivivax gelatinosus*. Les valeurs d'hybridation ADN-ADN de ces génomes à *E.terrae* ont ensuite été prédites par le calculateur de distance génome-génome 2.0. *M. petroleiphilum* et *R.gelatinosus* sont présents sur l'arbre phylogénique d'*E. terrae* (Ling *et al.*, 2015).

### 4. Augmentation de la biomasse par fermentation et purification de la Teixobactine.

La fermentation se déroule dans cet ordre :

- Culture sous agitation des colonies homogénéisées dans un bouillon de graines.
- Incubation pendant 4 jours à 28 °C.
- Dilution de la culture à 5% dans le milieu de fermentation R4.
- contrôle de la production par HPLC analytique.

- L'isolement et la purification de a Teixobactine à grand échelle passe par ces étapes.
- la culture de 40 litres de cellules dans un bioréacteur Sartorius Biostat Cultibag STR 50/200 pendant approximativement 7 jours.
- centrifugation de la culture et extraire le culot avec 10 litres d'acétonitrile aqueux à 50%.  
Ensuite la suspension est centrifugée à nouveau pendant 30 minutes.
- L'élimination de L'acétonitrile du surnageant par évaporation rotative sous pression réduite jusqu'à ce qu'il ne reste que de l'eau.
- Extraire le mélange deux fois avec 5 litres de n-BuOH (le butanol).
- Transfert de la couche organique dans un ballon à fond rond et l'élimination de butanol par évaporation sous pression réduite.
- Dissoudre le solide jaune résultant dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde) et le soumettre à une HPLC préparatoire.
- Rassemblement des fractions contenant la Teixobactine et élimination de l'acétonitrile par évaporation rotative sous pression réduite et lyophilisation de mélange aqueux restant pour laisser une poudre blanche (sel de trifluoroacétate).
- Conversion de la Teixobactine en un sel chlorhydrate et éliminer l'endotoxine.
- Dissoudre 100mg de Teixobactine dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O et ajouter 5g de Dowex ensuite incubé le mélange 20 minutes avec une agitation occasionnelle.
- Versement de mélange dans une colonne Dowex de 10g (forme 1 x 4 Cl-) déjà préparée et laisser la solution éluer lentement ensuite verser cette solution dans une colonne Dowex fraîche de 10g (forme 1 x 4 Cl-)
- Filtration de la solution résultante à travers un filtre centrifuge à poids moléculaire Pall 3K ensuite lyophilisation de la solution claire pour laisser une poudre (Ling *et al.*, 2015).

**5. Concentration minimale inhibitrice (CMI).**

La détermination de CMI se fait par micro-dilution en bouillon conformément aux directives du CLSI. Le milieu utilisé pour la majorité des espèces était un bouillon de Mueller-Hinton ajusté aux cations.

**Tableau 04:** Différents milieux utilisés pour la culture de divers micro-organismes pathogènes (Ling, 2015).

<b>L'espèce dédiée au teste</b>	<b>Le milieu de culture utilisé</b>
La majorité des espèces	Bouillon de Mueller-Hinton ajusté aux cations (MHB)
Les Streptocoques	MHB complété avec 3% de sang de cheval lysé
<i>Haemophilus influenzae</i>	Le milieu de test Haemophilus
les mycobactéries	le bouillon Middlebrook 7H9 (Difco)
<i>Clostridium difficile</i>	le bouillon de Schaedleranaerobe (Oxoid)

L'effet du sérum a été testé avec le sérum bovin fœtal (ATCC) ajouté à MHB. Pour empêcher la liaison du médicament aux surfaces en plastique tous les milieux de teste ont été complétés avec 0,002% de polysorbate et la concentration cellulaire a été ajustée à environ  $5 \times 10^5$  cellules par ml. La CMI a été définie comme la plus faible concentration d'antibiotique sans croissance visible, cela après 20h, d'incubation à 37 °C pendant 2 jours pour *M.smegmatis* et 7 jours pour *M.tuberculosis*. Le spectre antibactérien élargi de la Teixobactine a été testé à Micromyx, Kalamazoo, MI, dans des dosages en bouillon (Annexe 03) (Ling *et al.*, 2015).

## 6. Concentration bactéricide minimale (CBM)

Pour mettre en évidence l'CBM de la Teixobactine, le groupe de recherche l'ont utilisé sur une souche pathogène de *S. aureus*. Tout d'abord, Les cellules de *S. aureus* NCTC8325–4 provenant des puits d'une plaque microbroth CMI et incubées pendant 20 h à 37 ° C ont été granulées. Une aliquote de l'inoculum initial pour la plaque CMI a été traitée de manière similaire. Les cellules ont été remises en suspension dans du milieu frais, étalées sur MHA, et les colonies ont été dénombrées après incubation pendant 24 h à 37 ° C. La CBM est défini comme la première dilution du médicament qui a entraîné une diminution de 99,9% par rapport au titre bactérien initial de l'inoculum de départ et a été déterminé comme étant  $2 \times$  CMI pour la Teixobactine (Annexe 03) (Ling *et al.*, 2015).

## 7. Etudes de résistance.

Pour réaliser des tests sur la résistance en un seul pas, *S. aureus* NCTC8325–4 à 1010 u.f.c. ont été étalés sur un milieu du MHA contenant 2 x, 4 x et 10 x CMI de Teixobactine. Après 48 h d'incubation à 37 ° C, aucune colonie résistante n'a été détectée, ce qui donne une fréquence calculée de résistance à la Teixobactine  $<10^{-10}$ . Pour *M. tuberculosis*, les cellules ont été cultivées dans du milieu 7H9 et étalées à 109 cellules par ml sur 10 plaques et incubées pendant 3 semaines à 37 ° C pour le comptage des colonies. Aucune colonie n'a été détectée.

Pour le développement de la résistance par passage séquentiel, des cellules *S.aureus* ATCC 29213 en phase exponentielle ont été diluées à un A600nm (DO600) de 0,01 dans 1 ml de MHB supplémenté avec 0,002% de polysorbate 80 contenant de la Teixobactine ou de l'ofloxacin. Les cellules ont été incubées à 37 ° C sous agitation et soumises à des passages à 24 h d'intervalle en présence de Teixobactine ou d'ofloxacin à une concentration subinhibitrice. La CMI a été déterminée par microdilution en bouillon (Annexe 02) (Annexe 03) (Ling *et al.*, 2015).

## 8. Cytotoxicité chez les mammifères.

Le test de prolifération cellulaire *CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega)* a été utilisé pour déterminer la cytotoxicité de la Teixobactine, ce test se réalise comme se suit:

- Ensemencement des Fibroblastes embryonnaire de souris NIH / 3T3 à croissance exponentielle (Réf: ATCC CRL-1658, dans le milieu Modified Eagle de Dulbecco supplémenté avec 10% de sérum de veau bovin) dans une plaque à fond plat à 96 puits et incubés à 37 ° C.
- Ensemencement des cellules HepG2 (Réf: ATCC HB-8065, dans le milieu Modified Eagle de Dulbecco complété avec 10% de sérum de veau foetal) dans une plaque à fond plat à 96 puits et incubés à 37 ° C.
- Après 24 h, les milieux ont été remplacés par du milieu frais contenant les composés à tester (0,5 µl d'une double dilution en série dans du DMSO à 99,5 µl de milieu).
- Après 48 h d'incubation à 37 ° C, une solution de reporter a été ajoutée aux cellules et après 2 h, le A490nm (DO490) a été mesuré en utilisant un spectrophotomètre *Spectramax Plus* (Annexe 04) (Ling *et al.*, 2015).

### 9. Tests d'antagonisation.

L'antagonisation de l'activité antibiotique de la Teixobactine par des molécules cibles potentielles a été réalisée par une configuration à base de CMI dans des plaques de microtitration. La Teixobactine (8 x CMI) a été mélangée avec des antagonistes potentiels purifiés par HPLC (C55-P, farnesyl-PP [C15-PP; Sigma Aldrich], C55-PP, UDP-MurNAc-pentapeptide, UDP-GlcNAc [Sigma Aldrich], lipide I, lipide II et lipide III) à un rapport molaire fixe (excès molaire de cinq fois) ou à des concentrations croissantes par rapport à l'antibiotique, et le rapport le plus bas conduisant à une antagonisation complète de l'activité de la Teixobactine a été déterminé. *S. aureus* ATCC 29213 (5 x 10<sup>5</sup> ufc / ml) ont été ajoutés et les échantillons ont été examinés pour détecter une croissance bactérienne visible après une incubation d'une nuit. La vancomycine (8 x CMI) a été utilisée comme contrôle (Annexe 03) (Ling *et al.*, 2015).

### 10. Formation complexe de Teixobactine.

La liaison de la Teixobactine à C55-P, C55-PP, lipide I, lipide II, lipide II-D-Ala-D-Ser, lipide II-D-Ala-D-Lac et lipide III a été analysée en incubant 2 nmol de chaque précurseur purifié avec 2 à 4 nmoles de Teixobactine dans 50 mM Tris / HCl, pH 7,5, pendant 30 min à température ambiante.

La formation du complexe a été analysée en extrayant les précurseurs non liés du mélange réactionnel avec du n-butanol / acétate de pyridine (pH 4,2) (2: 1; vol / vol) suivi d'une analyse CCM (Chromatographie sur couche mince) en utilisant du chloroforme / méthanol / eau / ammoniacque comme solvant et détection des précurseurs contenant des lipides par coloration à l'acide phosphomolybdique (Annexe 03) (Ling *et al.*, 2015).

### 11. Test d'inhibition hERG.

hERG (de l'anglais : human Ether-à-go-go-Related Gene) est un canal potassique important, c'est-à-dire une protéine jouant le rôle de canal ionique. Elle est voltage-dépendant. Elle fait sortir le potassium de la cellule. Le blocage de ce canal entraîne des fibrillations en cardiologie, c'est-à-dire une modification de l'onde QT sur l'électrocardiogramme qui peut aboutir à un arrêt cardiaque.

La Teixobactine a été testée pour l'inhibition de l'activité hERG à l'aide d'un instrument IonWorks™ HT (Molecular Devices Corporation), qui effectue des mesures d'électrophysiologie dans une plaque de 384 puits (PatchPlate). Des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) transfectées de manière stable avec hERG (lignée cellulaire obtenue à partir de Cytomyx, Royaume-Uni) ont été préparées sous forme de suspension unicellulaire dans une solution extracellulaire (solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco avec du calcium et du magnésium pH 7), et des aliquotes ont été ajoutées à chacun, bien de l'assiette. Les cellules ont été positionnées sur un petit trou au fond de chaque puits en appliquant un vide sous la plaque pour former un joint électrique. La résistance de chaque joint a été mesurée via une électrode commune dans le compartiment intracellulaire et des électrodes individuelles placées dans chacun des puits supérieurs (Ling *et al.*, 2015).

### 12. Génotoxicité in vitro.

La Teixobactine a été testée dans un test de micronoyau in vitro qui utilise l'imagerie cellulaire fluorescente pour évaluer la cytotoxicité et quantifier les micronoyaux. Le test a été réalisé avec des cellules CHO-K1 en présence ou en l'absence de fraction S9 de foie de rat traité par Aroclor (pour induire une activité CYP) (contient des enzymes métabolisant les phases I et II) pour déterminer si des métabolites génotoxiques sont produits. Aucune preuve de génotoxicité n'a été observée avec la Teixobactine jusqu'à 125 µg ml<sup>-1</sup> (la concentration la plus élevée testée) dans l'une ou l'autre des conditions (Ling *et al.*, 2015).

### 13. Liaison à l'ADN.

Les composés ont été dilués en série et mélangés avec de l'ADN de sperme de saumon cisailé (concentration finale de 6,6 mg/ml). Une aliquote a été repérée sur une pelouse de cellules en croissance de *S. aureus* NCTC 8325-4, et les zones d'inhibition de croissance ont été mesurées après 20 h de croissance à 37 ° C. Une réduction de la taille de la zone d'inhibition en présence d'ADN indiquerait une perte d'activité antibactérienne due à la liaison à l'ADN (Ling *et al.*, 2015).

### 14. Liaison aux protéines plasmatiques.

La liaison aux protéines de la Teixobactine dans le plasma de rat a été déterminée à l'aide d'un kit de dialyse à équilibre rapide (RED) (Pierce) avec analyse LC – MS / MS. De la Teixobactine (10 µg ml<sup>-1</sup>) et du plasma de rat dans du dextrose à 5% contenant 0,005% de polysorbate 80 ont été ajoutés à un

côté de la chambre de dialyse à plaque RED à usage unique ayant une membrane de coupure de 8 kD. Après quatre heures de dialyse, les échantillons des deux côtés ont été traités et analysés par LC / MS / MS. La concentration de Teixobactine a été déterminée et le pourcentage de composé lié à la protéine a été calculé. La Teixobactine a présenté 84% de liaison aux protéines plasmatiques (Ling *et al.*, 2015).

### 15. Études animales.

Toutes les études sur les animaux ont été menées dans les laboratoires Vivisource (Waltham, MA) et au centre des sciences de la santé de l'Université du nord du Texas (Houston, TX) et ont été conformes aux politiques institutionnelles de soin et d'utilisation des animaux. Ni la randomisation ni la mise en aveugle n'ont été jugées nécessaires pour les modèles d'infection animale, et tous les animaux ont été utilisés. Toutes les études animales ont été réalisées avec des souris CD-1 femelles, âgées de 6 à 8 semaines (Annexe 04) (Ling *et al.*, 2015).

### 16. Modèle de protection contre la septicémie de la souris.

La Teixobactine a été testée contre l'isolat clinique *S.aureus* MRSA ATCC33591 dans un test de protection contre la septicémie chez la souris pour évaluer sa biodisponibilité *in vivo* et sa PD50 (dose protectrice entraînant une survie de 50% des souris infectées après 48 h). Les souris femelles CD-1 ont été infectées avec 0,5 ml de suspension bactérienne ( $3,28 \times 10^7$  c.f.u. par souris) par injection intrapéritonéale, une concentration qui atteint au moins 90% de mortalité dans les 48 h après l'infection. Une heure après l'infection, des souris (6 par groupe) ont été traitées avec de la Teixobactine à des doses intraveineuses uniques de 20, 10, 5, 2,5 et 1 mg par kg. Les souris témoins de l'infection ont reçu une dose de véhicule ou de vancomycine. La survie est observée 48 h après l'infection et la probabilité est déterminée par un test de log-rank non paramétrique. Pour obtenir le PD50, l'expérience a été répétée à des doses plus faibles de 5, 1, 0,5, 0,25 et 0,1 mg par kg (Ling *et al.*, 2015).

### 17. Modèle d'infection pulmonaire de souris.

La Teixobactine a été testée contre *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301 (UNT012–2) dans un modèle de pneumonie immunocompétente chez la souris afin de déterminer le potentiel du composé à traiter les infections respiratoires aiguës. Les souris CD-1 ont été infectées par voie intranasale ( $1,5 \times 10^6$  ufc. par souris). Le composé a été administré par voie intraveineuse 24 et 36 h après l'infection, tandis que l'amoxicilline a été administrée par voie sous-cutanée à une concentration unique pour servir de témoin positif. La Teixobactine a été administrée à des doses allant de 0,5 à 10 mg par kg par dose (5 souris par dose). 48 h après l'infection, les souris traitées ont été euthanasiées, les poumons prélevés de manière aseptique et traités pour comptage ufc (Ling *et al.*, 2015).

## Chapitre 6: Production de la Teixobactine et proposition d'une nouvelle méthode de synthèse

Le profil antibactérien attrayant de la Teixobactine en conjonction avec ses nouvelles caractéristiques de structure a suscité un intérêt significatif pour ses études de synthèse afin de l'utiliser comme un médicament de première classe en tant qu'un candidat prometteur pour le développement clinique (Ling *et al.*, 2015).

### 1. Avantages de la Teixobactine:

- La Teixobactine rejoint la liste des autres antibiotiques puissants non ribosomiques à base d'acides aminés D, notamment la polymyxine et la vancomycine. Alors que les premiers travaux suggéraient que la Teixobactine présentait des barrières élevées à la résistance. Contrairement aux autres antibiotiques, la Teixobactine n'a marqué aucun type de résistance pour le moment (Ling *et al.*, 2015).
- D'après les données du CEPMC (Centre européen de prévention et de contrôle des maladies) et du CDC (Centers for Disease Control), on estime que la résistance aux antibiotiques est responsable de 700 000 morts par ans dans le monde chaque année, La résistance aux antimicrobiens croissante chaque année dans le monde est devenue une menace sérieuse pour la santé humaine et nécessite une attention immédiate, la Teixobactine représente un espoir pour lutter contre cette calamité et sauver des vies humaines (De Kraker *et al.*, 2016).
- La Teixobactine appartient à une toute nouvelle famille d'antibiotiques, avec ses structures et mécanismes d'effets rares, on pourrait vraiment dire qu'elle pourrait lutter contre les effets de l'antibiorésistance. Cette molécule peut contribuer au développement de nouveaux agents antimicrobiens en l'utilisant pour créer des analogues plus puissants (Costa, 2018).

### 2. Biosynthèse de la Teixobactine :

- **Les difficultés rencontrées lors de sa production :**

Malgré l'efficacité impressionnante de la Teixobactine et ses rares caractéristiques, sa synthèse reste très difficile du fait de l'état incultivable d' *E. terrae*, la bactérie qui la synthétise.



La méthode de synthèse classique en utilisant la bactérie source est considéré inutile dans le cas de cet antibiotique, car *E. terrae* exige des conditions particulières pour pousser dans un milieu de sol. La méthode de culture de l'iChip possède une faible productivité, car elle ne peut permettre qu'une ou deux cellules de se développer à l'intérieur de chaque trou dans la puce d'isolement (culture *in Situ*), ce nombre est insuffisant pour une synthèse à l'échelle industrielle (Lewis, 2015).

En effet, les scientifiques ont cherché à résoudre ce problème en travaillant sur la création d'analogues de cet antibiotique en passant par des procédures avancées et compliquées, une méthode qui utilise les mêmes acides aminés qui constituent la molécule d'origine de cet antibiotique, ce processus chimique est très compliqué, très exigeant et peut coûter cher en même temps (Coates *et al.*, 2011).

Les rapports indiquent que son développement a été ralenti en raison d'obstacles techniques, La synthèse totale de la Teixobactine est laborieuse et à faible rendement (3,3%) et des versions simplifiées du composé ont été émises pour rationaliser la production sans compromettre l'activité antimicrobienne (McCarthy, 2018).

### **3. La solution au problème de la biosynthèse:**

Cette partie est le fruit d'une longue recherche personnelle sur une base de données très limitées sur le sujet qui est en cours de recherche. En tant qu'étudiants de biologie moléculaire de microorganismes et en se basant sur nos connaissances sur le génie génétique et la génomique, nous avons eu l'idée de faire notre propre recherche sur le sujet et nous proposons une solution pour le problème de la biosynthèse de la Teixobactine.

- **3.1. Notre Proposition:**

En raison de tous les facteurs précédents qui ont affecté la production de la Teixobactine, nous proposons une méthode alternative pour résoudre le problème de synthèse de cet antibiotique qui est **plus simple, autonome, moins coûteuse, rapide et plus productive**: nous parlons de la méthode du **clonage** en utilisant des procédures simples de la biologie moléculaire et du génie génétique.

### 3.2. Définition du Clonage:

Le terme clonage décrit un certain nombre de processus différents qui peuvent être utilisés pour produire des copies génétiquement identiques d'une entité biologique. Le matériel copié, qui a la même constitution génétique que l'original, est appelé clone, et l'action de la copie s'appelle cloner (Aryal, 2018).

Dans ce travail, on propose de cloner le gène responsable de la synthèse de la Teixobactine pure issue de la bactérie qui la synthétise (*Eleftheria terrae*) en utilisant la technologie de l'ADN recombinant, un processus qui se fait par la recombinaison de notre gène d'intérêt *in vitro*, puis le transfert de l'ADN recombinant dans un hôte approprié qui va assurer sa réplication et, surtout voir son expression. en d'autres termes, nous allons ajouter un nouveau gène à un autre microorganisme pour que éventuellement nous serons capables de créer un micro-organisme génétiquement modifié qui est capable de produire la Teixobactine à l'échelle industrielle.

### 3.3. Les étapes du clonage:

Les principales étapes du clonage de notre gène se base sur génie génétique, Il implique :

- la préparation de l'insert à cloner (fragment d'ADN d'intérêt)
- la préparation du vecteur (un ADN auto-répliatif qui va transporter l'ADN inséré pour être multiplié dans une cellule hôte)
- l'intégration-ligation de l'insert dans le vecteur.
- la transformation / transduction de l'hôte par le vecteur recombiné.
- la sélection des hôtes recombinants (Aryal, 2018).

### 3.4. Quelques notes importantes sur le gène à cloner:

Le génome d'*Eleftheria terrae* est composé approximativement de 6,6 million pb qui constituent plusieurs gènes qui codent pour des différentes fonctions. Le séquençage des gènes a été déjà réalisé et de nombreux gènes ont été identifiés, parmi eux le gène d'expression de notre ATB. Le groupe de gènes biosynthétiques de la Teixobactine a été déposé dans le *GenBank* sous le numéro d'accès **KP006601**, c'est une séquence d'ADN composé de 52035 pb qui code pour 10 gènes, parmi eux: deux gènes "txo1" et "txo2" qui se

suivent et qui codent pour la Teixobactine. Le gène "txo1" est composé de 19268 pb et "txo2" qui est composé de 19127 pb, les deux gènes sont séparés seulement par 5 pb.

Les deux gènes ensemble forment un opéron de 38400 pb qui codent pour l'expression de la Teixobactine. Cet opéron représente la séquence d'ADN cible que nous voulons cloner (Ling *et al.*, 2015).

The screenshot shows the GenBank entry for the Eleftheria terrae teixobactin gene cluster. The main information displayed is:

- LOCUS:** KP006601 52035 bp DNA linear BCT 28-JAN-2015
- DEFINITION:** Eleftheria terrae teixobactin gene cluster, complete sequence.
- ACCESSION:** KP006601
- VERSION:** KP006601.1
- KEYWORDS:** .
- SOURCE:** Eleftheria terrae
- ORGANISM:** Eleftheria terrae; Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Eleftheria.
- REFERENCE:** 1 (bases 1 to 52035)
- AUTHORS:** Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schaberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C. and Lewis, K.
- TITLE:** A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance
- JOURNAL:** Nature (2015) In press
- PUBMED:** 25561178
- REMARK:** Publication Status: Available-Online prior to print
- REFERENCE:** 2 (bases 1 to 52035)
- AUTHORS:** Schaberle, T.F.

On the right side of the page, there are several interactive options:

- Change region shown:** A dropdown menu to select a specific region of the sequence.
- Customize view:** A dropdown menu to adjust the display of the sequence.
- Analyze this sequence:** A section with links for "Run BLAST", "Pick Primers", "Highlight Sequence Features", and "Find in this Sequence".
- Related information:** A section with links for "Protein", "PubMed", and "Taxonomy".
- Recent activity:** A section showing recent activity for the sequence, with a "Turn Off" and "Clear" option.

Figure 09: Capture d'écran de la page web de GenBank qui montre le groupe de gènes biosynthétiques de la Teixobactine (Ling *et al.*, 2015).

#### 4. Les études préliminaires de la procédure :

L'isolement et le clonage de l'opéron de la Teixobactine représente un véritable défi et nécessite l'utilisation d'une enzyme de restriction appropriée pour son isolement, un vecteur approprié qui peut le contenir et le transporter avec succès, et une cellule hôte appropriée qui peut contenir l'ADN recombinant, assurer sa réplication et son expression. on ne peut jamais passer vers l'étape pratique sans définir ces paramètres.

#### **4.1. L'isolement de l'opéron de l'expression biosynthétique de la Teixobactine:**

- **La découverte de l'enzyme de restriction appropriée:**

Afin que nous puissions séparer et isoler le gène de l'expression biosynthétique de la Teixobactine à partir du génome total d' *E.terrae*, une enzyme de restriction est nécessaire pour couper l'ADN de la bactérie de manière que nous puissions séparer et isoler notre gène souhaité de l'ADN source.

##### **4.1.1. Définition des enzymes de restriction:**

Les enzymes de restrictions sont des endonucléases qui possèdent la capacité de lire des sites de reconnaissance à l'intérieur de l'ADN cible, ces sites les redirigeront vers des sites où ils devraient couper l'ADN. Il existe 3 types des enzymes de restriction, tandis que le type I et le type III doivent lire un site de reconnaissance spécifique pour atteindre le site de clivage, le type II considère le site de reconnaissance lui-même comme un site de coupure ce qui rend leur manipulation plus fluide.

##### **4.1.2. Critères de choix de l'enzyme:**

Il existe deux règles strictes pour choisir la bonne enzyme de restriction :

1. Elle doit couper l'ADN juste quelques bases avant le début et aussi quelques bases après la fin de la séquence du gène d'intérêt, de cette façon le fragment de restriction résultant sera le gène biosynthétique de la Teixobactine et de cette façon nous pouvons facilement le recombiner à l'intérieur d'un vecteur.
2. l'enzyme de restriction ne doit jamais couper à l'intérieur de la séquence du gène d'intérêt, car si cela se produit, notre gène cible sera fragmenté en de nombreux fragments et il ne sera pas en mesure de remplir correctement sa fonction.

##### **4.1.3. Le choix de l'enzyme appropriée:**

Après avoir fait de nombreuses recherches, nous avons trouvé qu'il existe 500000 sites de coupure de 1298 enzymes différentes permettant de couper la séquence Genbank d'ADN d'*E.terrae*. La recherche manuelle de la bonne enzyme peut prendre beaucoup de temps, et

presque toutes les enzymes que nous avons trouvées, y compris les plus courantes, coupent au milieu du gène qui code pour la Teixobactine, ce qui affectera sa fonction.

Avec nos ressources limitées et décentes, le choix de l'enzyme de restriction appropriée était presque impossible, mais grâce à l'aide du Dr Charvátová A. (doctorant à l'université de LMU, Munich, Allemagne), nous avons eu accès à un site Web de la biotechnologie (<https://www.genscript.com>) qui donne toutes les possibilités des enzymes de restriction qui existent qui peuvent couper notre séquence d'ADN du GenBank, et qui peut donner la possibilité de filtrer les enzymes en fonction du nombre de sites qui peuvent couper au niveau de l'ADN, le processus était automatique, tout ce que nous avons fait était de lui donner la séquence d'ADN et le site Web nous a donné toutes les possibilités.

Après de nombreuses heures de recherches, nous avons finalement trouvé l'enzyme de restriction parfaite, l'endonucléase ***Aba I***, issue de la bactérie "*Azospirillum brasilense UQ 1796*" d'où vient son nom ***Aba I*** est une endonucléase de type II, ce qui signifie que son site de reconnaissance est aussi le site de clivage lui-même. Le site de reconnaissance est constitué de 6 nucléotides TGATCA qui représente le site de clivage au même temps, la coupure sera effectuée entre la base T et G et les extrémités résultantes seront cohésives:

5' T<sup>^</sup>GATCA 3'

3' ACTAG<sup>^</sup>T 5'

<sup>^</sup> : le site de coupure

Dans la séquence du GenBank, le gène d'intérêt commence à partir de la base n° 7977 et se termine à la base n° 46377. L'enzyme ***Aba I*** coupe dans trois sites : deux sites avant le gène d'intérêt entre les bases n° 7045/7046, 7285/7286 et un site après le gène d'intérêt entre les bases n° 46900/46901. Donc notre gène est sauvé et il sera inclus parmi les fragments de restriction résultant après la digestion de l'ADN d'*E. terrae* par l'enzymes de restriction ***Aba I***.

#### **4.2. Le choix du vecteur approprié pour l'insert:**

Après avoir réussi à digérer l'ADN d'*E.terrae* à l'aide de l'enzyme de restriction *Aba I*, l'étape suivante consiste à choisir un vecteur approprié pour le contenir, ce qui conduira à créer un ADN recombiné pouvant être transformé en une cellule hôte pour assurer son expression.

#### 4.2.1. Critères de choix:

Le choix d'un bon vecteur dépend de plusieurs facteurs :

- Il doit être auto-répliquable et présent en nombre élevé de copies dans la cellule hôte.
- Il doit comporter des gènes de sélection (exemple: résistance à un antibiotique).
- Il doit être facile à séparer et à purifier de l'ADN de l'hôte.
- Il doit être de petite taille, pour pouvoir être inclus à l'intérieur de la cellule hôte.
- Il doit posséder un nombre important de sites de restriction uniques pour faciliter le clonage de l'insert, on parle du paramètre le plus important, c'est d'avoir un polylinker (les même sites de restrictions de l'enzyme qu'on a utilisé pour isoler le gène d'intérêt)
- et surtout, le vecteur doit être capable de contenir la taille de l'insert (le gène à cloner).

Il existe de nombreux vecteurs, tels que plasmides, bactériophage, cosmides, des vecteurs hybrides comme les cosmides, les phagémides, les virus eucaryotiques... (Aryal, 2018).

- Tous ces vecteurs varient selon les facteurs déjà mentionnés, donc ces paramètres doivent être strictement respectés afin de créer un processus réussi.

#### 4.2.2. Le vecteur cosmide navette pHZ1358:

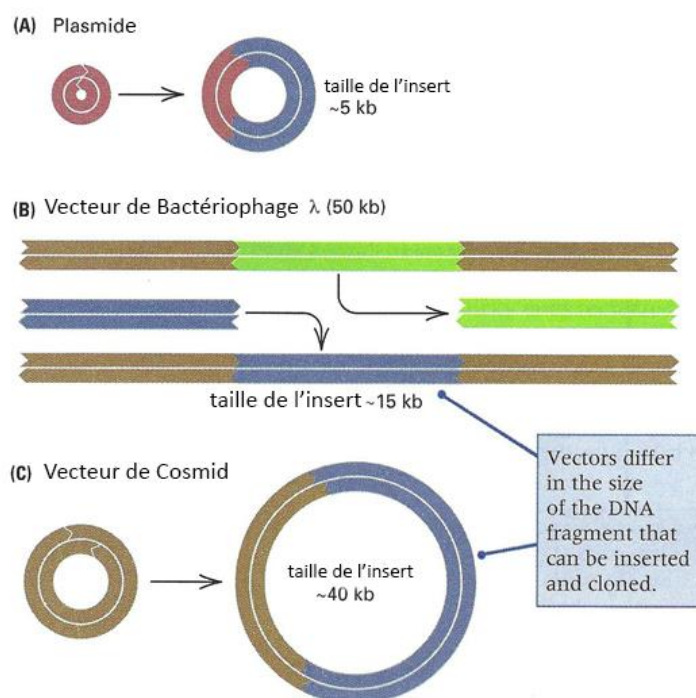
A l'issue de multiples recherches, et sur la base des paramètres déjà mentionnés, nous avons trouvé que le vecteur parfait sera le cosmide pHZ1358 (un vecteurs hybride : phage lambda-plasmide) c'est un vecteur largement utilisé pour des expériences ciblées de perturbation et de remplacement de gènes chez de nombreux hôtes *Streptomyces* (Sun *et al.*, 2008). Il a montré une grande compatibilité avec notre étude pour deux raisons majeures :

1. La taille de l'insert qu'il peut contenir est compatible avec la taille de notre gène d'intérêt.
2. Ses sites polylinker contiennent des sites de reconnaissance de la même enzyme qui a été utilisée pour isoler le gène de la Teixobactine.

### 4.2.3. La taille des fragments à insérer:

Après avoir digéré l'ADN d'*E.terrae*, le fragment de restriction contenant le gène d'intérêt aura 39614 bases, il sera impossible d'inclure cette séquence d'ADN à l'intérieur des vecteurs communs comme les plasmides par exemple (car ils n'autorisent que 8K de bases pour être inclus)

Pour le cas du cosmide pHZ1358, la taille du fragment inséré peut atteindre 40 - 50 kb, dès que notre fragment de restriction possède 39614 bases, son insertion dans le cosmide pHZ1358 sera certainement réussie.



**Figure 10:** Un plan explicatif sur les différences entre les cosmides et les autres vecteurs

(Sun *et al.*, 2008).

### 4.2.4. Les sites polylinker:

L'un des plus grands défis auxquels nous avons été confrontés au cours de nos recherches était de trouver un vecteur avec le bon polylinker, comme nous l'avons déjà dit, l'un des principaux facteurs que nous devons respecter c'est que le vecteur doit posséder un nombre important de sites de restriction uniques pour faciliter le clonage de l'insert, c'est pourquoi il est recommandé que le polylinker doit posséder les mêmes sites de reconnaissance de la même

enzyme de restriction que celle utilisée pour isoler le gène à insérer afin de rendre le vecteur compatible avec l'insert.

L'enzyme de restriction utilisée pour isoler le gène de la Teixobactine est l'enzyme *AbaI*, son site de restriction est TGATCA, donc le polylinker du vecteur doit également inclure ce même site à l'intérieur de lui-même afin que nous puissions assurer la procédure de clonage.

Puisque les cosmides étaient la seule option pour nous pour résoudre le problème de la taille de l'insert, notre recherche s'était limitée que sur eux pour trouver le bon polylinker.

Et encore une fois, à cause de nos ressources limitées et modestes, il était extrêmement difficile de trouver le bon cosmide qui devrait contenir un polylinker incluant le site de restriction d'*AbaI*. Nous avons dû rechercher tous les résultats possibles dans le GenBank pour chaque cosmide existant dans leur base de données, nous avons recherché manuellement dans les génomes de chaque cosmide pour trouver des sites de reconnaissance TGATCA, et nous avons dû nous assurer qu'il existe dans leur zone polylinker, car sinon cela va affecter le processus de réplication du cosmide.

Et heureusement, nous avons réussi à trouver le cosmide parfait ; le cosmide pHZ1358, il possède quatre sites de restriction pour *AbaI*, la carte génétique suivante montre leurs positions:



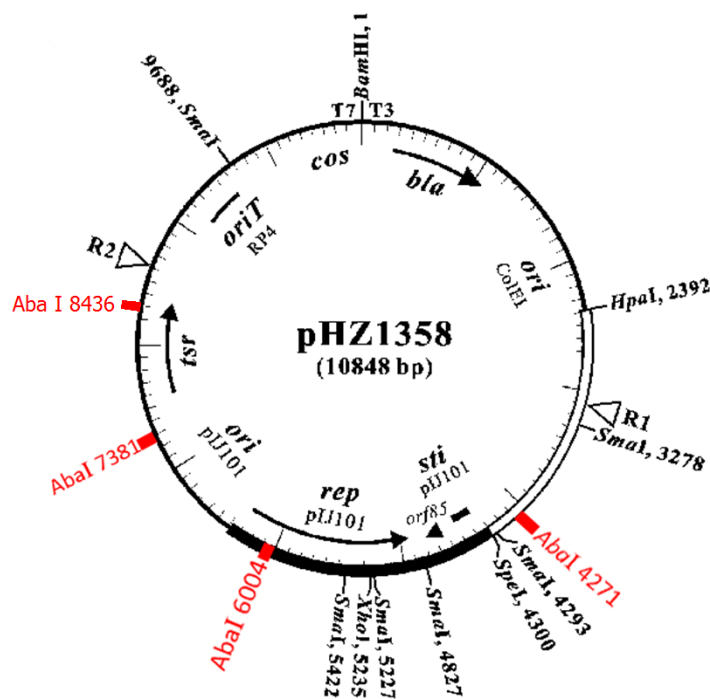


Figure 11: La carte génétique du cosmide pHZ1358 (Sun *et al.*, 2008).

comme il est montré, non seulement pHZ1358 est compatible avec la taille de notre insert et possède les bons sites de restriction pour l'inclure, mais le génome respecte également tous les autres critères que nous avons cités précédemment :

- Ils contiennent **un gène de résistance aux antibiotiques** (ampicilline) et un poly-linker où on peut insérer l'ADN d'intérêt.
- Un gène de sélection **LacZ** qui code pour la  $\beta$ -galactosidase, ( qui nous aide à savoir que notre vecteur contient réellement le gène inséré, l'insertion de notre gène bloquera la fonction du gène *LacZ* ce qui ne permet pas aux cellules hôtes d'exprimer l'enzyme de  $\beta$ -galactosidase)
- De plus, un site *cos* d'un virus lambda a été inclus dans leur ADN circulaire ce qui permettra au cosmide d'être empaqueté dans la tête d'un virus lambda, par ce mécanisme l'incorporation du cosmide recombiné dans les bactéries (transduction) sera plus facile que les autres vecteurs.

Avec toutes ces informations que nous avons recueillies, nous constatons que le fragment de restriction sera totalement compatible avec ce vecteur, la ligature sera réussie et nous pourrons passer avec succès à l'étape suivante du clonage.

### **4.3. La sélection de la cellule hôte appropriée:**

À ce stade, nous aurons déjà créé un ADN recombiné, nous avons réussi à isoler notre gène cible (le gène responsable de la biosynthèse de la Teixobactine, nous avons défini l'enzyme de restriction parfaite pour son isolement et le vecteur parfait qui le contiendra. Il ne nous reste plus qu'à trouver l'hôte cellulaire parfait qui contiendra notre ADN recombiné, une cellule qui assurera de créer trop de copies de notre gène lors de sa réplication, et surtout une cellule qui assurera l'expression de ce gène, qui traduira la biosynthèse de la Teixobactine à l'échelle industrielle.

En d'autres termes, nous allons littéralement créer un organisme génétiquement modifié (OGM) qui est capable de produire la Teixobactine, à l'origine, *Eleftheria terrae* est la bactérie responsable à l'origine de sa biosynthèse, mais il n'est pas possible de l'utiliser en raison de ses caractéristiques limitées d'être une bactérie VNC. En parlant de cela, la nouvelle cellule hôte qui contient notre gène de la Teixobactine doit avoir des caractéristiques spécifiques, afin de s'assurer de son efficacité lorsque nous l'utilisons pour produire cet antibiotique.

#### **4.3.1. Le choix de la cellule hôte:**

Lors du choix d'une cellule hôte, celle-ci doit avoir les caractéristiques suivantes:

- ✓ La cellule doit avoir une bonne incorporation du DNA vecteur (transformation, infection, transfection)
- ✓ La compétence et la compatibilité avec les fonctions du gène inséré.
- ✓ Avoir une croissance rapide.
- ✓ une croissance dans des milieux non coûteux.
- ✓ une absence de pathogénicité.
- ✓ Stabilité (Aryal, 2018).

Puisqu'on va insérer le gène de la Teixobactine à l'intérieur de la cellule hôte, alors il faut bien évidemment choisir une cellule qui n'est pas inclus dans la liste des cibles de cet antibiotique. Les études ont montré que la Teixobactine est spécialisée contre les bactéries à Gram positif, donc notre hôte choisi doit être une bactérie à Gram négatif.

Nous avons choisi spécifiquement les cellules bactériennes et non les autres types de micro-organismes en raison du choix du vecteur qui a été utilisé ; un vecteur cosmide. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les cosmides ont un site "cos", un gène issu du bactériophage lambda ce qui permettra au vecteur recombiné d'être empaqueté dans la tête d'un virus lambda.

Le virus lambda est officiellement connu comme un virus qui infecte spécifiquement l'espèce bactérienne *Escherichia coli*, ce qui signifie que notre cellule hôte choisie sera *E. coli*.

**Remarque:** La Teixobactine n'est pas efficace contre les bactéries à Gram négatif en raison de la barrière membranaire externe, comme en témoigne le fait que la Teixobactine a montré une bonne activité contre la souche *Escherichia coli asmB1* dont la membrane externe est déficiente. à part cette souche, la Teixobactine n'a aucun effet contre les autres souches d'*E.coli*, et nous pouvons l'utiliser avec succès pour nos recherches. (Ling et al, 2015)

#### 4.3.2. Caractéristiques et avantages d'*E.coli* comme hôte:

- ✓ Simplicité génétique : la taille de génome d'*E. coli* est relativement petit par rapport aux eucaryotes
- ✓ Bien étudié : Le génome d'*E. coli* a été le premier à être complètement séquencé (en 1997). En conséquence, *E. coli* est le micro-organisme le plus étudié.
- ✓ Taux de croissance : Les bactéries se développent généralement beaucoup plus rapidement que les organismes plus complexes. *E. coli* se développe rapidement à un rythme d'une génération toutes les 20 minutes dans des conditions de croissance typiques, de sorte que nos résultats expérimentaux génétiques en quelques heures au lieu de plusieurs jours, mois ou années.
- ✓ Caractéristique pertinente : La plupart des techniques de clonage de gènes ont été développées à l'aide de cette bactérie et sont toujours plus performantes et efficaces

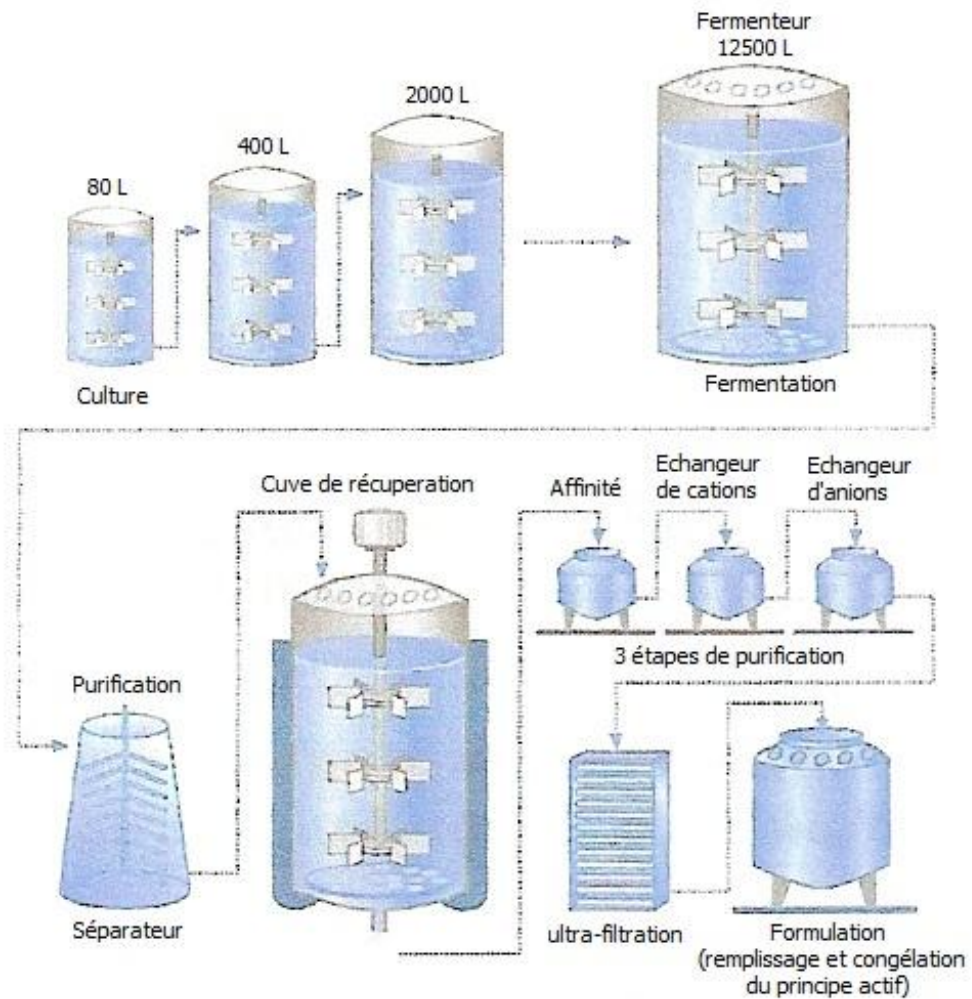
chez *E. coli* que chez d'autres micro-organismes. En conséquence, la préparation de cellules compétentes (cellules qui absorberont l'ADN étranger) n'est pas compliquée. Les transformations avec d'autres micro-organismes sont souvent moins réussies.

- ✓ Sécurité : *E. coli* se trouve naturellement dans le tractus intestinal des humains et des animaux où il contribue à fournir des nutriments. Malgré la mauvaise réputation d'une souche particulièrement toxique (O157:H7), les souches d'*E. coli* sont relativement inoffensives lorsqu'elles sont manipulées avec une hygiène raisonnable (Cronan, 2014).

en passant par toutes les procédures précédentes, nous pourrions éventuellement créer un organisme génétiquement modifié, une nouvelle souche d'*Escherichia coli* qui possède un nouveau gène capable de lui faire produire le meilleur antibiotique de notre temps : la Teixobactine. et nous avons décidé de donner une référence à notre souche en tant que : *Escherichia coli (txo21)*.

#### **4.4. La méthode proposée pour la production industrielle de la Teixobactine:**

La fermentation est la méthode couramment utilisée pour fabriquer des antibiotiques naturels: après avoir sélectionné et conservé la souche bactérienne d'*Escherichia coli (txo21)* qui est capables de produire de fortes quantités de la Teixobactine, on va la mettre en culture dans des grands fermenteurs avec des précurseurs chimiques particuliers pour orienter la fabrication naturelle d'un antibiotique précis. La fermentation est le première pas pour la fabrication d'antibiotiques de semi-synthèse, qui est suivie de traitements chimiques simples pour obtenir le composé souhaité (Du *et al.*, 2015).



**Figure 12:** Schéma qui représente la production des produits pharmaceutique à l'aide de fermenteurs (Kroschwitz, 1992)

**Remarque:**

Nos découvertes et méthodes étaient purement originales, elles peuvent faire une énorme différence dans l'utilisation de cet antibiotique qui conduira éventuellement, avec le bon usage, à une révolution dans le domaine médical.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la recherche préliminaire pour les méthodes et les exigences de clonage représente 50% du progrès du travail de recherche, personne ne peut jamais progresser ou procéder à un travail pratique sans d'abord passer par ces étapes et procédures.

En raison des lois strictes concernant la prévention du virus corona, les restrictions qui interdisent de travailler à l'intérieur des laboratoires, le manque de laboratoires disposant des bons outils et instruments pour notre recherche, le manque de technologie, le manque de soutien financier et l'absence de souche bactérienne originale pour la manipulation, nous n'avons malheureusement pas pu faire de travaux pratiques. Toutes les recherches que nous avons mentionnées auparavant étaient sur papier, mais nous avons pu définir un protocole parfait pour notre recherche, il ne reste plus qu'à trouver les bons instruments pour commencer à travailler.

Pour le moment nous conservons cette recherche pour nos futures études doctorales jusqu'à ce que nous puissions enfin le faire.

Pour le moment, notre travail reste toujours théorique, nous préconisons de le réaliser sur des paillasse d'un laboratoire nationale ou internationale, et ce est destiné d'être publié dans des revues scientifiques.

## Protocole proposé pour la méthode du clonage:

Cette partie se concentre principalement sur la méthode de clonage que nous avons proposé dans le chapitre 6 pour résoudre le problème de la production de Teixobactine à l'échelle industrielle. C'est le fruit de longues recherches et d'un travail bien organisé afin de créer un protocole qui stimule le processus de création d'un nouvel organisme génétiquement modifié capable de produire la Teixobactine. Nous avons utilisé des sou

rces fiables pour ces procédures qui ont été utilisées dans un but similaire, et qui ont également utilisé une entérobactérie similaire à la nôtre afin de créer un nouvel OGM, ce qui signifie que la seule exception c'est que nous avons utilisé un gène d'intérêt différent pour la recombinaison et le clonage.. et finalement nous pourrions aboutir aux mêmes résultats qui feront le succès du processus.

La procédure passera par 8 étapes principales afin de créer notre nouvel OGM et de l'utiliser pour la production industrielle, les procédures sont :

1. Isolement et purification de l'ADN d'*E. terrae*
2. Digestion par l'enzyme de restriction
3. Électrophorèse sur gel d'agarose
4. Ligature insert-vecteur
5. La transduction génétique
6. Détection des cellules qui contiennent le gène d'intérêt
7. Conservation de la souche bactérienne productrice
8. Production à l'échelle industrielle

### Remarque :

Comme nous l'avons mentionné précédemment, En raison des lois strictes concernant la prévention du virus corona, les restrictions qui interdisent de travailler à l'intérieur des laboratoires, le manque de laboratoires disposant des bons outils et instruments pour notre recherche, le manque de soutien financier et l'absence de souche bactérienne originale pour la manipulation, nous n'avons malheureusement pas pu faire de travaux pratiques. Toutes les

recherches que nous avons mentionnées auparavant sont théoriques. Néanmoins, elles nous ont permis d'établir un protocole que nous jugeons fiable et qui ne demande qu'à être appliqué si les moyens lui sont fournis par un laboratoire.

### 1. Isolement et purification de l'ADN d'*E. terrae*:

Les méthodes utilisées pour l'isolement de l'ADN des bactéries à Gram négatif sont beaucoup plus simples que les méthodes utilisées pour les bactéries à Gram positif, puisque *E.terrae* est une bactérie à Gram négatif, l'isolement de son ADN sera fluide et la plupart des étapes utilisées pour les bactéries à Gram positif peut être sauté (comme l'utilisation d'EDTA, certaines incubations et autres lyses enzymatiques). Le rendement et la pureté des acides nucléiques sont deux éléments importants pour assurer l'efficacité et la fiabilité des analyses (Miller *et al.*, 1988).

#### Matériel / Réactifs:

- Une solution bactérienne de la souche d'*E.terrae*.
- Microtubes à centrifuger de 1,5 ml
- bain-marie, 80°C
- bain-marie, 37°C
- isopropanol, température ambiante
- 70% d'éthanol, température ambiante
- bain-marie, 65°C (facultatif ; pour une réhydratation rapide de l'ADN)
- Microcentrifugeuse
- Mixeur: Vortex
- Micropipettes

#### Procédure:

1. On ajoute 1 ml d'une culture d'*E.terrae* d'une nuit dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml.
2. On centrifuge à 13 000 - 16 000 × g pendant 2 minutes pour sédimenter les cellules. Retirez le surnageant.
3. On ajoute 600µl de solution de lyse des noyaux. Pipeter doucement jusqu'à ce que les cellules soient remises en suspension.
4. Incuber à 80°C pendant 5 minutes pour lyser les cellules ; puis refroidir à température ambiante.
5. Ajouter 3µl de solution de RNase au lysat cellulaire. Retourner le tube de 2 à 5 fois pour mélanger.
6. Incuber à 37°C pendant 15 à 60 minutes. Refroidir l'échantillon à température ambiante.
7. Ajouter 200µl de solution de précipitation de protéines au lysat cellulaire traité à la RNase. Vortexer vigoureusement à grande vitesse pendant 20 secondes pour mélanger la solution de précipitation de protéines avec le lysat cellulaire.
8. Incuber l'échantillon sur de la glace pendant 5 minutes.
9. Centrifuge à 13 000-16 000 × g pendant 3 minutes.
10. Transférer le surnageant contenant l'ADN dans un tube de microcentrifugation propre de 1,5 ml contenant 600 l de pièce température isopropanol.



**N.B:** Un peu de surnageant peut rester dans le tube d'origine contenant le culot de protéines. Laissez ce liquide résiduel dans le tube pour éviter de contaminer la solution d'ADN avec la protéine précipitée.

11. Mélanger doucement par inversion jusqu'à ce que les brins filiformes d'ADN forment une masse visible.
12. Centrifuge à 13 000-16 000 × g pendant 2 minutes.
13. Vider délicatement le surnageant et égoutter le tube sur du papier absorbant propre. Ajouter 600µl de température ambiante 70% d'éthanol et inverser doucement le tube plusieurs fois pour laver le culot d'ADN.
14. Centrifuge à 13 000-16 000 × g pendant 2 minutes. Aspirez soigneusement l'éthanol.
15. Égoutter le tube sur du papier absorbant propre et laisser le culot sécher à l'air pendant 10 à 15 minutes.
16. Ajouter 100µl de solution de réhydratation d'ADN dans le tube et réhydrater l'ADN en incubant à 65°C pendant 1 heure. Mélanger périodiquement la solution en tapotant doucement le tube. Alternativement, réhydrater l'ADN en incubant le solution toute la nuit à température ambiante ou à 4°C.
17. Conserver l'ADN à 2-8°C (Miller *et al.*, 1988).

## 2. Digestion par l'enzyme de restriction:

Il s'agit d'un protocole pour une digestion préparatoire, qui consiste à couper l'ADN pour le préparer à la ligation avec un autre morceau d'ADN. Nous devons viser à configurer le condensé de notre fragment et de notre vecteur en même temps. Cela nous fera gagner du temps plus tard.

### Materiel:

- Chambre d'électrophorèse
- Pipetman

### Réactifs

- L'ADN d'*E.terrae*
- Cosmide pHZ1358
- Enzyme de restriction appropriée : *AbaI*
- Tampon de digestion de restriction.
- Colorant de chargement de gel
- Tampon d'électrophorèse
- Pointes de pipette

### 2.1 Digestion de l'ADN d'*E. terrae*:

1. Dans un tube de 1,5 ml, combinez les éléments suivants :
  - 1 µg d'ADN d'*E.terrae*.
  - 1 µL d'enzyme de restriction *AbaI*
  - 3 µL de tampon
  - 3 µL BSA (si recommandé par le fabricant)
  - x µL dH<sub>2</sub>O jusqu'au volume total (30 µL)

2. Mélanger doucement par pipetage
3. Incuber le tube à une température appropriée (généralement 37 °C) pendant 1 heure.  
Suivez toujours les instructions du fabricant
4. Visualiser les résultats de votre digestion en effectuant une électrophorèse sur gel.

## 2.2 Digestion du cosmide pHZ1358:

1. Dans un tube de 1,5 ml, combinez les éléments suivants :
  - 10-20 µL du cosmide pHZ1358
  - 1.5-2 µL d'enzyme de restriction *Abal*
  - 10 µL de tampon
  - 3 µL BSA (si recommandé par le fabricant)
  - x µL dH<sub>2</sub>O jusqu'au volume total (70 ou 100µL)
2. Mélanger doucement par pipetage
3. Incuber le tube à une température appropriée (généralement 37 °C) pendant 1 heure.  
Suivez toujours les instructions du fabricant
4. Visualiser les résultats de votre digestion en effectuant une électrophorèse sur gel (Addgene, 2017).

## 3. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel est la procédure standard de laboratoire pour séparer l'ADN par taille pour la visualisation et la purification. L'électrophorèse utilise un champ électrique pour déplacer l'ADN chargé négativement à travers une matrice de gel d'agarose vers une électrode positive. Les fragments d'ADN plus courts migrent à travers le gel plus rapidement que les plus longs. Ainsi, vous pouvez déterminer la longueur approximative d'un fragment d'ADN en l'exécutant sur un gel d'agarose à côté d'une échelle d'ADN (une collection de fragments d'ADN de longueurs connues).

C'est par cette méthode qu'on peut déterminer, isoler et purifier les fragments de restriction.

### Matériel / Réactifs:

- Plateau de coulée
- Bien peignes
- Source de voltage
- Boîte de gel
- source de lumière UV
- Four micro onde
- Tampon TAE (pour Tris, Acétate, EDTA)
- Agarose
- Ethidium bromide (stock concentration de 10 mg/mL)

### 3.1 Chargement des échantillons d'ADN et l'utilisation du gel d'agarose :

1. Ajoutez du tampon de chargement à chacun de vos échantillons d'ADN.

**Remarque :** le tampon de charge sert à deux fins :

- il contient un pourcentage élevé de glycérol qui augmente la densité de votre échantillon d'ADN, le faisant se déposer au fond du puits de gel, au lieu de se diffuser dans le tampon.
- il fournit un colorant visible qui facilite le chargement du gel et vous permet d'évaluer dans quelle mesure l'ADN a migré.

2. Une fois solidifié, placez le gel d'agarose dans la boîte à gel (unité d'électrophorèse).
3. Remplissez la boîte de gel avec 1xTAE jusqu'à ce que le gel soit recouvert.
4. Chargez soigneusement une échelle de poids moléculaire dans la première voie du gel.
5. Chargez soigneusement vos échantillons dans les puits supplémentaires du gel.
6. Exécutez le gel à 80-150 V jusqu'à ce que la ligne de teinture soit à environ 75-80% de la profondeur du gel. Un temps d'exécution typique est d'environ 1 à 1,5 heures, en fonction de la concentration du gel et de la tension.
7. Coupez l'alimentation de l'électricité, débranchez les électrodes de la source d'alimentation, puis retirez soigneusement le gel de la boîte de gel.
8. À l'aide de n'importe quel appareil doté d'une lumière UV, visualisez vos fragments d'ADN. Les fragments d'ADN sont généralement appelés « bandes » en raison de leur apparence sur le gel.

### 3.2 L'analyse du gel :

La forme la plus simple du diagnostic de digestion est celle dans laquelle nous vérifions la taille de l'insert/cosmide en fonction de pb.

- pour l'insert issue de l'ADN d'*E.terrae*, la taille du fragment de restriction devrait être 39614pb.
- pour le cosmide pHZ1358, la taille du vecteur après la digestion devrait être : 9115pb, 7738pb, 7118pb

### 3.3 Purification du Gel:

1. Une fois que vous avez fait couler votre gel, placez-le dans une boîte UV ouverte, retirez-le de n'importe quel plateau de gel car le plastique bloquera une grande partie des UV et avec un chiffon propre et stérile. lame de rasoir, puis coupez le fragment d'ADN souhaité du gel.
2. Placer le gel dans un tube de micro-centrifugeuse étiqueté.
3. À l'aide d'une balance, peser le tube avec le fragment de gel après avoir remis à zéro la balance avec un tube vide. Alternativement, vous pouvez simplement soustraire le poids du tube vide du poids du tube avec le fragment de gel. Le poids du gel est directement proportionnel à son volume de liquide et il est utilisé pour déterminer la quantité de chaque tampon à ajouter au cours de l'étape d'isolement de l'ADN.

### 3.4 Nettoyage des fragments d'ADN de gel:

Pour extraire les fragments d'ADN digéré du cosmide/insert à partir d'un gel d'agarose, il ne vaut généralement pas la peine d'utiliser autre chose qu'un kit préparé, comme le kit d'extraction de gel GenElute™, n° de catalogue NA1111. Relativement, ils sont très efficaces et ne coûtent pas très chère.

Le principe des kits de colonne de centrifugation consiste à lier l'ADN à quelque chose (généralement une résine de silice, des billes..), puis à éliminer les contaminants, soit en pastillant les billes, soit en lavant la colonne. L'étape d'élution finale libère l'ADN de la résine/des billes/de la colonne pour vous fournir un fragment d'ADN propre (Addgene, 2017).

### 4. Ligation insert-vecteur:

1. Combinez les éléments suivants dans un tube PCR ou Eppendorf.
  - Vecteur pHZ1358 digéré.
  - L'insert (fragment d'ADN qui contient les gènes txo1-txo2).
  - Tampon ligase (1µL/10µL de réaction pour le tampon 10X et 2µL/10µL de réaction pour le tampon 5X)
  - 0,5-1µL d'ADN ligase T4
  - remplir avec H2O jusqu'à total de 10 µL.
2. Incuber à température ambiante pendant 2 heures, ou à 16°C pendant la nuit (en suivant les instructions du fabricant).
3. Procéder à l'étape de la transduction (Addgene, 2017).

### 5. La transduction génétique:

La transduction est le processus qui va assurer l'introduction de l'ADN recombiné à l'intérieur de la cellule hôte d'*E.coli* par utilisation d'un virus lambda (l'ADN recombiné sera compacté à la tête du virus)

#### Materiel:

- Incubateur à agitation à 37°C
- Incubateur stationnaire à 37°C
- Bain-marie à 42°C
- Seau à glace rempli de glace
- Microtubes à centrifuger
- Dispositif d'épandage stérile

### Réactifs:

- Plaque de gélose LB (avec antibiotique approprié: ampicilline)
- Milieu LB ou SOC
- Cellules compétentes d'*Escherichia coli*
- L'ADN recombiné (le gène d'intérêt + cosmide pHZ1358)

### Procédure:

1. Faire sortir les cellules d'*E.coli* compétentes de -80°C et décongeler sur de la glace (environ 20-30 min).
2. Retirer les plaques de gélose (contenant l'ampicilline) du stockage à 4°C et laisser réchauffer à température ambiante puis (facultatif) incuber dans un incubateur à 37°C.
3. Mélanger 1 - 5 ul d'ADN (généralement 10 pg - 100 ng) dans 20-50 ul de cellules compétentes d'*E.coli* dans une microcentrifugeuse ou un tube Falcon. Mélangez doucement en tapotant le fond du tube avec votre doigt plusieurs fois.
4. Incuber le mélange cellule/ADN compétent sur de la glace pendant 20-30 minutes.
5. Faites un choc thermique sur chaque tube de transduction en plaçant le fond 1/2 à 2/3 du tube dans un bain-marie à 42°C pendant 30-60 secondes.
6. Remettre les tubes sur la glace pendant 2 min.
7. Ajouter 250 à 1 000 l de milieu LB ou SOC (sans antibiotique) aux bactéries et cultiver dans un incubateur à agitation à 37 ° C pendant 45 min
8. Plaque tout ou partie de la transduction sur une plaque de gélose LB de 10 cm contenant l'antibiotique approprié.
9. Incuber les plaques à 37°C pendant la nuit (Addgene, 2017).

- les cellules qui contiennent le vecteur recombiné survivront à l'intérieur du milieu qui contient de l'ampicilline (car pHZ1358 contient un gène de résistance à l'ampicilline)

### 6. Détection des cellules qui contiennent le gène d'intérêt:

Comme on a déjà mentionné, le vecteur pHZ1358 contient un gène de résistance à l'ampicilline, donc en passant par l'étape précédente nous pouvons filtrer les cellules qui contiennent le vecteur pHZ1358, mais nous ne savons toujours pas si le vecteur contient le gène Teixobactine ou non (nous ne savons pas encore si la ligature des fragments d'ADN a réussi), et pour cela nous devons utiliser la technique de criblage bleu-blanc qui va nous permettre de détecter les cellules avec le gène d'intérêt.

A l'intérieur du vecteur pHZ1358, plus précisément dans le polylinker (la région où l'on a inséré le gène d'intérêt) il y a un gène *lacZ* qui code pour la B-galactosidase responsable de la dégradation du lactose, quand on insère le gène d'intérêt au milieu du gène *lacZ* nous interrompons l'expression de la b-galactosidase qui stoppera sa fonction.

Donc pour cribler les clones contenant de l'ADN recombinant, un substrat chromogène connu sous le nom de X-gal est ajouté à la plaque de gélose. Si la  $\beta$ -galactosidase est produite, le X-gal est hydrolysé pour former le 5-bromo-4-chloro-indoxyle, qui se dimérise spontanément pour produire un pigment bleu insoluble appelé 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo. Les colonies formées par des cellules non recombinantes apparaissent donc de couleur bleue tandis que celles recombinantes apparaissent blanches. Les colonies recombinantes souhaitées peuvent être facilement prélevées et cultivées (Addgene, 2017).

## **7. Conservation de la souche bactérienne productrice :**

Nous allons utiliser un milieu destiné principalement à la conservation des entérobactéries, le principe est que la composition de milieu qui va être utilisée contienne les substances nutritives apportées par l'extrait de viande et la peptone qui favorisent la conservation des souches bactériennes.

### **7.1. Composition du milieu:**

- Extrait de viande: 5 g
- Peptone: 10 g
- NaCl: 5 g
- Agar-Agar: 10 g
- Eau Distillé: 1,000 ml
- pH Final (25°C) =  $7.3 \pm 0.2$

### **7.2. Protocole :**

L'inoculation est basée sur une culture sur milieux solides : Agar Nutritif ou Trypto-Casein-Soy Agar.

- Pour les bactéries aérobies-anaérobies facultatives : plusieurs inoculations centrales à l'aide d'une anse en platine généreusement chargée.

- Pour les bactéries aérobies, inoculation en surface. Incuber à 37°C maximum pendant 24 heures. Une souche bactérienne ensemencée dans ce milieu peut être conservée :

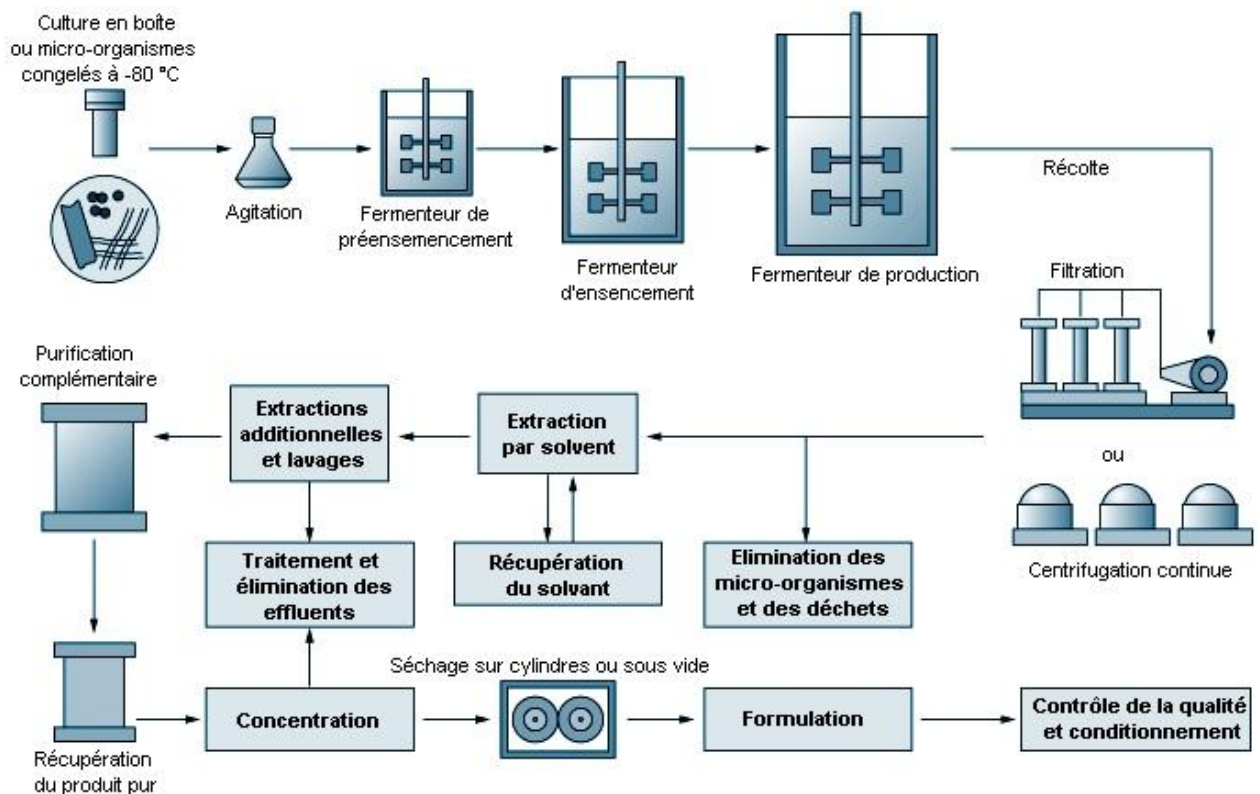
- 1 an à température ambiante
- 3 ans à 4°C

La conservation est optimisée si glycérol ou vaseline se dépose à la surface (Addgene, 2017).

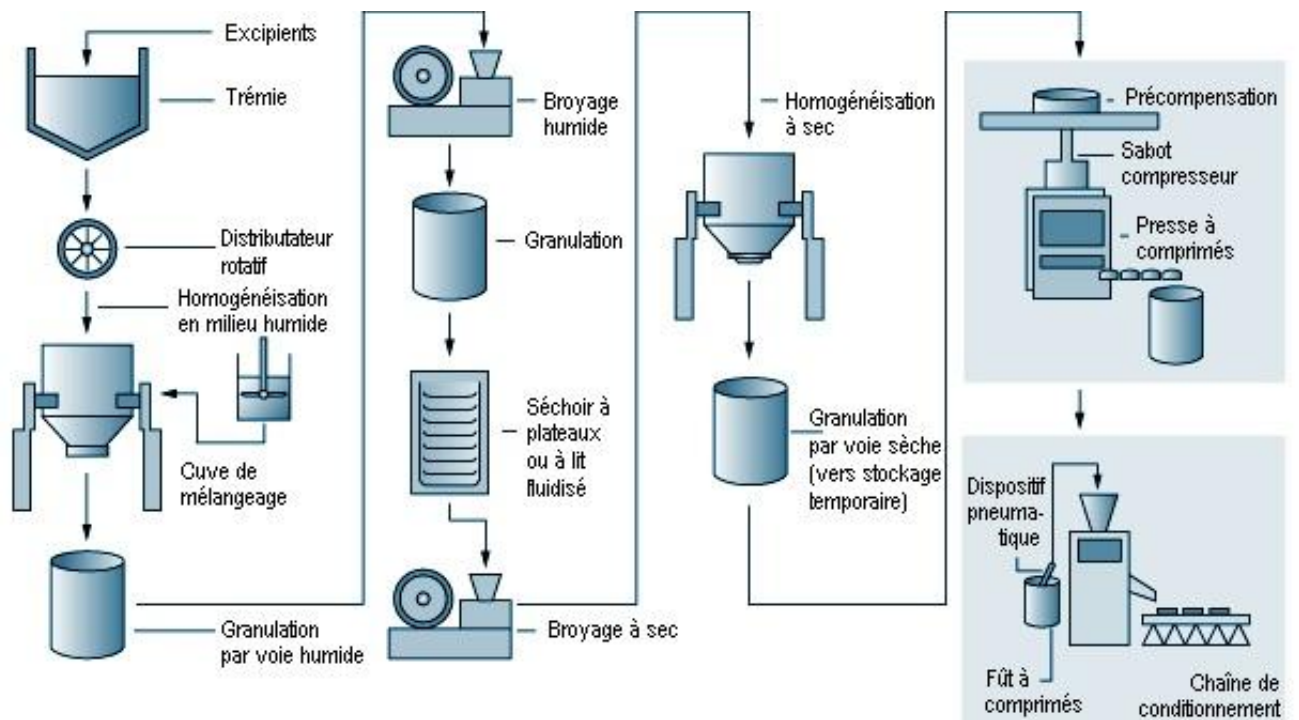
## 8. Production à l'échelle industrielle:

On a choisie la fermentation comme une méthode de la microbiologie industrielle pour être utilisée pour produire la Teixobactine via notre bactérie OGM.

La souche d'*Escherichia coli* (*txo21*) productrice de la Teixobactine sera cultivée dans de grands conteneurs (100 000 à 150 000 litres ou plus) contenant un milieu de croissance liquide. La concentration en oxygène, la température, le pH et les nutriments sont étroitement contrôlés. Comme les antibiotiques sont des métabolites secondaires, la taille de la population doit être contrôlée très soigneusement pour s'assurer que le rendement maximum est obtenu avant que les cellules ne meurent. Une fois le processus terminé, La Teixobactine doit être extraite et purifiée en un produit cristallin. Ceci est plus facile à réaliser si l'antibiotique est soluble dans un solvant organique. Sinon, il doit d'abord être éliminé par échange d'ions, adsorption ou précipitation chimique.



**Figure 13:** Schéma du processus de la production de la Teixobactine par fermentation (Kroschwitz, 1992)



**Figure 14:** Schéma de fabrication de comprimés contraceptifs pour administration par voie orale (Anastas, 1984)



## Discussion

Cette étude, en addition des travaux antérieurs montrent que de nouveaux organismes tels que des bactéries non cultivées sont capables d'héberger de nouveaux agents antimicrobiens. Après une longue exploitation de bactéries non cultivées on a finalement fini par la découverte de la Teixobactine, une molécule prometteuse efficace contre les agents pathogènes résistants aux médicaments dans un certain nombre de modèles animaux d'infection. Le cible de la Teixobactine est le WTA (Wall Teichoic Acids) ; l'antibiotique contribue à une lyse et une destruction efficace de ce précurseur par une digestion de la paroi cellulaire par les autolysines libérées. Ceci montre que les produits naturels ont évolué pour exploiter les faiblesses annexées aux bactéries, et que des composés supplémentaires qui transforment des enzymes importantes en dispositifs de destruction sont susceptibles d'être découverts.

La Teixobactine se lie à plusieurs cibles, dont aucune n'est une protéine. Les précurseurs de l'enveloppe cellulaire couplés au polyprényle, tels que le lipide II, sont facilement accessibles à l'extérieur des bactéries Gram-positives et représentent un «talon d'Achille» pour l'attaque de l'antibiotique. La cible de la Teixobactine est le fragment pyrophosphate-sucre de ces molécules, est hautement conservée parmi les eubactéries. Le producteur est une bactérie Gram-négative, et sa membrane externe la protégera de la ré-entrée du composé.

La résistance pourrait éventuellement émerger de la transmission horizontale d'un mécanisme de résistance par une bactérie du sol, et étant donné le motif de liaison à la teixobactine hautement conservé, cela prendrait probablement la forme d'une enzyme modifiant l'antibiotique. Cependant, bien que les déterminants codant pour les enzymes attaquant les antibiotiques fréquemment trouvés tels que les  $\beta$ -lactamines ou les aminosides soient courants, ils sont inconnus pour la rare vancomycine. La teixobactine récemment découverte est encore moins courante que la vancomycine. Après son introduction en clinique, il a fallu 30 ans pour que la résistance à la vancomycine apparaisse. La voie de modification des lipides II entraînant une résistance à la vancomycine provient probablement du producteur de la vancomycine, *Amycolatopsis orientalis*. Il faudra probablement encore plus de temps pour que la résistance à la teixobactine mieux protégée émerge et du coup il faut bien préserver cet antibiotique pour les cas très délicats et graves des infections

bactérienne essentiellement pour éviter l'intervention de la chimiothérapie et autres techniques considérées comme complexes et douloureuses par rapport à l'antibiorésistance.

La teixobactine est le premier membre d'une nouvelle classe d'antibiotiques qui se lie aux lipides II, structurellement distincte des glycopeptides, des lantibiotiques et des défensines. Les propriétés de la teixobactine suggèrent qu'elle a évolué pour minimiser le développement de résistance par les micro-organismes cibles. Il est probable que d'autres composés naturels présentant une sensibilité tout aussi faible à la résistance soient présents dans la nature et attendent d'être découverts.

Aussi, en parlant de la phase de synthèse de cet antibiotique, la voie biologique a montré un meilleur potentiel que la voie chimique, cette dernière se concentre principalement sur la production de cet antibiotique en utilisant des acides aminés pour créer des analogues similaires à cet ATB basés sur la structure de la molécule originale, ce qui peut être un processus très compliqué, coûteux, et très exigeant, alors qu'en revanche, la voie biologique est en réalité possible grâce à la technique de clonage qui permettra d'utiliser le gène responsable de la production de cet antibiotique dans une autre bactérie pouvant être cultivée, et à terme, l'utilisation de ce nouveau micro-organisme génétiquement modifié pour produire cet antibiotique sera un processus très simple, autonome, moins coûteux, rapide et plus productif. Cette procédure peut avoir un impact énorme si nous l'utilisons pour produire des molécules similaires à l'avenir

## Conclusion

Avec toutes les études précédentes, nous pouvons certainement dire que la teixobactine montre un énorme potentiel contre les souches multirésistantes de bactéries pathogènes, et représente un énorme espoir pour se dresser contre la menace de l'antibiorésistance, mais il est encore trop tôt pour conclure quoi que ce soit sur son invincibilité, et c'est pourquoi nous devons l'utiliser avec précaution dans les cas urgents uniquement pour empêcher la création de toute sorte d'antibiorésistance contre lui.

Cette étude a également montré que grâce à l'iChip, les bactéries incultivables peuvent être une source riche de nouvelles molécules qui peuvent sauver l'humanité, et la découverte de la Teixobactine peut être un modèle de recherche pour découvrir de nouvelles molécules similaires.

Nous concluons également que la méthode de clonage peut être une solution pour la production de telles molécules à l'échelle industrielle, par rapport à la voie chimique, la voie biologique pour la production d'antibiotiques a toujours montré un meilleur potentiel et des rendements élevés. C'est une nouvelle procédure qui peut être le début d'une nouvelle ère de recherches pour sauver l'humanité.

## Références bibliographiques :

### A

- Acar J.F., Moulin G.** (2012). Antimicrobial resistance: a complex issue.
- Almakki AQM.** (2017). Résistance aux antibiotiques dans des eaux urbaines péri-hospitalières considérées dans un continuum hydrologique. Doctoral dissertation, université Montpellier.
- Améri A.** (2001). Hypertension intra-crânienne iatrogène antibiotique. Neurologie clinique: Guide pratique.
- Arthur M.** (2016). Teixobactine. université de Paris VI Pierre et Marie Curie.
- Aryal S.** (2018). Gene Cloning- Requirements, Principle, Steps, Applications.

### B

- Barbier F.** (2010). Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* vers l'impasse thérapeutique.
- Bertrand X., Bourgeois-Nicolaos N.** (2015). Fiche espèce anti-infectieux: Glycopeptides.
- Biet I.** (2002). Pneumopathies Iatrogènes Immunoallergiques, *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*.
- Blaser M.** (2011). Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria.
- Bovet D.** (1988). Une Chimie qui guérit : histoire de la découverte des sulfamides, Paris, Payot, coll. « Médecine et sociétés », 322 p.
- Bryskier A.** (2005). Antibiotics and Antibacterial Agents: Classifications and Structure-Activity Relationship, P. 13-38.
- Bumgarner S.** (2010). Use of Ichip for High-Throughput In Situ Cultivation of "Uncultivable" Microbial Species.

### C

- Caillard S.** (2003). Néphropathie interstitielle immuno-allergique. Réanimation.
- Camus G.** (2010). L'altruisme chez les bactéries.
- Cattoir V.** (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Pathologie Biologie, vol. 52, no 10, p. 607–616.
- Cattoir V.** (2010). Les entérocoques résistants aux glycopeptides.
- Cavallo JD.** (2015). Lecture interprétative de l'antibiogramme.
- Coates A., Hu Y., Bax R., Page C.** (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. Nat Rev Drug Discov, p:895–910.
- Coates AR., Hu Y.** (2006). New strategies for antibacterial drug design: targeting non-multiplying latent bacteria. Drugs R D, p:133–151.

**Coates ARM., Halls G., Hu Y.** (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same.

**Costa A.** (2018). Teixobactine : un pas de plus vers le développement du super antibiotique.

**Cronan JE.** (2014). *Escherichia coli* as an Experimental Organism.

**Cushnie TP., Cushnie B., Echeverría J., Fowsantear W., Thammawat S., Dodgson JL., et al.** (2020). Bioprospecting for Antibacterial Drugs: a Multidisciplinary Perspective on Natural Product Source Material, Bioassay Selection and Avoidable Pitfalls. *Pharmaceutical Research*.

## D

**De Kraker M.E.A., Stewardson AJ., Harbarth S.** (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050.

**Dobson R.** (2008). Antibiotics may be linked to risk of cancer.

**Drancourt M.** (2016). Antiquité de la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux*.

**Du., Deyao., Wang., Lu., Tian., Yuqing., Liu, Hao., Tan., Huarong., Niu, Guoqing.** (2015). Genome engineering and direct cloning of antibiotic gene clusters via phage  $\phi$ BT1 integrase-mediated site-specific recombination in *Streptomyces*.

**Dumitrescu O., Dauwalder O., Boisset S., Tristan A.** (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. *Med Sci (Paris)*, 943-949.

## E

**Economou V., Gousia P.** (2015). Agriculture and foodanimals as a source of antimicrobial-resistantbacteria.

## F

**Futura.** (2017). Les antibiotiques réduiraient l'efficacité des cellules immunitaires.

## G

**Gallagher, James.** (2015). Antibiotics: US discovery labelled 'game-changer' for medicine. BBC News website.

**Gaube G.** (2015). Analyse critique de la prescription de daptomycine à l'hôpital Beaujon. *Médecine humaine et pathologie*.

**Garnotel E., Pagés JM.** (2008). Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif.

**Gerard, Wright.** (2015). Antibiotics: An irresistible newcomer.

**Gilbert et co.** (2013). *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy*, 43e édition.

**Giltrap AM., Dowman LJ., Nagalingam G., Ochoa JL., Linington RG., Britton WJ., Payne RJ.** (2016). Total Synthesis of Teixobactin.

**Goossens H.** (2009). Antibiotic consumption and link to resistance.

**Grady D.** (2015) New Antibiotic Stirs Hope Against Resistant Bacteria.

## H

**HAS.** (2011). Avis Tigécycline. Commission de la transparence.

## I

**Inserm.** (2018). Résistance aux antibiotiques, Un phénomène massif et préoccupant.

## J

**Jad YE., Acosta GA., Naicker T., Ramtahal M., El-Faham A., Govender T., Kruger HG., De-la-Torre BG., Albericio F.** (2015). Synthesis and Biological Evaluation of a Teixobactin Analogue.

**Jahl F., Chomarat M., Weber M., Gerard A.** (2012). De l'antibiogramme à la prescription.

## K

**Kroschwitz.** (1992). L'industrie pharmaceutique.

## L

**Leach KL., Brickner SJ., Noe MC., Miller PF.** (2011). Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent.

**Lechaudee D.** (2010). Analyse des bactéries non cultivables.

**Lesieur P.** (2014). Antibiotiques : modes d'action, mécanismes de la résistance.

**Lewis K.** (2017). New antibiotics from the microbial dark matter.

**Limosin A., Bouquet S., Le Guellec C., Rey E., Venisse N.** (2004). Suivi thérapeutique de la rifampicine.

**Ling LL., Schneider T., Peoples AJ., Spoering AL., Engels I., Conlon BP., Mueller A., Schäberle TF., Hughes DE., Epstein S., Jones M., Lazarides L., Steadman VA., Cohen DR., Felix CR., Fetterman KA., Millett WP., Nitti AG., Zullo AM., Chen C., Lewis K.** (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature.

## M

**McCarthy MW.** (2018). Teixobactin: a novel anti-infective agent.

**Meunier O.** (2015). De la découverte des antibiotiques aux bactéries hautement résistantes émergentes. Elsevier Masson SAS, EM. Ionsulte.

**Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F.** (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl. Acids Res.

**Mintzer DM.** (2009). Drug-Induced Hematologic Syndromes. Advances in Hematology.

## N

**Nichols D., Cahoon N., Trakhtenberg EM., Pham L., Mehta A., Belanger A., Kanigan T., Lewis K., Epstein SS.** (2010). Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of uncultivable microbial species.

## O

## P

**PaiMP., Graci DM., Amsden GW.** (2000). Macrolide drug interactions: an update. *Ann Pharmacother.*

**Paradis H., Thirion D., Bergeron L.** (2009). Les allergies croisées aux antibiotiques : comment s'y retrouver.

**Perozziello A., Lescure X., Yazdanpanah Y., Lucet JC.** (2017). Efficacité et cout-efficacité du conseil antibiotique à l'hôpital.

**Pulcini C.** (2017). Les superbactéries peuvent tous nous toucher.

## Q

## R

**Reitz, A. B.; Smith, G.R.; Parker, M.H.** (2009). The Role of Sulfamide Derivatives in Medicinal Chemistry: A Patent Review (2006 – 2008). *Expert Opinion on Therapeutic Patents.*

**Rhyner G., Zahedi K., Stadler P., Hayoz D.** (2010). Hépatotoxicité médicamenteuse due aux antibiotiques.

**Ruppé E et al..** (2013). *Antimicrob Agents Chemother.*

## S

**Sanschagrin A.**(2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *MolMicrobiol* 47, 1–12.

**Shukla R., Medeiros Silva J., Parmar A., Vermeulen BJ., Das S., LuciniPaioni A., Jekhmane S., Lorent J., Bonvin AM., Baldus M., Lelli M., Veldhuizen E., Breukink E., Singh I., Weingarth M.** (2020). Mode of action of teixobactins in cellular membranes.

**Snyder B.** (2016). A microscope shows the bacterium *Eleftheriaterrae*, the basis for the promising new antibiotic Teixobactin, in NovoBiotic's labs in Cambridge, Massachusetts, U.S.

**Servick K.** (2015). Microbe found in grassy field contains powerful antibiotic.

**Stone J.** (2015). Teixobactin And iChip Promise Hope Against Antibiotic Resistance.

**Sun Y., He X., Liang J., Zhou X., Deng Z.** (2008). Analysis of functions in plasmid pHZ1358 influencing its genetic and structural stability in *Streptomyces lividans* 1326.

## T

**Thierry J., Claude JD., Masseron T.** (2000). *Streptococcus Pneumoniae*.

**Trasande L., Blustein J., Corwin E., Blaser MJ.** (2013). Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *International Journal of Obesity.*

**U**

**V**

**Vora S., Auckenthaler R.** (2009). Que signifie bêta-lactamases à spectre élargi en pratique.

**Vuillemin P.** (1890). Antibiose et symbiose, Association française pour l'avancement des sciences, compte rendu de la 18e session, seconde partie, Notes et mémoires, vol (11), p. 525-543.

**W**

**Werth B.** (2020). Antibiotiques polypeptides: bacitracine, colistine, polymyxine B. PharmD, University of Washington School of Pharmacy.

**WHO (World health organization).** (2020). Antimicrobial resistance.

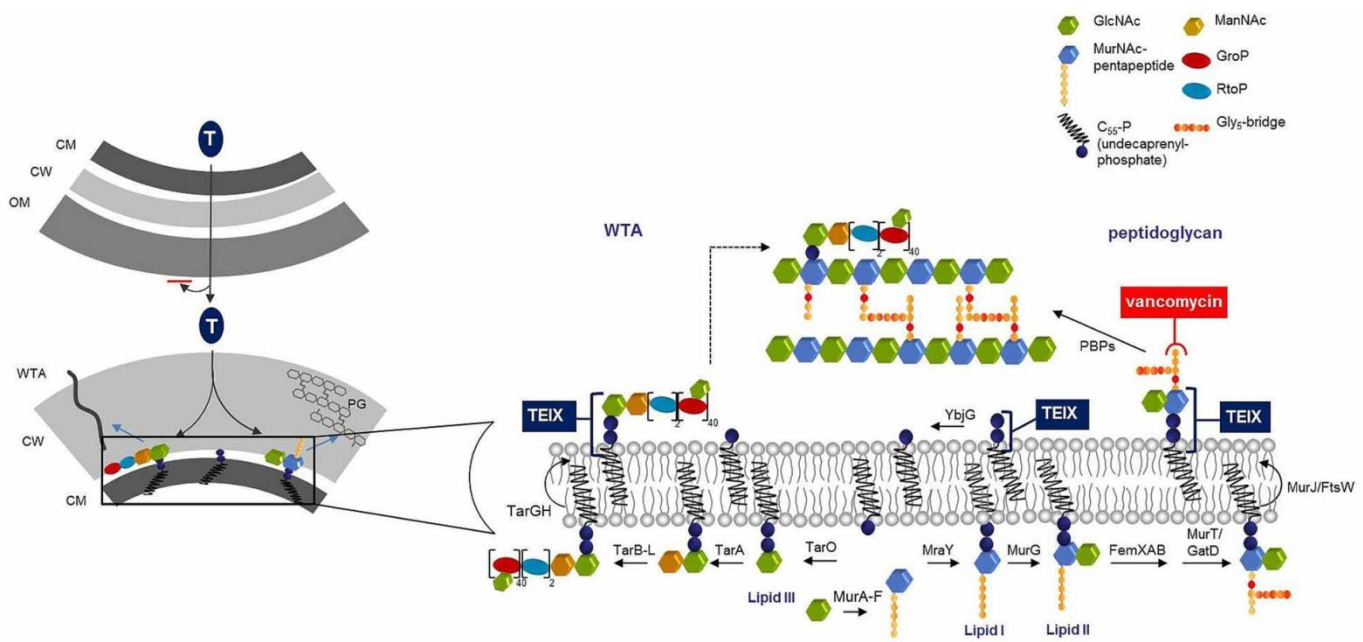
**X**

**Y**

**Z**



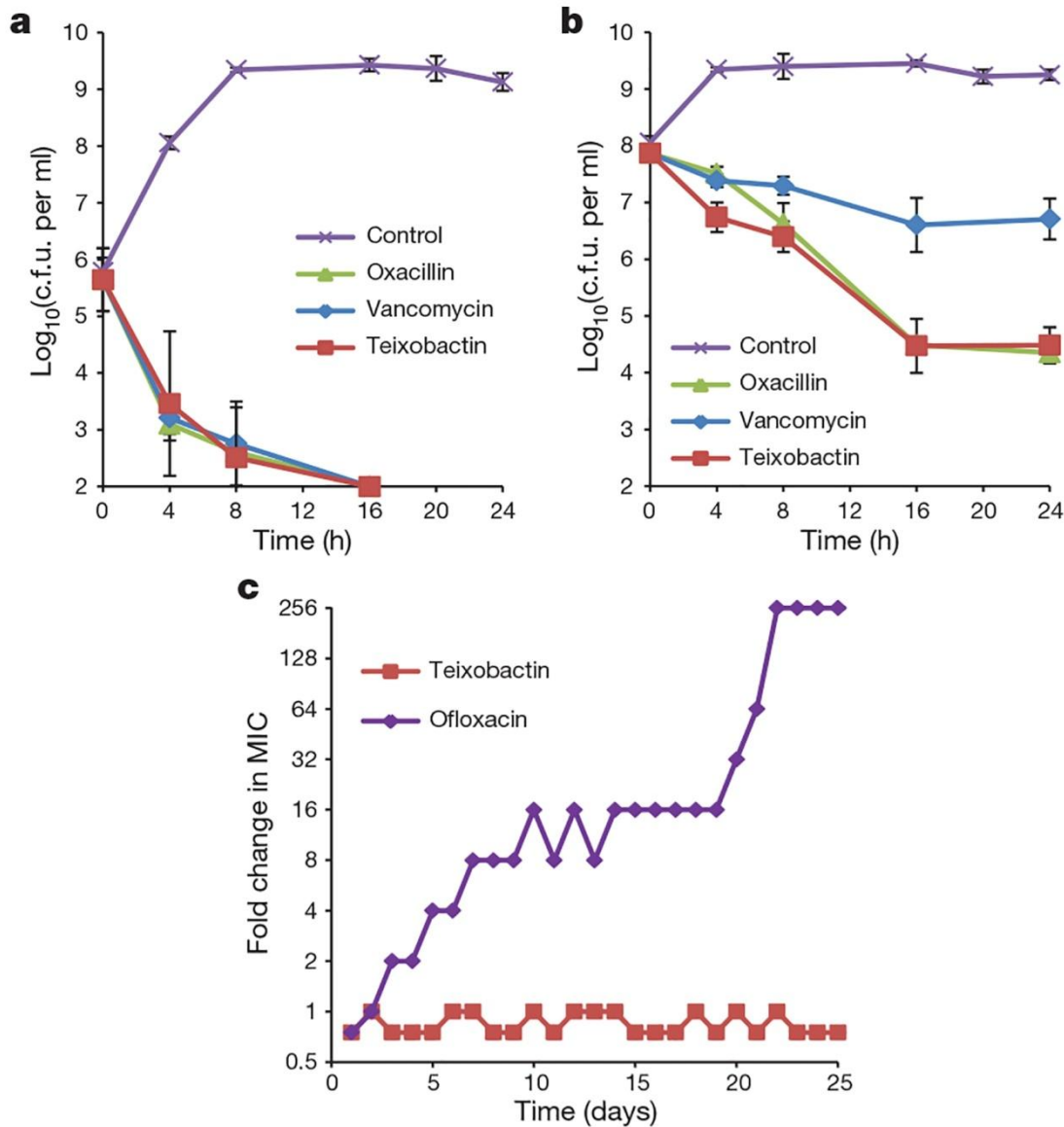
## Annexe 01



**Modèle du mécanisme d'action de la teixobactine (Ling *et al.*, 2015).**

Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire par la teixobactine. Le lipide II, précurseur du peptidoglycane, est synthétisé dans le cytoplasme et retourné à la surface de la membrane interne par MurJ ou FtsW. Le lipide III, un précurseur de l'acide téichoïque de la paroi (WTA), est également formé à l'intérieur de la cellule et les précurseurs liés aux lipides WTA sont transloqués à travers la membrane cytoplasmique par le transporteur ABC TarGH. La teixobactine (TEIX) forme un complexe stoechiométrique avec les précurseurs de la paroi cellulaire, le lipide II et le lipide III. L'enlèvement de ces éléments constitutifs interrompt simultanément la biosynthèse du peptidoglycane (à droite), de l'ATA (à gauche) ainsi que le recyclage des précurseurs. La liaison à plusieurs cibles dans les voies de la paroi cellulaire obstrue la formation d'une enveloppe cellulaire fonctionnelle. Panneau de gauche, ciblage et résistance à la teixobactine. Le producteur de teixobactine est une bactérie à Gram négatif qui est protégée de ce composé en l'exportant en dehors de sa barrière de perméabilité membranaire externe. Les organismes Gram-positifs cibles n'ont pas de membrane externe. CM, membrane cytoplasmique ; CW, paroi cellulaire; OM, membrane externe ; LTA, acide lipotéichoïque; WTA, acide teichoïque de paroi.

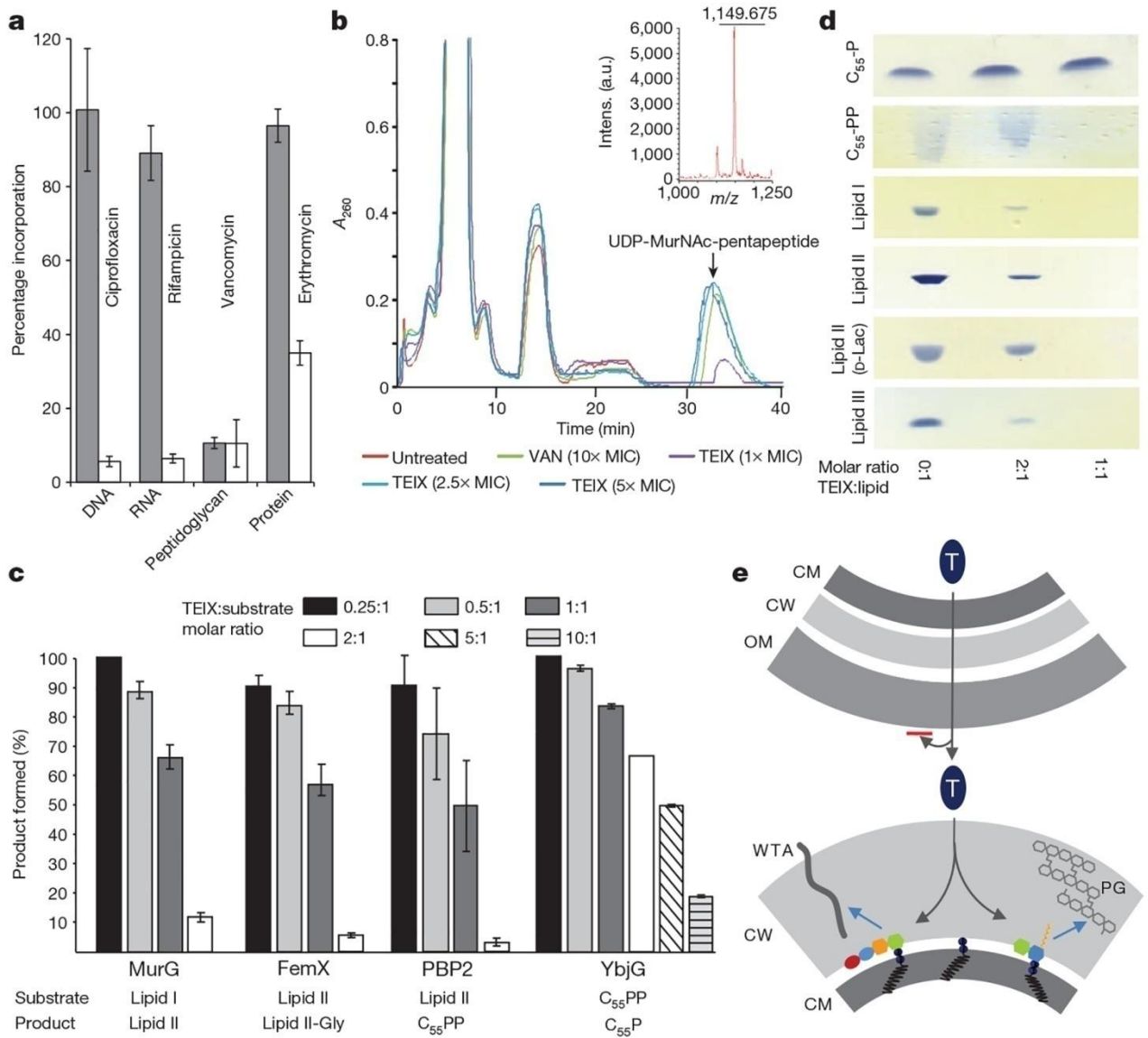
## Annexe 02



**L'élimination des agents pathogènes en fonction du temps par la teixobactine (Ling *et al.*, 2015).**

**a, b,** *S. aureus* a été cultivé jusqu'à la phase exponentielle précoce (**a**) et tardive (**b**) et testés avec des antibiotiques. **c,** Acquisition de résistance lors de passages en série en présence de niveaux inférieurs à la CMI d'antimicrobiens. L'axe des y est la concentration la plus élevée dans laquelle les cellules se sont développées pendant le passage. Pour l'ofloxacine, 256 × CMI était la concentration la plus élevée testée.

## Annexe 03



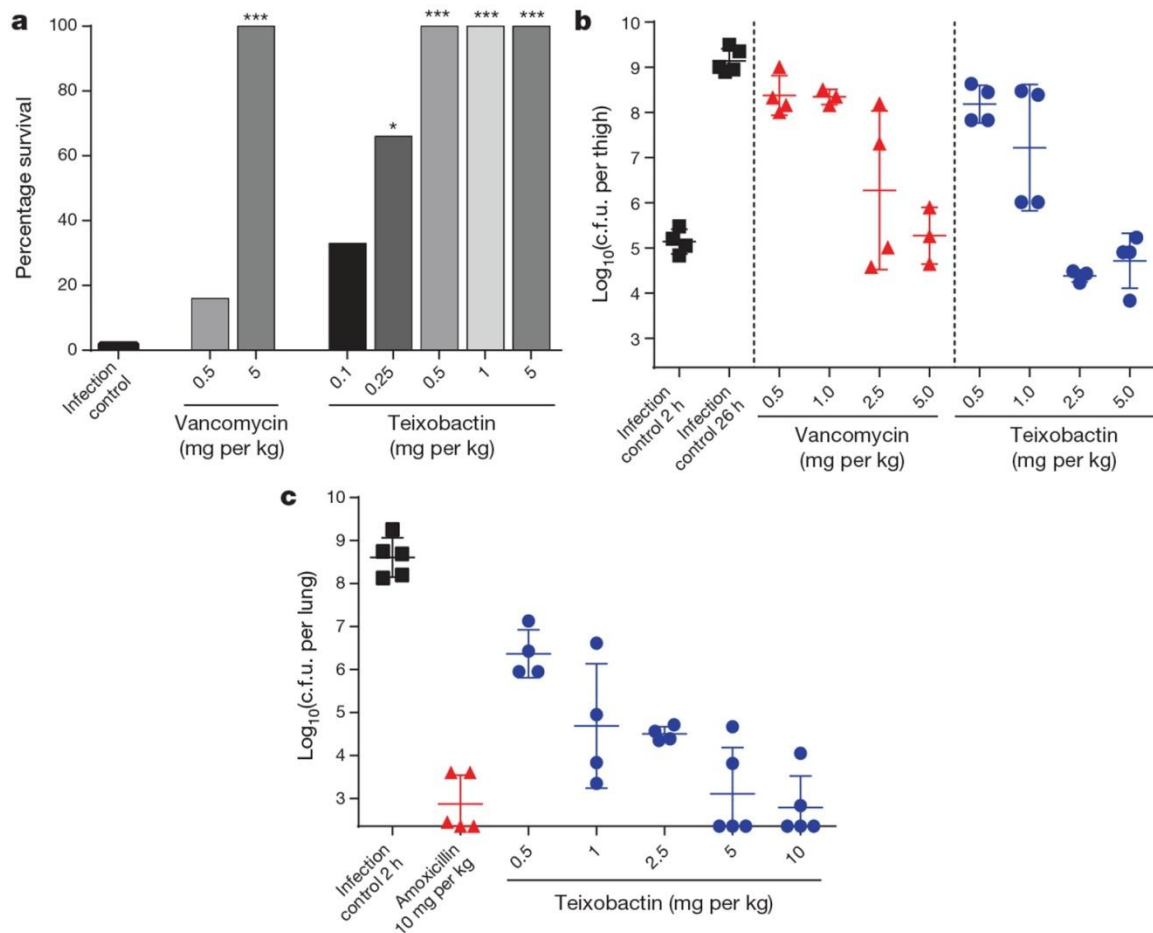
**La liaison de teixobactine aux précurseurs de la paroi cellulaire (Ling *et al.*, 2015).**

**a**, Impact de la teixobactine (TEIX) sur les biosynthèses macromoléculaires chez *S. aureus*. L'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine (ADN), de  $^3\text{H}$ -uridine (ARN), de  $^3\text{H}$ -leucine (protéine) et de  $^3\text{H}$ -glucosamine (peptidoglycane) a été déterminée dans les cellules traitées avec la teixobactine à  $1 \times$  CMI (barres grises). La ciprofloxacine ( $8 \times$  MIC), la rifampicine ( $4 \times$  MIC), la vancomycine ( $2 \times$  MIC) et l'érythromycine ( $2 \times$  MIC) ont été utilisées comme témoins (barres blanches). Les données sont des moyennes de 4 expériences indépendantes  $\pm$  s.d. **b**, Accumulation intracellulaire du précurseur de la paroi cellulaire UDP-MurNAc-pentapeptide après traitement de *S. aureus* avec la teixobactine. Des cellules non traitées et traitées à la vancomycine (VAN) ( $10 \times$  MIC) ont été utilisées

comme témoins. UDP-MurNAc-pentapeptide a été identifié par spectrométrie de masse comme indiqué par le pic à  $m/z$  1 149,675. L'expérience est représentative de 3 expériences indépendantes.

**c**, L'effet de la teixobactine sur les réactions de consommation de précurseurs. Les expériences ont été réalisées dans 3 répétitions biologiques et les données sont présentées en moyenne  $\pm$  s.d. **d**, Formation complexe de teixobactine avec des précurseurs de paroi cellulaire purifiés. La liaison de la teixobactine est indiquée par une réduction de la quantité d'intermédiaires lipidiques (visible sur le chromatogramme en couche mince). **e**, Un modèle de ciblage et de résistance à la teixobactine. Le producteur de teixobactine est une bactérie Gram-négative protégée contre ce composé en l'exportant à travers la barrière de perméabilité de la membrane externe (panneau supérieur). Dans les organismes Gram-positifs cibles dépourvus de membrane externe, les cibles sont facilement accessibles à l'extérieur où la teixobactine se lie aux précurseurs du peptidoglycane (PG) et du WTA. CM, membrane cytoplasmique ; CW, paroi cellulaire; OM, membrane externe ; T, teixobactine.

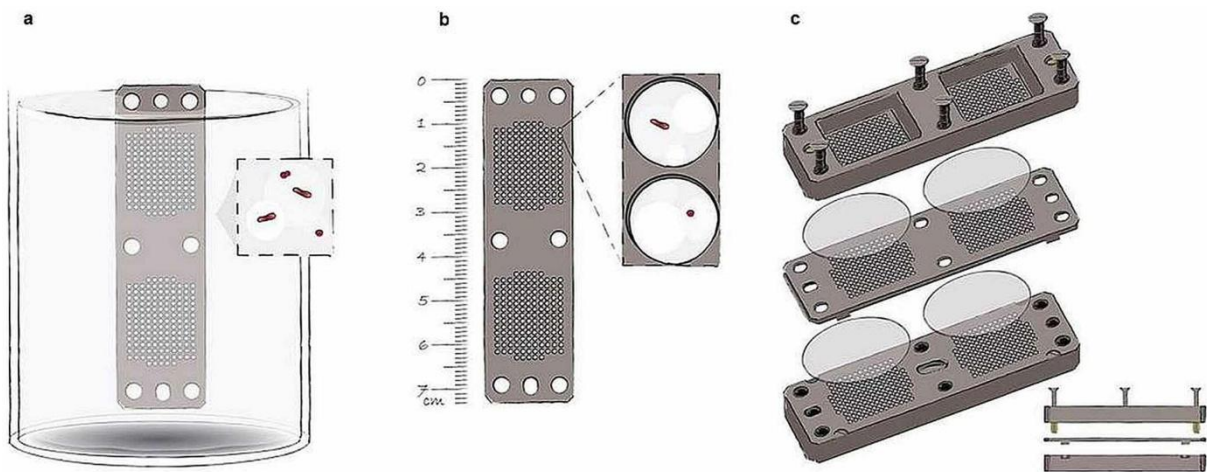
## Annexe 04



### La teixobactine est efficace dans trois modèles murins d'infection (Ling *et al.*, 2015).

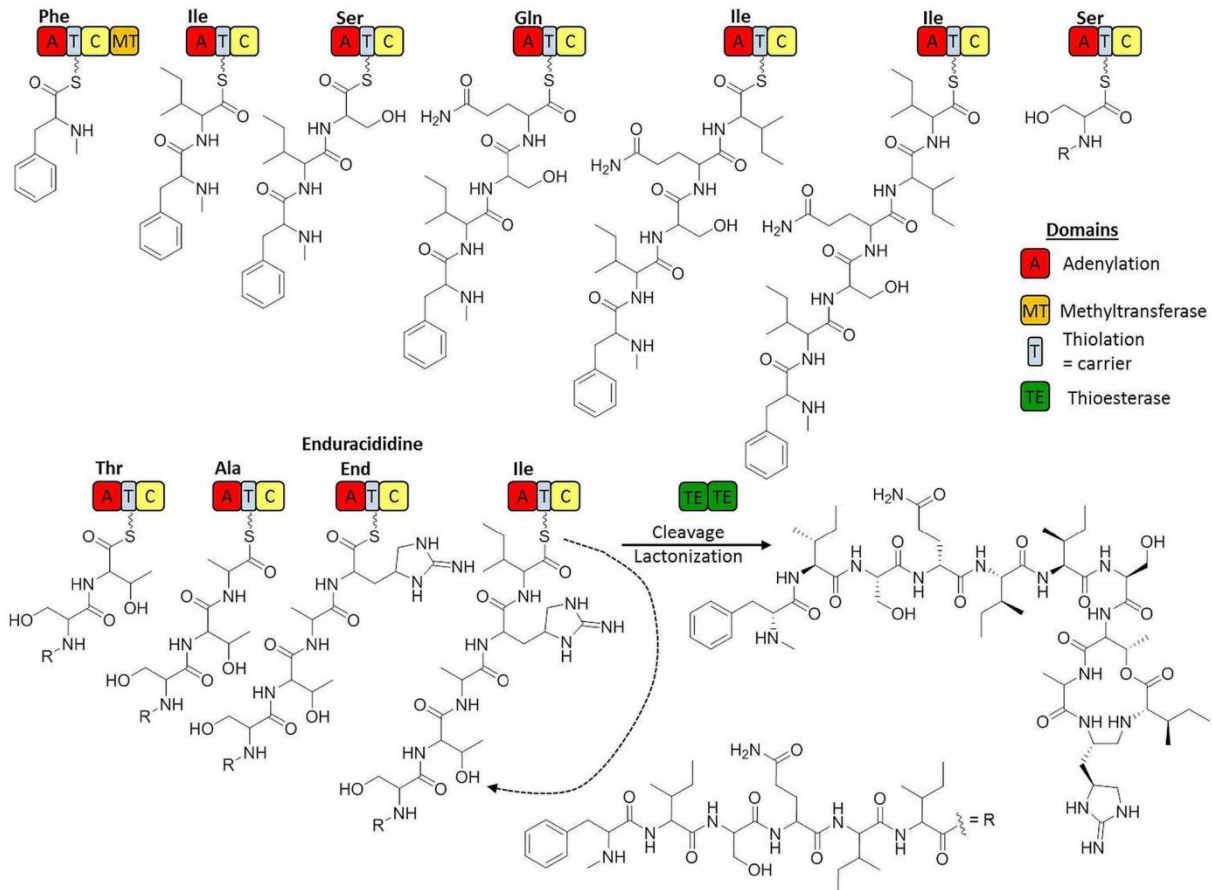
**a**, Traitement à dose unique (i.v., 1 h après l'infection, 6 souris par groupe) avec la teixobactine et la vancomycine dans un modèle de protection contre la septicémie utilisant le SARM. La survie est représentée 48 h après l'infection. **b**, traitement à dose unique (i.v., 2 h après l'infection, 4 souris par groupe) avec la teixobactine et la vancomycine dans un modèle d'infection neutropénique de la cuisse de souris utilisant le SARM. Pour les animaux traités avec le médicament, les unités formant des colonies de cuisse (u.f.c.) ont été déterminées 26 h après l'infection. Pour les contrôles, u.f.c. dans les cuisses ont été déterminées 2 h et 26 h après l'infection. **c**, Traitement à deux doses, 5 souris par groupe, avec de la teixobactine (i.v., 24 h et 36 h post-infection) et traitement à dose unique avec de l'amoxicilline (sous-cutanée, 24 h post-infection) dans un modèle d'infection pulmonaire immunocompétent utilisant *S. pneumoniae*. Poumon u.f.c. ont été déterminés 48 h après l'infection. Le u.f.c. de chaque souris sont tracés sous forme de points individuels et les barres d'erreur représentent l'écart au sein d'un groupe expérimental. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  (déterminé par un test du log-rank non paramétrique).

## Annexe 05

**L'iChip (Ling *et al.*, 2015).**

**a–c**, l'iChip (a) se compose d'une plaque centrale (b) qui abrite des micro-organismes en croissance, des membranes semi-perméables de chaque côté de la plaque, qui séparent la plaque de l'environnement, et deux panneaux latéraux de support (c). La plaque centrale et les panneaux latéraux ont plusieurs trous traversants assortis. Lorsque la plaque centrale est plongée dans une suspension de cellules dans de la gélose fondue, les trous traversants capturent de petits volumes de cette suspension, qui se solidifient sous forme de petits bouchons de gélose. Alternativement, la gélose fondue peut être distribuée dans les chambres. Les membranes sont fixées et l'iChip est ensuite placée dans le sol d'où provient l'échantillon.

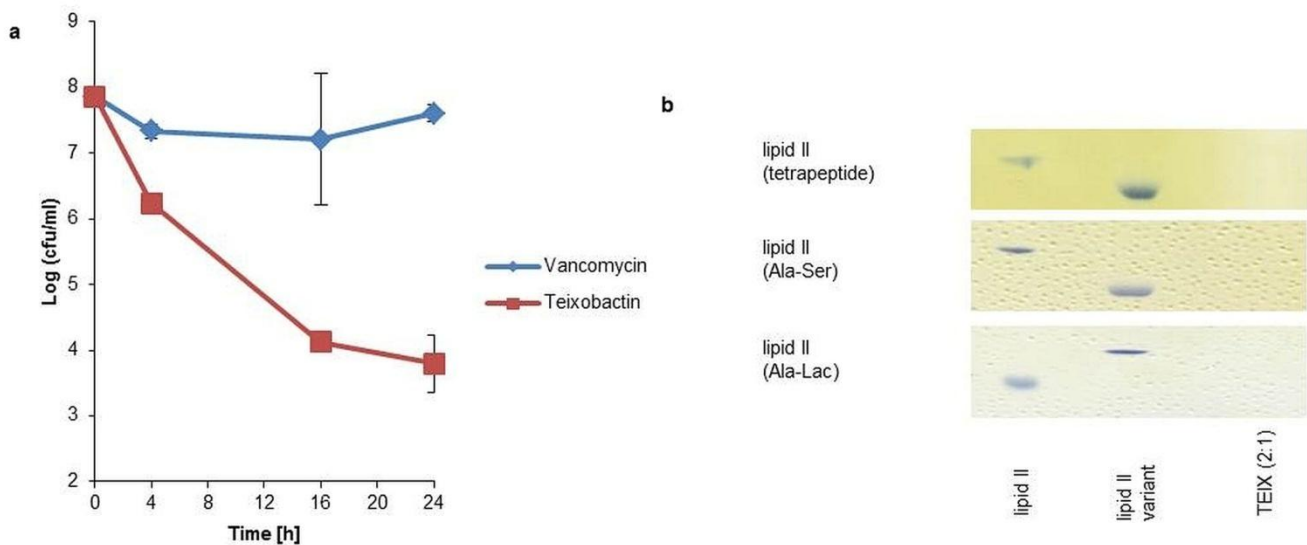
## Annexe 06



### Voie de biosynthèse hypothétique de la teixobactine (Ling *et al.*, 2015).

Les onze modules des peptides synthétases non ribosomiques Txo1 et Txo2 sont représentés avec la chaîne en croissance attachée. Chaque module est responsable de l'incorporation d'un acide aminé spécifique dans la chaîne peptidique naissante. La N-méthylation du premier acide aminé phénylalanine est catalysée par le domaine méthyltransférase dans le module 1. La fermeture de cycle (marquée par une flèche en pointillés) entre la dernière isoleucine et la thréonine est catalysée par les domaines thioestérase pendant le déchargement de la molécule, ce qui entraîne teixobactine.

## Annexe 07



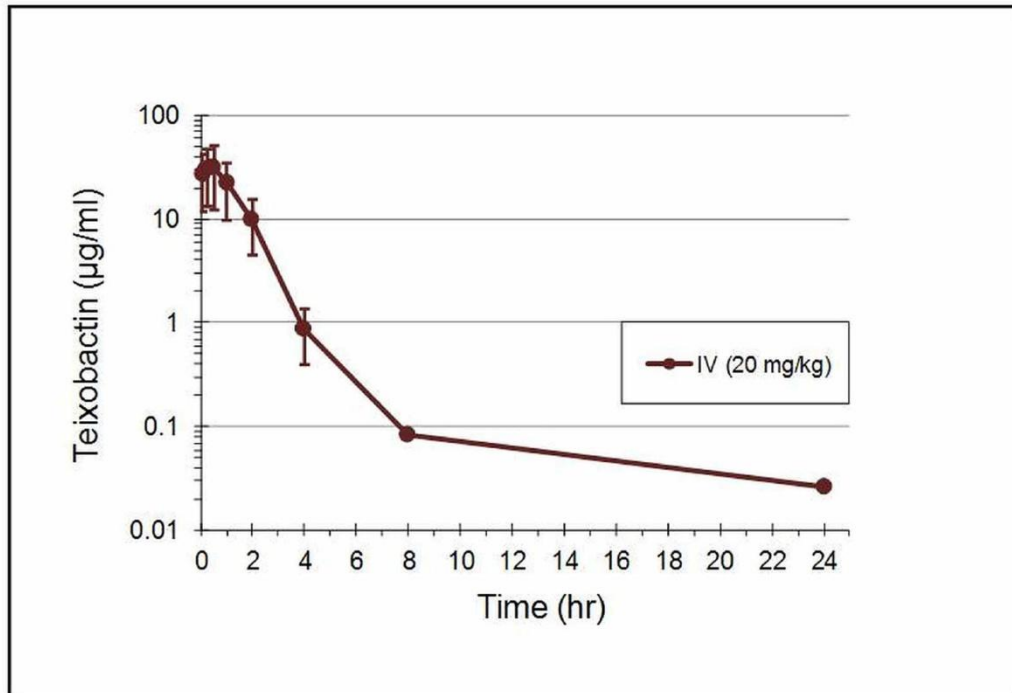
**Activité de la teixobactine contre les souches résistantes à la vancomycine (Ling *et al.*, 2015).**

**a**, la vancomycine intermédiaire *S. aureus* (VISA) a été cultivée jusqu'à la phase exponentielle tardive et testée avec de la vancomycine ou de la teixobactine. Les nombres de cellules ont été déterminés par étalement pour le nombre de colonies.. **b**, Formation complexe de teixobactine avec des variants précurseurs de la paroi cellulaire tels que formés par des souches résistantes à la vancomycine. Des intermédiaires lipidiques purifiés avec des peptides souches altérés ont été incubés avec de la teixobactine à un rapport molaire de 2:1 (TEIX : variante lipide II). Les mélanges réactionnels ont été extraits avec BuOH/PyrAc et la liaison de la Teixobactine aux variants du lipide II est indiquée par son absence sur le chromatogramme en couche mince. Le comportement de migration du lipide II non modifié est utilisé à titre de comparaison.



## Annexe 08

a



b

PK parameter	Definition	Value
C0 (µg/mL)	Initial concentration	27.2
AUC to Last (µg-hr/mL)	Area Under Curve to last time point	57.8
t <sub>1/2</sub> (hr)	Half life	4.7
Total CL (mL/hr)	Clearance	6.9
Total CL (mL/min/kg)	Clearance	5.8
V (mL)	Volume of Distribution	47
V <sub>ss</sub> (mL)	Volume of Distribution at steady state	9.7
MRT <sub>INF</sub> (hr)	Mean residence time	1.4
Last Time point (hr)	–	24

**Analyse pharmacocinétique de la teixobactine (Ling *et al.*, 2015).**

**a,** Les concentrations plasmatiques moyennes de teixobactine après une seule injection i.v. injection de 20 mg par kg de teixobactine (3 souris par point de temps). Les données sont la moyenne de la concentration plasmatique et les barres d'erreur représentent l'écart type de 3 animaux à chaque instant.

**b,** Paramètres pharmacocinétiques de la teixobactine calculés avec un modèle d'analyse non compartimental basé sur WinNonlin.

Thèse soutenue par: **KHAINNAR AbdelHakim**  
**DIB Halla Ouissem**

le 22 / 09 / 2021

**Thème:**

# **La Teixobactine: une nouvelle classe d'antibiotiques et une solution prometteuse pour l'antibiorésistance.**

## **Résumé**

La Teixobactine est un nouvel antibiotique récemment découvert qui est produit par une bactérie à Gram négatif nommée *Eleftheria terrae*, un type de micro-organisme du sol non cultivé qui a été isolé avec un nouvel outil, l'iChip, qui permet l'isolement et la culture de la bactérie de type VNC.

La Teixobactine est efficace contre les bactéries à Gram-positif (mais pas à Gram-négatif) et les mycobactéries en utilisant un nouveau mode d'action qui inhibe la biosynthèse du peptidoglycane. Les recherches *in vitro* actuelles ont montré qu'aucune résistance n'a été développée contre la Teixobactine par les souches résistantes de *Staphylococcus aureus* ou de *Mycobacterium tuberculosis*. L'utilisation de la Teixobactine a été totalement efficace dans les infections expérimentales de souris en réduisant la charge bactérienne des BMR, ce qui en fait un candidat prometteur pour créer une solution à la menace d'antibiorésistance.

Même si la Teixobactine est encore à un stade précoce de développement et qu'elle rencontre encore quelques difficultés avec sa production, elle peut néanmoins contribuer en tant que modèle de recherche pour découvrir des molécules similaires.

De plus, ce travail est une tentative de proposer une nouvelle façon de résoudre le problème de la production d'antibiotiques à partir de bactéries de type VNC par la méthode du clonage, ça peut être un grand pas pour découvrir de nouvelles molécules qui peuvent être une solution à la menace d'infections résistantes.

**Mots clés:** Teixobactine, *Eleftheria terrae*, Antibiorésistance, BMR, iChip, bactéries VNC, Biosynthèse de la Teixobactine, antibiotiques, clonage

## **Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mr. Hamidechi A. (Professeur - UFM Constantine1).

**Rapporteur :** Mme Sekhri-Arafa N. (MCA - UFM Constantine1).

**Examineurs :** Boulahrouf K. (MCB - UFM Constantine1).

Année universitaire : 2020 - 2021