

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم : ميكروبيولوجيا

**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

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**La cutimycine : un nouvel antibiotique découvert dans le microbiote cutané.**

---

**Présenté par :** Boudaoud Raounek  
Terrouche Hind  
Boudjenoui Nesrine

**Le 28/06/2022**

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** SEKHRI-ARAFI Nedjouda (Maître de conférences A – UFM Constantine1).  
**Examineur 1 :** ABDELAZIZ Ouided (Maître de conférences B- UFM Constantine 1).  
**Examineur 2 :** MEZIANI Meriem (Maître de conférences B – UFM Constantine1).

**Année universitaire  
2021 - 2022**



## *Remerciements :*

*Nous remercions tout d'abord la grâce du DIEU tout miséricordieux, qui nous a donné la force et la volonté à achever ce parcours vers le savoir scientifique et qui nous a accordé la patience pour réaliser ce modeste travail.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide, le soutien actif, la motivation et le bon encadrement de notre directrice du mémoire, **Madame Sakhri-Arafa Nedjoua**. Un grand merci de tout cœur pour votre gentillesse, pour avoir répandu présente à tout moment où nous avons eu besoin de vous ces trois dernières années, pour vos précieux conseils durant cette période. Toutes les générations en témoignent son esprit responsable et c'est l'ange gardien des étudiants, nous sommes fortunées de l'avoir eu comme encadrante.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury, Docteur Abdelaziz Ouided et notre enseignante Docteur Meziani Meriem de nous avoir consacré du temps pour évaluer notre travail et leur entière responsabilité.*

*En second lieu, nos remerciements les plus sincères à Madame Elouar, Professeuse sous directrice du centre de recherche en science pharmaceutique CRSP, pour son accueil chaleureux et pour nous avoir donné l'opportunité d'effectuer un stage au sein du laboratoire de microbiologie et toxicologie.*

*Nous remercions également Monsieur Derbale Said, attaché de recherche au CRSP, pour son soutien morale, son aide, pour avoir répondu à nos questions et pour son aile durant tout notre séjour.*

*Enfin, c'est avec plaisir aussi que je réserve cette page en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidé et à tous les enseignants que nous avons eu l'honneur d'avoir durant notre chemin universitaire.*

## *Dédicace*

*A mon très cher père Mohamed, Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour et l'estime que j'ai toujours eue pour toi.*

*A ma très chère mère Nedjoua, merci pour vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement. Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*A ma chère sœur Rayane et mes frères Abd Errahmen et Abd Eldjalil, Je leurs remercie pour tous les moments d'enfance et de joie passée avec eux, vous êtes le pilier de ma vie.*

*A ma jolie grande mère qui m'a arrosée de tendresse et d'espoir et m'a béni par ses prières, je t'aime énormément.*

*A mes oncles et mes tantes, merci pour vos attentions particulières et votre amour inconditionnel. Merci pour tout et que Dieu vous donne bonne santé et longue vie.*

*A mes chères proches Rim, Adel, Atef, Aridj, Lina, Ahlem, Hana, Meriem, Nahla, Amira, Mouna et imen, je les remercie pour tous les moments et les souvenirs que nous avons passés ensemble.*

*A ma petite nièce Mirna que j'aime trop, gros bisou.*

*A mes chères copines, Yasmine et Lina qui ont été ma source de motivation durant cette période. je ne peux trouver les mots justes pour vous exprimer mon affection, que Dieu préserve notre amitié.*

*A mon partenaire de travail Abd lhakim, je te remercie beaucoup.*

*A mon binôme Hind et Nesrine, Pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

*À Tous mes amies, et mes collègues : de la promotion de master BMM.*

*À tous mes enseignants durant les années d'études. A moi-même.*



**Raounek**

## *Dédicace*

*Je teins à remercier avant tout le bon Dieu pour la volonté et la patience qu'il m'a prodigué.*

*Je dédie ce modeste travail avec plein d'amour et de respect :*

*A mes chers parents (Mon père Terrouche Omar et ma mère Boudersa Rachida) pour leurs sacrifices, leurs amour, leurs tendresse, leurs soutien et leurs prière tout au long de mes études.*

*A mes chers sœurs, chacune á son nom Siham, Dalal, Nora, Rayane, pour leurs encouragements parmanentents et leurs soutien moral.*

*A mes frères Tarek, Mohamed, Haroun.*

*A mes grands parents.*

*A tout mes oncles, mes cousins et mes cousines.*

*A mes meilleures copines (Amina, Chaima, Dounia, Ferial, chourouk, Assala, Raounek)*

*A mes trinômes (Raounek et Nesrine).*

*Un grand merci aussi à AbdelHakim.*

*A tous mes amis que je n'ai pas cités et à tous ceux qui ne connaissent*

*A tout la promotion 2021. 2022 (Biologie Moléculaire des Microorganismes). En souvenir des agréables moments partagés et en témoignage de notre amitié. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*Je ne saurai terminer sans citer mes adorables anges de la famille : Bahaa, Rahaf, Hanine et Djad.*



**HIND**

## *Dédicace*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai pour toi. Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et de jamais baisser les bras. Merci beaucoup papa pour tout le soutien que vous m'avez apporté tout au long mes études.*

*A la personne que j'aime plus au monde, la source de la tendresse, aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices, Ma mère*

*A mon héros, mon frère Abed El-raouff, mes soeurs Rania et Ahlem mes sources de force.*

*Je dédie aussi ce travail à tous les membres de ma famille, mes proches et mes amis qui m'ont toujours poussé et encouragé à finir mes études malgré toutes les contraintes. Ce qui m'a permis de ne jamais dévier de mon objectif final.*

*Mes adorables amis et collègues RAOUNEK et HIND au souvenir des moments qu'on a passé ensemble, vous m'avez offert ce qu'il y a de plus cher : l'amitié, je suis honoré de vous connaître.*

*A la collègue Abed El hakim je le remercie pour son aide et soutien.*



**Nesrine**

## Sommaire

### Sommaire

<b>Introduction</b> .....	01
---------------------------	----

### Première partie: Revue bibliographique

<b>Chapitre 01 : Le microbiote cutané et les infections associées</b> .....	03
---	----

1. Le microbiote cutané.....	03
------------------------------	----

1.1. Définition.....	03
----------------------	----

1.2. La composition du microbiote cutané.....	04
---	----

1.3. Les types de flore cutanée.....	05
--------------------------------------	----

➤ La flore normale.....	05
-------------------------	----

➤ La flore pathogène.....	06
---------------------------	----

2. Les infections cutanées.....	07
---------------------------------	----

• D'origine bactérienne.....	07
------------------------------	----

• D'origine fongique.....	07
---------------------------	----

• D'origine virale.....	08
-------------------------	----

• D'origine parasitaire.....	08
------------------------------	----

3. Les interactions microbiennes cutanées.....	08
--	----

<b>Chapitre 02 : <i>Cutibacterium acnes</i></b> .....	11
---	----

1. Définition.....	11
--------------------	----

2. Historique et Découverte.....	11
----------------------------------	----

3. Phylogénie.....	12
--------------------	----

4. Classification de <i>Cutibacterium acnes</i> .....	13
---	----

5. Habitat.....	13
-----------------	----

6. Caractères bactériologiques.....	14
-------------------------------------	----

---

6.1. Caractères culturaux.....	14
6.2. Caractères morphologiques.....	14
• La paroi de <i>Cutibacterium acnes</i> .....	15
6.3. Caractères biochimiques.....	16
6.4. Génomique .....	16
7. Facteurs de virulence.....	17
8. Profil de résistance.....	18
9. Activité antibactérienne .....	19
<b>Chapitre 03 : La cutimycine.....</b>	<b>20</b>
1. Définition.....	20
2. Découverte.....	20
3. Propriétés moléculaires, physicochimiques et structurales.....	21
4. La voie de biosynthèse.....	22
• Biosynthèse totale des thiopeptides antibiotiques.....	23
5. Activité antibactérienne.....	23
5.1. Mécanisme d'action.....	24
5.2. Spectre d'activité.....	25
Conclusion.....	27
<b>Chapitre 04 : Méthodologie d'étude de la souche productrice de la cutimycine.....</b>	<b>28</b>
1. Prélèvement et Isolement microbiologique de <i>Cutibacterium acnes</i> .....	28
2. Culture et incubation de <i>Cutibacterium acnes</i> .....	30
3. Test d'antagonisme pour dépister l'activité antimicrobienne.....	30
4. Identification de l'espèce <i>Cutibacterium acnes</i> .....	31



• Identification phénotypique.....	32
• PCR avec des amorces spécifiques.....	31
• Electrophorèse.....	32
5. Identification de la souche <i>Cutibacterium acnes</i> KPA171202 par séquençage.....	32
6. Fermentation et purification de cutimycine.....	33
7. Concentration minimale inhibitrice.....	34
8. Applications et avantages des bactériocines.....	34

## Deuxième partie: Matériel et méthodes

I. <b>Matériel biologique</b> .....	36
1) But de travail.....	36
2) Centre de l'étude .....	36
3) Prélèvement.....	36
4) Ensemencement.....	36
5) Culture et incubation.....	37
6) Repiquage et purification.....	37
7) Identification macroscopique .....	38
8) Identification microscopique .....	38
8.1. L'examen à l'état frais.....	38
a) Principe .....	38
b) Technique .....	38
8.2. La coloration au bleu de méthylène.....	38
a) Principe .....	38
b) Technique.....	38

---

8.3. Coloration de Gram.....	39
a) Principe .....	39
b) Technique.....	39
II. Etude bioinformatique.....	40
1. Biosynthèse de la cutimycine.....	40
• Les difficultés rencontrées lors de sa production.....	40
• La solution au problème de la biosynthèse.....	40
2. Notre Proposition.....	40
a. Définition du clonage.....	40
b. Les étapes du clonage.....	41
c. Quelques notes importantes sur le gène à cloner.....	41
3. Les études préliminaires de la procédure.....	42
3.1. L'isolement de l'opéron de l'expression biosynthétique de la cutimycine.....	43
3.1.1. Définition des enzymes de restriction.....	43
3.1.2. Critère de choix de l'enzyme de restriction.....	43
3.2. Le choix du vecteur approprié pour l'insert.....	43
3.2.1. Critères de choix du vecteur.....	44
3.2.2. La taille des fragments à insérer.....	44
3.3. La sélection de la cellule hôte appropriée.....	44
3.3.1. Le choix de la cellule hôte .....	44
3.4. La méthode proposée pour la production industrielle de la cutimycine.....	45

---

### Troisième partie : Résultats et discussion

Avantages de la cutimycine.....	47
I. Résultat de la culture.....	47
II. Résultat du Genbank.....	49
2.1 Le choix de l'enzyme de restriction.....	49
2.2 Le choix du vecteur.....	50
2.3 Caractéristiques et avantages d' <i>E.coli</i> comme hôte.....	51
<b>Conclusion.....</b>	<b>52</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>53</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>54</b>
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ADNg :	ADN génomique.
ARN :	Acide ribonucléique.
ARNase :	Ribonucléase.
ARNm :	ARN messenger.
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique.
ATB :	Antibiotique.
BGC :	Groupe des gènes biosynthétiques.
BHI :	Bouillon cœur-cervelle.
BSA :	Bon de souscription d'actions.
C :	Cytosine.
CAMP :	Les facteurs Christie-Atkins-Munch-Petersen.
CDC :	Centers for Disease Control and Prevention.
CEPMC :	Centre européen de prévention et de contrôle des maladies.
cm <sup>2</sup> :	Centimètre carré.
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice.
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de carbone.
CRISPR :	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats.
G :	Guanine.
g :	Gramm.
GAG :	Glycosaminoglycanes.
GTPase :	Guanosine triphosphate phosphatase.
h :	Heure.
HA :	Acide hyaluronique.
H <sub>2</sub> O :	Eau.
HYL :	L'hyaluronate lyase.
Lac Z :	L'opéron lactose.
LB :	Bouillon de lysogénie.

---

m :	Mètre.
min :	Minute.
ml :	Millilitre.
mm :	Millimètre.
NaCl :	Chlorure de sodium.
NCBI :	National Center for Biotechnology Information.
OGM :	Organisme génétiquement modifié.
Pb :	Paires de bases.
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne.
pH :	Potentiel hydrogène.
PNAG :	Poly-(1-6)-N-acétylglucosamine.
PNG :	Peptidoglycane.
PSM :	Modulines phénol-solubles.
PSU :	Unité pilo-sébacée.
RAST:	Rapid Annotations using Subsystems Technology.
RDP :	Ribosomal Database Project.
RIPP :	Peptides synthétisés par ribosome et modifiés post-traduction.
s :	Seconde.
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline.
SDS :	Dodécylsulfate de sodium.
SGA :	<i>Streptococcus</i> du groupe A.
SOC :	Centre d'opération de sécurité.
tr/min :	Tour par minute.
UFC :	Unité formant une colonie.
UV :	Rayonnement ultraviolet.
V :	Volte.
µl :	Microlitre.
µm :	Micromètre.
µg :	Microgramme.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Contributions majeures de <i>Cutibacterium acnes</i> sélectionnées à l'homéostasie cutanée.....	03
<b>Figure 02</b> : Séquençage métagénomique amplicon versus shotgun.....	05
<b>Figure 03</b> : Composition des flores résidente et transitoire.....	06
<b>Figure 04</b> : Les interactions microbiote hôte favorisent l'homéostasie cutanée et la réponse immunitaire.....	08
<b>Figure 05</b> : Interactions cutanées commensales avec <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
<b>Figure 06</b> : Nouvelle classification des souches de <i>C. acnes</i> .....	12
<b>Figure 07</b> : Arbre phylogénétique selon la méthode de parcimonie maximale basée sur l'analyse de 50899 pb de séquences communes parmi 30 génomes de souches appartenant à la famille des <i>Propionibacteriaceae</i> .....	13
<b>Figure 08</b> : Morphologies des colonies de <i>C. avidum</i> et des espèces apparentées sur des plaques de gélose Schaedler après 3 jours d'incubation en atmosphère anaérobie.....	15
<b>Figure 09</b> : Coloration de Gram de <i>Cutibacterium acnes</i> .....	15
<b>Figure 10</b> : Principaux caractères biochimiques d'identification de <i>P. acnes</i> .....	16
<b>Figure 11</b> : Protéines immunoréactives majeurs de <i>P.acnes</i> .....	18
<b>Figure 12</b> : La Structure de thiopeptide cutimycine produit par <i>Cutibacterium acnes</i> .....	22
<b>Figure 13</b> : La structure de cutimycine.....	22
<b>Figure 14</b> : Représentation en flèche du BGC PPA0859-0866 de <i>Cutibacterium acnes</i> KPA171202.....	24
<b>Figure 15</b> : Essai de compétition entre <i>C. acnes</i> et <i>S. aureus</i> dans des conditions imitant l'environnement folliculaire naturel.....	25
<b>Figure 16</b> : La transcription de cutimycine BGC chez <i>C. acnes</i> augmente en coculture avec des espèces de staphylocoques.....	26

<b>Figure 17</b> : La cutimycine modifie le rapport entre <i>C. acnes</i> et <i>S. epidermidis</i> dans les follicules pileux de la peau humaine.....	30
<b>Figure 18</b> : Produits d'amplification soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose.....	32
<b>Figure 19</b> : Prélèvement cutané à partir d'un bouton d'acné.....	36
<b>Figure 20</b> : Ensemencement sur gélose au sang.....	37
<b>Figure 21</b> : Ensemencement sur gélose au sang.....	37
<b>Figure 22</b> : Culture dans jarre d'anaérobiose à 37°C pendant 3 jours.....	37
<b>Figure 23</b> : Repiquage et ensemencement par la méthode des quatre cadrans.....	37
<b>Figure 24</b> : Capture d'écran de la page Web de GenBank qui illustre certaines informations sur la séquence codante de la cutimycine.....	42
<b>Figure 25</b> : Capture d'écran de la page Web de GenBank qui illustre certaines informations sur la séquence codante de la cutimycine.....	42
<b>Figure 26</b> : Schéma qui représente la production des produits pharmaceutiques à l'aide des fermenteurs.....	45
<b>Figure 27</b> : Schéma d'un processus de fermentation.....	46
<b>Figure 28</b> : Photo des boîtes de Pétri après incubation.....	48
<b>Figure 29</b> : Photo des boîtes de Pétri après incubation.....	48
<b>Figure 30</b> : Photo des boîtes de Pétri après incubation.....	48
<b>Figure 31</b> : Aspects des colonies de <i>Staphylococcus Spp.</i> après repiquage.....	48
<b>Figure 32</b> : Aspects des colonies de <i>Staphylococcus Spp.</i> après repiquage.....	48
<b>Figure 33</b> : Aspects des colonies de <i>Staphylococcus Spp.</i> après repiquage.....	48
<b>Figure 34</b> : Observation microscopique au bleu de méthylène à l'objectif x100.....	48
<b>Figure 35</b> : Observation microscopique au bleu de méthylène à l'objectif x100.....	48
<b>Figure 36</b> : Observation microscopique de la coloration de Gram à l'objectif x100.....	49

**Figure 37** : Observation microscopique de la coloration de Gram à l'objectif x100..... 49

**Figure 38** : Carte génétique du plasmide pLBU3..... 50



## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Classification de <i>Cutibacterium acnes</i> .....	12
<b>Tableau 02</b> : Principaux caractères biochimiques de <i>Cutibacterium acnes</i> .....	16
<b>Tableau 03</b> : Concentrations minimales inhibitrices pour la cutimycine et berninamycine...	27
<b>Tableau 04</b> : Séquence d'amorce.....	31

**Résumé :**

*Cutibacterium acnes* (anciennement *Propionibacterium acnes*) est la célèbre bactérie commensale du microbiote cutané. Récemment, il a été montré qu'elle produit un nouvel antibiotique nommé la cutimycine secrété dans le cadre de compétition contre certaines espèces.

La cutimycine est un peptide antimicrobien synthétisé par voie ribosomale et modifié après traduction. Elle a une activité puissante contre les bactéries du genre *Staphylococcus* (y compris certains staphylocoques multirésistants dont le doré). En revanche, elle n'a montré aucune activité contre d'autres commensaux cutanés courants. Leur mécanisme d'action consiste en l'inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique lors de la synthèse protéique bactérienne. La cutimycine a été totalement efficace dans les expérimentations en réduisant la charge bactérienne des SARM, ce qui en fait un candidat prometteur pour créer une solution à la menace d'antibiorésistance.

Ce travail constitue une tentative de proposition de la production de la cutimycine par la méthode du clonage en se basant sur les interfaces GenBank, Addgene et GenScript. Les résultats de notre travail ont montré que l'enzyme de restriction c'est la *Pfo I*, le vecteur c'est le pLBU3 et l'hôte le plus approprié c'est *E.coli*.

Au terme de ce travail, nous pouvons conclure que la cutimycine peut être mieux biosynthétisée par voie biologique, une méthode rapide, facile, efficace, moins dispendieuse que les procédés chimiques longs, compliqués et coûteux.

**Mots clés :** Cutimycine, *Cutibacterium acnes*, Microbiote cutané, Interactions microbiennes, SARM, Antibiotique, L'antibiorésistance, Clonage.

**Abstract:**

*Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*) is the famous commensal bacteria of the skin microbiota. Recently, he showed that it produces a new antibiotic called cutimycin secreted in the context of competition against certain species.

Cutimycin is an antimicrobial peptide synthesized by the ribosomal route and modified after translation. It has potent activity against bacteria of the genus *Staphylococcus* (including some multidrug-resistant staphylococci including walleye). However, it has shown no activity against other common skin commensals. Their mechanism of action consists of inhibiting the elongation of the peptide chain during bacterial protein synthesis. Cutimycin has been completely effective in experiments in reducing the bacterial load of MRSA, making it a promising candidate to create a solution to the threat of antibiotic resistance.

This work consists of an attempt to propose the production of cutimycin by the cloning method based on the GenBank, Addgene and GenScript interfaces. The results of our work showed that the restriction enzyme is *Pfo* I, the vector is pLBU3 and the most suitable host is *E.coli*.

At the end of this work, we can conclude that cutimycin can be better biosynthesized by biological means, a rapid, easy and effective method, less expensive than long, complicated and expensive chemical processes.

**Keywords:** Cutimycin, *Cutibacterium acnes*, Skin microbiota, Microbial interactions, MRSA, Antibiotic, Antibiotic resistance, Cloning.

**ملخص :**

**كوتيبكتريوم اكنس** (المعروف سابقا باسم بروبيونيكتريوم اكنس) هي البكتيريا المعروفة المتعايشة في ميكروبيوتا الجلد، مؤخرا اظهر انه ينتج مضادا حيويا جديدا يسمى كوتيميسين يفرز أثناء المنافسة ضد أنواع معينة.

الكوتيميسين هو ببتيد مضاد للميكروبات مركب من الريبوزومات و معدل بعد الترجمة، له نشاط قوي ضد البكتيريا من جنس ستافيلوكوكيس (بما في ذلك بعض المكورات العنقودية المقاومة للأدوية المتعددة منها ستافيلوكوكيس الذهبي) و مع ذلك فانه لم يظهر أي نشاط ضد البكتيريا المتعايشة الأخرى. تتمثل آلية عملها في تثبيط استطالة سلسلة الببتيد أثناء تخليق البروتين البكتيرية، كان الكوتيميسين فعالا تماما في تجارب تقليل نسبة البكتيريا من نوع SARM، مما يجعله مرشحا قويا لإيجاد حل لمقاومة المضادات الحيوية .

يتمثل هذا العمل في محاولة اقتراح إنتاج الكوتيميسين بطريقة الاستنساخ بالاعتماد على الواجهات GenBank ، Addgene و Genescript. أظهرت نتائج عملنا أن إنزيم التقبيد هو *Pfo I* و الناقل هو pLBU3 والمضيف الأنسب هو *E. coli*.

في نهاية هذا العمل، يمكننا ان نستنتج انه يمكن تخليق الكوتيميسين بيولوجيا بشكل أفضل بالوسائل البيولوجية ، وهي طريقة سريعة، سهلة، فعالة و اقل تكلفة من العمليات الكيميائية الطويلة، المعقدة والمكلفة.

**الكلمات المفتاحية :**

الكوتيميسين، كوتيبكتريوم اكنس، ميكروبيوتا الجلد، التفاعلات الميكروبية، SARM ، المضادات الحيوية، مقاومة المضادات الحيوية، الاستنساخ.

A graphic of a scroll with a black outline and a light gray fill. The scroll is unrolled, showing the word "Introduction" in a bold, black, serif font. The scroll has a vertical strip on the left side and a horizontal strip on the top and bottom. The top and bottom edges are rounded. There are two circular elements at the top corners, representing the scroll's binding or the ends of the scroll.

# **Introduction**

## Introduction :

Depuis plus de 50 ans, la capacité des micro-organismes à développer une résistance aux agents antimicrobiens hante les microbiologistes et les spécialistes des maladies infectieuses (**Vandenbroucke-Grauls, 1993**). Par exemple, dans les années 1940 qui ont été appelées la décennie du désenchantement, les souches de *Staphylococcus aureus* suscitent de vives inquiétudes, car elles étaient résistantes à la quasi-totalité des bêta-lactamines, à la tétracycline, à la streptomycine et à l'érythromycine... Le problème posé aujourd'hui est l'émergence, particulièrement en milieu hospitalier, de ces souches bactériennes qui provoquaient des flambées d'infections et leur traitement devenu une source de préoccupation (**Vandenbroucke-Grauls, 1993**). Actuellement, un pourcentage élevé (>90%) d'isolats cliniques de *S. aureus* multirésistants (SARM) responsables de l'échec des traitements traditionnels, de nombreuses septicémies, de séjours prolongés à l'hôpital et d'un taux de mortalité élevé (**Lazano et al., 2017**). Une telle résistance à une grande variété d'agents infectieux et en l'absence d'un vaccin anti-staphylococcique efficace ca reste un problème de santé mondial majeur de bactéries multirésistantes (**Foti et al., 2021**).

Il est donc nécessaire d'identifier les souches de bactéries bénéfiques et leurs produits bioactifs qui peuvent posséder des modes d'actions originaux afin de conserver un arsenal thérapeutique performant permettant de faire face à ces nouvelles pathologies et pour mieux appréhender et contrer les mécanismes de résistances (**Thibaut, 2011**).

Nos microbiotes représentent une vaste ressource pour la découverte de médicaments, car leurs membres s'engagent dans un conflit constant et rivalisent les uns avec les autres en déployant diverses stratégies de survie (**O'Neill et al., 2020**). L'utilisation médicinale de l'antagonisme entre les bactéries a été discutée depuis Louis Pasteur au XIXe siècle, suscitent actuellement un très fort regain d'intérêt de la communauté scientifique internationale au raison de leurs propriétés antibactériennes remarquables, notamment contre les SARM (**Thibaut, 2011**).

Le concept de tous les points précédents a été complètement reconsidéré après la récente découverte révolutionnaire d'un nouvel agent antibactérien par un groupe scientifique à l'institut de microbiologie Forsyth, à Cambridge, aux États-Unis. En 2020, Katherine Lemon et ses collègues ont annoncé une découverte d'un nouveau antibiotique puissant appelé la **cutimycine** produit par une espèce cutanée *Cutibacterium acnes* dans le cadre des interactions concurrentielles (**Claesen et al., 2020**). Ce néo antibiotique montre une efficacité

spécifique sur les staphylocoques multirésistants et jusqu'à présent aucune résistance n'a pu être décelée. La découverte de ce nouvel antibiotique peut être une solution prometteuse pour lutter contre la calamité d'antibiorésistance et son utilisation comme un agent dans la thérapie de précision aidera à sauver des vies humaines.

Actuellement, la production de ce nouvel antibiotique rencontre des difficultés dans sa production.

Dans cette optique nous nous sommes fixées les objectifs suivants :

**1/** Isolement et identification la bactérie *Cutibacterium acnes*.

**2/** Faire une synthèse bibliographique sur la méthodologie de la production de la cutimycine par *Cutibacterium acnes*.

**3/** Proposition d'un protocole de production par la méthode de clonage en ce basant sur les interfaces GenBank, Addgene et GenScript pour trouver l'enzyme de restriction, le vecteur et l'hôte approprié.



**Revue  
bibliographique**





# Chapitre 01

## Chapitre 01 : Le microbiote cutané et les infections associées

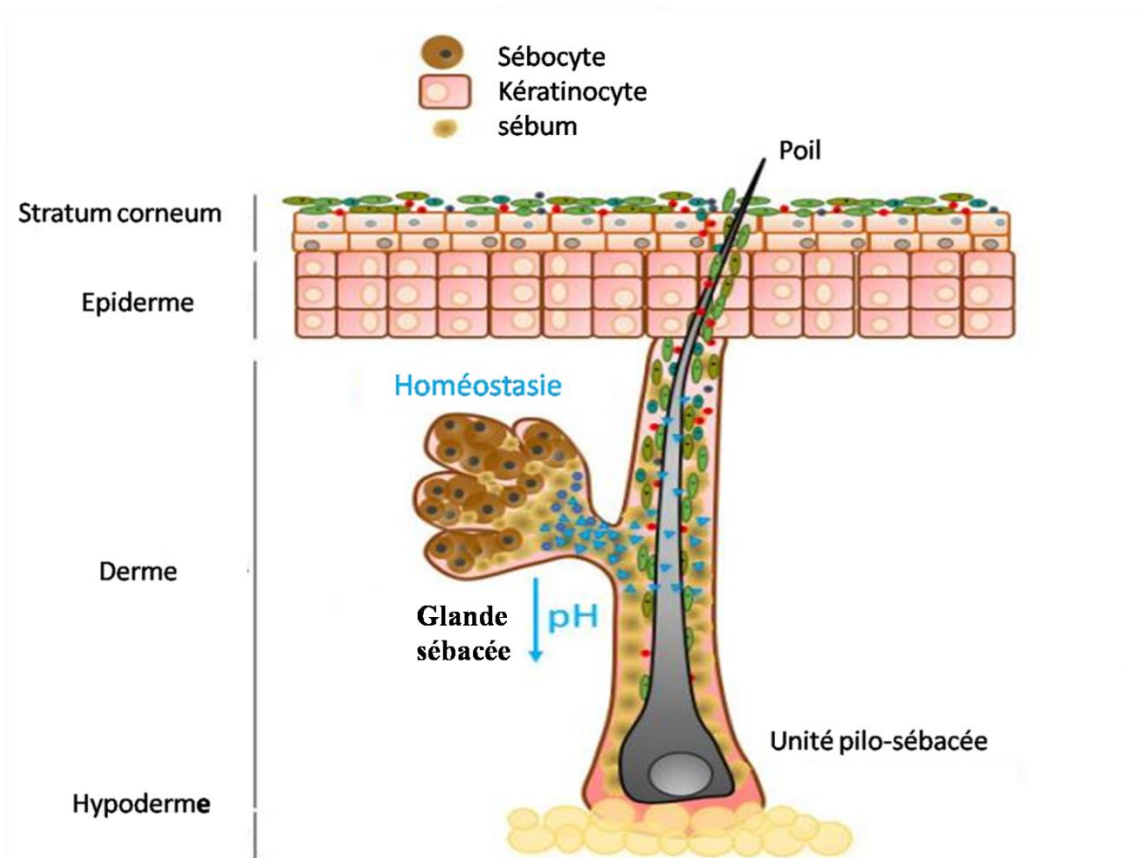
### 1. Le microbiote cutané :

#### 1.1. Définition :

Le microbiote cutané ou microflore de la peau humaine, est un écosystème complexe se situe sur la surface et dans les couches superficielles de l'épiderme (majoritairement au niveau du stratum corneum) et en quantité plus dérisoire au niveau du derme. Il est bien souvent caractérisé de second génome (Goetz, 2016).

Le microbiote cutané est constitué de micro-organismes pluriels : des bactéries, des virus, des champignons et également des parasites dont la composition résulte d'un équilibre entre les conditions locales et les propriétés métaboliques de ces microorganismes (Goetz, 2016).

C'est un marqueur individuel, car il varie de manière quantitative et qualitative d'une personne à l'autre, selon l'âge, le sexe, le siège, le système immunitaire et certains facteurs physico-chimiques tels que la température, l'humidité et le pH (Goetz, 2016). (voir figure 01).



**Figure 01** : Contributions majeures de *Cutibacterium acnes* sélectionnées à l'homéostasie cutanée (Rozas et al., 2021).

## 1.2. La composition du microbiote cutané :

L'avènement des techniques moléculaires permettant le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S spécifique des cellules procaryotes a révélé une diversité d'espèces plus importantes du microbiote cutané (**Di Domizio, 2016**). (voir figure 02).

La composition de la flore est fortement influencée par la physiologie des différentes régions cutanées, regroupées en trois catégories : sèches, humides et sébacées (**Duda-Ferrand, 2021**).

Les études de la composition montrent que les bactéries sont les microorganismes prédominants. Elles appartiennent à quatre principaux phyla : Actinobacteria (51,8%) qui constituent le phylum le plus abondant dans de nombreux sites, Firmicutes (24,4%), Proteobacteria (16,5%) et Bacteroidetes (6,3%) (**Grice et Segre, 2011**).

La majorité des bactéries identifiées sont de type Gram-positif et appartiennent principalement à 3 genres :

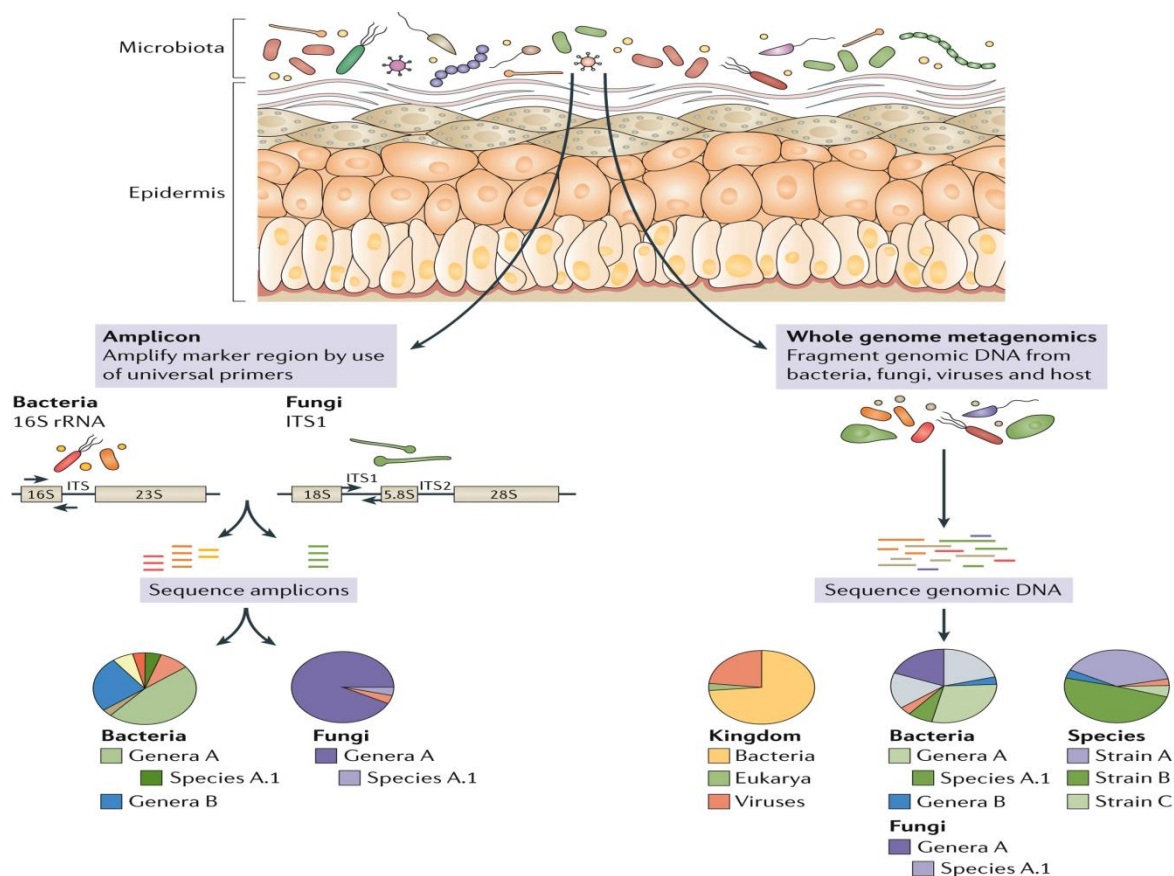
- 1) Les staphylocoques à coagulase négative représentent les espèces les plus fréquemment trouvées dans la flore cutanée normale, trois espèces prédominantes : *S. epidermidis*, *S. hominis* et *S. haemolyticus* (**Goetz, 2016**).
- 2) Les corynebactéries : sont des aéro-anaérobie facultatives, représentées au niveau des sites humides par *C. minutissimum*, *C. jeikeium* et *C. urealyticum* (**Pasamon, 2021**).
- 3) Les propionibactéries : représente la flore anaérobie et colonisent principalement les sites sébacés riche en lipides, regroupent notamment *Cutibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum* et *P. avidum* (**Pasamon, 2021**).

Cependant des Brevibactéries, des Microcoques, des Lactobacilles ou bien des Acinetobacter sont également retrouvées (**Ecale, 2021**). Les seules bactéries à Gram-négatif résidentes de la peau font partie du genre Acinetobacter (**Goetz, 2016**).

Les micro-eucaryotes habitant la peau humaine sont principalement des champignons surreprésentés par *Malassezia* qui est le genre fongique le plus retrouvé sur la peau en particulier au niveau des zones sébacées suivi par *Penicillium*, *Aspergillus* et la levure *Candida* (**Rozas et al., 2021**).

L'analyse microscopique de la peau montre aussi la présence des parasites de la famille des acariens telle l'espèce *Demodex folliculorum*, qui réside dans les unités pilo-sébacées (**Duda-Ferrand, 2021**).

Le virome cutané est actuellement moins bien caractérisé. Il est composé des virus à ADN (virus herpès, papillomavirus, adénovirus...) et des virus des procaryotes, en particulier des phages de *Cutibacterium sp* et de *Staphylococcus sp* (**Mokni et Abdelhak, 2014**).



**Figure 02 :** Séquençage métagénomique amplicon versus shotgun (**Byrd et al., 2018**).

### 1.3. Les types de flore cutanée :

Les microorganismes ont été classés en deux catégories distinctes en fonction de leur capacité à survivre et proliférer sur la peau : la flore normale et pathogène (**Duda-Ferrand, 2021**). (voir figure 03).

#### ➤ La flore normale

Appelée aussi flore résidente, elle est colonisée par des germes commensaux de manière prolongée, voire permanente capable de s'auto-restaurer spontanément après une perturbation et n'entraîne aucune conséquence clinique (**Duda-Ferrand, 2021**). Elle joue notamment un

rôle important dans la résistance à la colonisation par d'autres microorganismes potentiellement pathogènes. Cette flore résidente est dominée par les espèces à Gram- positif (Goetz, 2016).

Parfois, si les conditions s’y prêtent (immunodépression, effraction cutanée, dermatose suintante), ces germes peuvent être responsables d’une surinfection cutanée, avec apparition de signes locaux inflammatoires (Taoufik, 2020).

➤ **La flore pathogène**

Appelée aussi flore transitoire, à la différence de la flore résidente, elle est plus polymorphe et peuvent contaminer temporairement la peau ou s’installer plus durablement si les conditions d’humidité et de pH lui sont favorables en cas d’effraction de la barrière épidermique (Goetz, 2016). Elle est d’origine environnementale ou peut provenir d’autres flores commensales du corps notamment la flore digestive (Pasamon, 2021).

Les espèces transitoires les plus communes sont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et des espèces de *Bacillus* (Goetz, 2016).

Flore résidente		Germe	
Flore résidente	Bactéries	Cocci Gram positif	Staphylocoques à coagulase négative – <i>S. epidermidis</i> – <i>S. hominis</i> – <i>S. haemolyticus</i>
		Germes corynébactériformes	– Corynebactéries – <i>Brevibacterium</i> – Propionibactéries – Microcoques
		Bactéries Gram négatif	– <i>Acinetobacter</i>
		Parasites	Acariens – <i>Demodex</i>
		Levures	– <i>Malassezia</i>
Virus	– Papillomavirus humains		
Flore transitaire	Bactéries		– <i>Staphylococcus aureus</i> – Streptocoques – <i>Bacillus</i> – <i>Neisseria</i>
		Bacilles Gram négatif	– <i>Pseudomonas</i>
	Levures		– <i>Candida albicans</i> – <i>Candida parapsilopsis</i>

Figure 03 : Composition des flores résidente et transitoire (Goetz, 2016).

## 2. Les infections cutanées :

La flore cutanée joue un rôle primordial dans la genèse des infections locales ou systémiques de la peau avec de nombreuses formes cliniques (Teyssou et al., 1997). Leur classification et leur dénomination reposent sur le type et la profondeur du tissu infecté (épiderme, derme et hypoderme) ou sur la structure cutanée atteinte (Rasigade et Tristan, 2019).

Les infections de la peau peuvent survenir sans lésions cutanées préexistantes, ou bien dès qu'elle existe une brèche cutanée, une intervention chirurgicale, des morsures d'animal ou d'insecte, les microorganismes peuvent coloniser la lésion et être à l'origine d'infection (Teyssou et al., 1997).

Ces maladies peuvent avoir de nombreuses origines :

- D'origine bactérienne :

De nombreux types de bactéries peuvent infecter la peau. Les germes les plus fréquents sont les streptocoques, les staphylocoques et les propionibactéries (Rehmus, 2021).

Les infections capitales causés par le genre *Streptococcus* (le streptocoque  $\beta$ -hémolytique du groupe A (SGA)) sont : La cellulite, l'impétigo et la scarlatine (Rehmus, 2021).

Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (également appelé SARM) est résistant à de nombreux antibiotiques, car il a subi des modifications génétiques qui lui permettent de survivre. Pour cette raison, on distingue de multiples pathologies difficiles à traiter telle que la folliculite, le furoncle et la dermatite atopique (Rehmus, 2021).

*Cutibacterium acnes* anciennement connu *Propionibacterium acnes* (bactérie de notre étude) est la célèbre bactérie du microbiote cutané responsable d'une affection dermatologique la plus répandue dans le monde, l'acné vulgaire.

- D'origine fongique :

Les mycoses cutanées (dermatite, pied d'athlète, L'intertrigo...) sont les infections fongiques cutanées affectant la peau et les ongles causées par les levures notamment *Candida* et *Malassezia* ou les champignons dermatophytes (Lorier-Roy, 2019).

- D'origine virale :

Les infections cutanées virales ne sont pas des atteintes localisées, mais des éruptions qui atteignent fréquemment toutes ou plusieurs régions du corps comme la varicelle, herpès ou l'érythème infectieux (Radan, 2017).

- D'origine parasitaire :

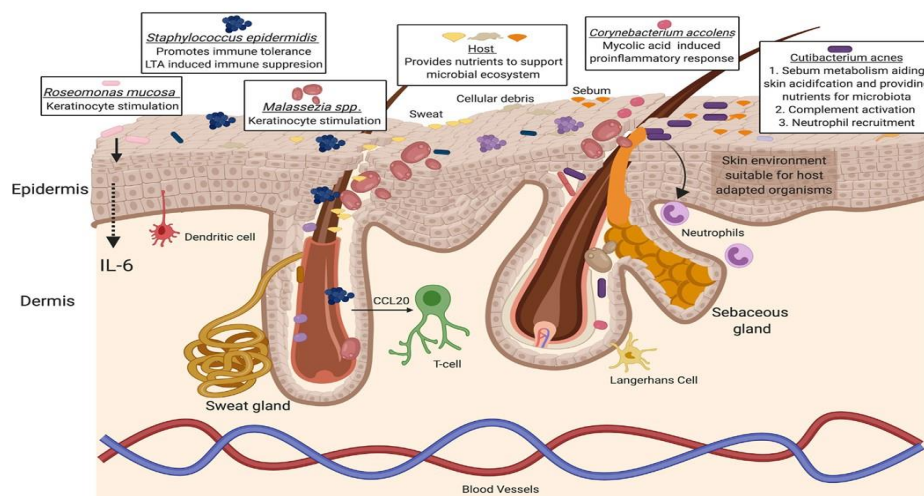
On parle en général plus d'infestation que d'infection (Docteurclie, sans date). Les parasitoses cutanées les plus fréquentes sont les pédiculoses, bilharziose et la gale.

Ces altérations ont un impact négatif sur la biologie cutanée en générant une perte de fonctions biologiques essentielles à l'homéostasie cutanée (Rozas et al., 2021).

### 3. Les interactions microbiennes cutanées :

L'assemblage, la stabilité et la fonction de la communauté microbienne dépendent des facteurs de l'hôte ainsi que des interactions entre ces micro-organismes qui sont des aspects clés de la biologie des microbiomes (Byrd et al., 2018).

Un bon nombre d'études ont utilisé une approche interdisciplinaire combinant des techniques génétiques, métabolomiques et d'imagerie pour mieux comprendre les mécanismes des interactions microbiennes et leur impact sur les microbiotes (Pierce et Dutton, 2022). Ces mécanismes comprennent les interactions liées aux molécules toxiques, la compétition des nutriments et l'alimentation croisée, l'accès aux métaux, les voies de signalisation, les changements de pH et les interactions au sein des biofilms ou de manière synergique pour des avantages mutuels (Pierce et Dutton, 2022). (voir figure 04).



**Figure 04 :** Les interactions microbiote-hôte favorisent l'homéostasie cutanée et la réponse immunitaire (Flowers et Grice., 2020).

Le principal mécanisme établi par les espèces est l'inhibition directe de l'agent pathogène par la compétition nutritionnelle, l'occupation d'une niche écologique et la production des composés antimicrobiens. Par exemple, le colonisateur cutané *Staphylococcus lugdunensis* produit un peptide non ribosomique, la lugdunine, qui inhibe la croissance de *S. aureus*. De même, certaines souches de *Staphylococcus* à coagulase négative et *S. hominis* produisent des lantibiotiques qui tuent *S. aureus* (Claesen et al., 2020).

Un autre résident commun de la peau, *S. epidermidis* synthétise des modulines solubles dans le phénol (PSM) détruisent la membrane des agents pathogènes. Elle sécrète aussi une sérine protéase glutamyl endopeptidase qui désassemble les biofilms préformés de *S. aureus* (Fournière et al., 2020). Il convient toutefois de noter que *S. epidermidis* présente une activité antagoniste envers *C. acnes* par la production d'acide succinique ou d'autres chaînes d'acides gras via la fermentation du glycérol et/ou la sécrétion d'autres facteurs inhibiteurs, dont les toxines polymorphes (Coenye et al., 2021).

*Corynebacterium accolens* modifie l'environnement local de la peau pour inhiber la croissance du pathogène opportuniste *Streptococcus pneumoniae* (Byrd et al., 2018). Cette réponse dépendait de *C. accolens* utilisant l'activité lipase pour libérer les acides gras libres antibactériens des triacylglycérols de la surface de la peau (Byrd et al., 2018).

En revanche, d'autres interactions positives peuvent exister, comme le *Corynebacterium striatum* qui modifie le programme transcriptionnel global de *S. aureus* d'une manière qui supprime les gènes liés à la virulence et stimule les gènes associés au commensalisme (Flowers et Grice, 2020).

*C. acnes* produit des lipases qui hydrolysent les lipides présents dans le sébum, libérant des acides gras libres principalement l'acide propionique, qui abaisse le pH environnemental de la peau et créer des conditions défavorables à la colonisation par des agents pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) et favoriser la croissance des levures lipophiles *Malassezia* et des corynébactéries (Flowers et Grice, 2020).

A ce jour, les chercheurs sont passionnés pour mieux comprendre ce microenvironnement et élucider les facteurs clés qui façonnent la composition de cet écosystème (Claesen et al., 2020). Les petites molécules à activité antibactérienne sont l'un des moyens par lesquels les bactéries interagissent entre elles à des fins compétitives. Parmi ces molécules nous



retrouvons celle produite par *Cutibacterium acnes* dans les follicules pileux pour inhiber la colonisation de certaine espèce de *Staphylococcus*. Les données très récentes datant de 2020 suggèrent fortement que *C. acnes* étant un acteur important en limitant la croissance d'agents pathogènes potentiels sur la peau (Coenye et al., 2022).

Dans l'ensemble, notre étude suggère que les interactions inter-espèces pourraient potentiellement compromettre les équilibres du microbiote cutané (Christensen et al., 2016). (voir figure 05).

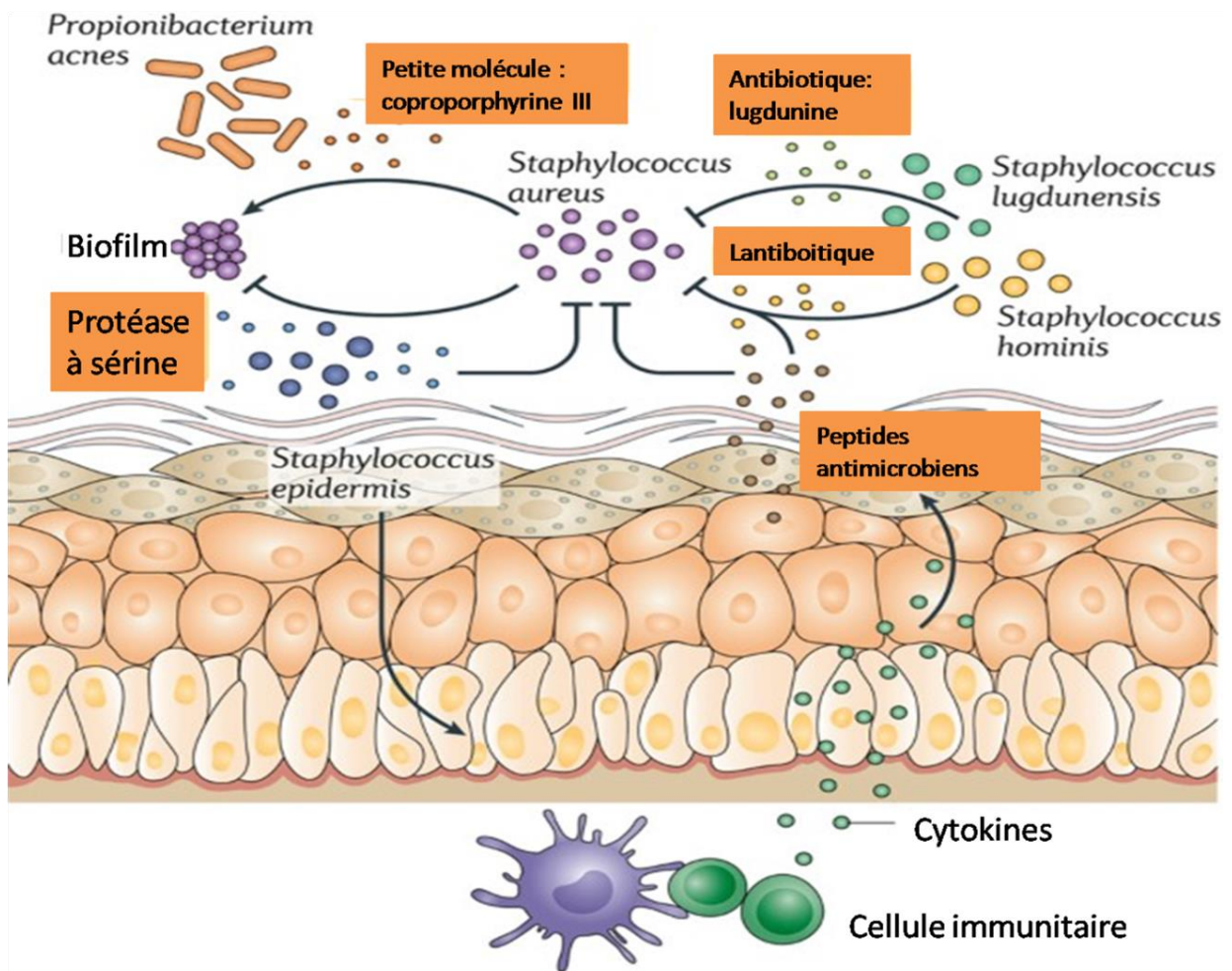


Figure 05 : Interactions cutanées commensales avec *Staphylococcus aureus* (Byrd et al., 2018).



# **Chapitre 02**

## Chapitre 02 : *Cutibacterium acnes*

### 1. Définition :

Le terme *Cutibacterium* du latin "cutis" qui signifie la peau et bacterium du grec ancien "βακτήριον" (baktĕrion, petit bâton, petite canne) et le terme acné vient du mot grec "akme" qui signifie une éruption sur le visage (**Wikionary, 2020**).

*Cutibacterium acnes* est une bactérie à Gram-positif qui fait partie principalement de la flore normale de la peau, bien que reconnue pour son rôle dans l'acné (**Perry et Lambert, 2011**).

Dernièrement, il a été reporté que *Cutibacterium acnes* produit un nouvel thiopeptide antimicrobien, la cutimycine, qui modifie la composition du microbiome des microenvironnements (**Suzuki et al., 2021**). Cette découverte pourrait être une solution prometteuse dans le domaine clinique et une source d'espoir pour combattre certaines maladies.

### 2. Historique et Découverte :

Anciennement connue sous le nom de *Propionibacterium acnes*. Elle a été observée la première fois par le dermatologue allemand Paul Unna en 1896 sur des coupes histologiques de lésions acnéiques et cultivées avec succès *in vitro* par Raymond Sabouraud, un an plus tard à partir de pustules d'acné (**El Sayed, 2019**).

Après sa découverte, *Propionibacterium acnes* désormais appelé *Cutibacterium acnes*, a subi une série de modifications taxonomiques. Elle a tout d'abord été dénommée *Bacillus acnes* avant d'être classée en 1923 dans le genre *Corynebacterium* sur la base de critères purement morphologiques. Elle fut ensuite dénommée *Corynebacterium acnes*, puis elle est classée en 1946 dans le genre *Propionibacterium* compte tenu de son métabolisme anaérobie conduisant à la fermentation du lactose en acide propionique. Elle est alors dénommée *P. acnes* jusqu'en 2016 où elle fut renommée *C. acnes* par Scholz et Kilian (**Duda-Ferrand, 2021**).

*Propionibacterium spp.* étaient traditionnellement subdivisées en propionibactéries classiques et cutanées. Les propionibactéries classiques contiennent des espèces isolées de produits laitiers telles que *Propionibacterium freudenreichii*, tandis que les propionibactéries cutanées comprennent *P. acnes*, *P. avidum* et *P. granulosum*, toutes isolées de la peau

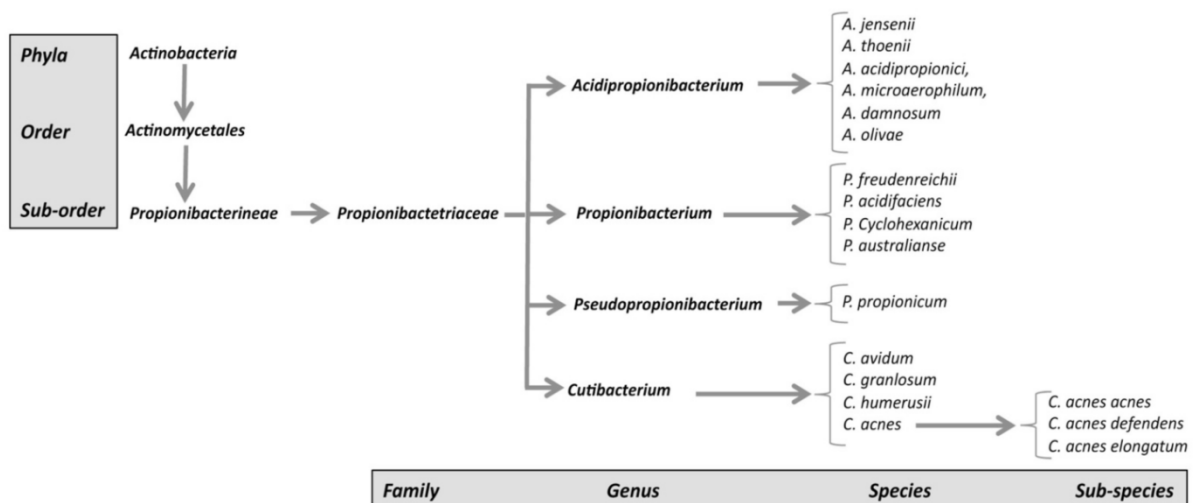
humaine. Cependant, l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S et la teneur en GC et la taille des génomes ont révélé des différences marquées entre ces deux groupes et le genre *Cutibacterium* a été proposé pour les espèces cutanées, entraînant la reclassification de *P. acnes* en *Cutibacterium acnes* (El Sayed, 2019).

### 3. Phylogénie :

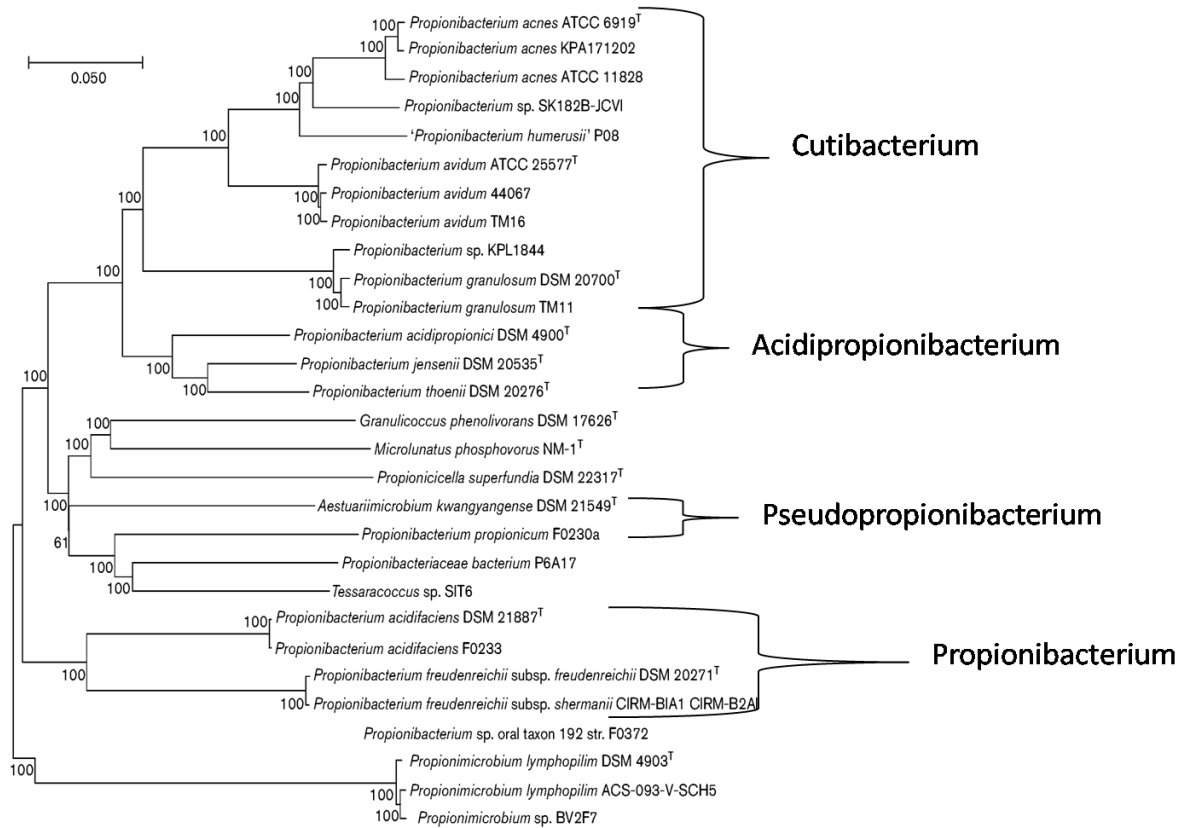
Les analyses phylogénétiques et génomiques des espèces classiques et cutanées ont mis en évidence des différences dans les séquences du gène de l'ARNr 16S et le génome central entre les espèces (Grange, 2021). (voir figures 06 et 07). Cette découverte a conduit de reclassifier l'espèce *Cutibacterium acnes* comme suit :

**Tableau 01** : Classification de *Cutibacterium acnes* (Scholz et Kilian, 2016).

Règne	Bacteria
Embranchement	Actinobacteria
Ordre	Actinomycetales
Famille	Propionibacteriaceae
Genre	<i>Cutibacterium</i>
Espèce	<i>Cutibacterium acnes</i>



**Figure 06** : Nouvelle classification des souches de *C. acnes* (Grange, 2021).



**Figure 07** : Arbre phylogénétique selon la méthode de parcimonie maximale basée sur l'analyse de 50899 pb de séquences communes parmi 30 génomes de souches appartenant à la famille des Propionibacteriaceae (Duda-Ferrand, 2021).

#### 4. Classification de *Cutibacterium acnes* :

Au fil des années, l'arbre phylogénétique de *C. acnes* a évolué constamment avec l'évolution des diverses techniques de typage moléculaire (El Sayed, 2019).

Historiquement, *C. acnes* a été classé en deux groupes distincts : Type I et Type II, sur la base de tests d'agglutination sérologique et d'analyse de la teneur en glucides de la paroi bactérienne. Le phylotype III a été rapporté en 2008, sur la base de ses caractéristiques morphologiques, moléculaires et d'immunofixation atypiques (El Sayed, 2019).

Aujourd'hui, la population globale de *C. acnes* est divisée en six phylotypes distincts : IA1, IA2, IB, IC, II et III. Seules les souches de phylotype II et III possèdent le système CRISPR/cas (El Sayed, 2019).

#### 5. Habitat :

*C. acnes* est une bactérie capable de survivre dans de nombreux sites différents du corps humain. Sa plus grande adaptation évolutive est sa capacité à se développer et à coloniser le

PSU, un environnement hautement riche en lipides, elle est majoritairement au niveau des sites riches en glandes sébacées comme le visage, le cuir chevelu, la poitrine et le dos atteignant des densités de  $10^6$  unités formant colonies (UFC) par  $\text{cm}^2$  mais aussi très abondant sur les zones cutanées sèches et humides comme les fesses, l'avant-bras, l'intérieur du coude, et le nombril (Aubin, 2017).

Elle peut également être présente sur les muqueuses de la bouche, le nez, du tractus urogénital et du gros intestin, la conjonctive et du conduit auditif externe. Il a été montré que *C. acnes* colonise l'épaule plus fréquemment que la hanche ou le genou et que les hommes avaient une charge bactérienne plus importante que les femmes (Aubin, 2017).

## 6. Caractères bactériologiques :

### 6.1. Caractères culturels :

La croissance de *C. acnes* est optimale en présence de moins de 21% d'oxygène. *C. acnes* peut cultiver sur différents milieux de culture, aussi bien solides (gélose au sang, Gélose au sang cuit) que liquides (Bouillon Cœur cerveau, milieu Schaedler, ou les flacons d'hémocultures) en anaérobiose ou en aérobie avec 5% de  $\text{CO}_2$ . Les colonies sur gélose au sang à plus de 72 heures de culture. Il s'agit d'un germe à croissance lente, plus lente que les bactéries anaérobies strictes, avec un temps de division d'environ 5 heures. La température optimale de croissance se situe entre 30 et  $37^\circ\text{C}$  alors que le pH optimal se situe entre 6.0 et 7.0 (El Sayed, 2019).

### 6.2. Caractères morphologiques :

*C. acnes*, comme toutes les espèces des propionibactéries est un bacille irrégulier à Gram-positif, elle est décrite comme diphtéroïde ou corynéforme car elle est en forme de bâtonnet et légèrement incurvé de 0,4 à 0,7  $\mu\text{m}$  de largeur et une longueur de 3 à 5  $\mu\text{m}$  avec des petites colonies transparentes, opaques ou blanches parfois  $\beta$ -hémolytiques (Grange, 2021). (voir figure 08).

Les bacilles peuvent s'observer isolés, en paires, groupes ou le plus souvent branchés, immobiles en bouillon, acapsulés et non sporulés (El Sayed, 2019). (voir figure 09).



**Figure 08 :** Morphologies des colonies de *C. avidum* et des espèces apparentées sur des plaques de gélose Schaedler en atmosphère anaérobie (Corvec, 2022).



**Figure 09 :** Coloration de Gram de *Cutibacterium acnes* (Barbeyrac, 2014).

- **La paroi de *Cutibacterium acnes* :**

Contrairement aux autres bactéries Gram-positif, *C. acnes* possède une paroi et une enveloppe cellulaire unique, contenant du phosphatidylinositol, du triacylglycérol et de nombreux autres lipides courants. La paroi cellulaire de *C. acnes* est constituée de peptidoglycane (PNG), mais d'un type différent de celui des autres bactéries Gram-positif, en ce que la chaîne peptidique contient l'acide L-diaminopélique et la D-alanine (Grange, 2021).

Des analyses de lipoglycane de *C. acnes* ont également révélé la présence d'un ancrage lipidique à base d'acides gras et ont montré que la fraction polysaccharidique contient des quantités importantes de mannose, de glucose et de galactose, ainsi qu'un sucre aminé considéré comme un acide diaminohexuronique (Grange, 2021).

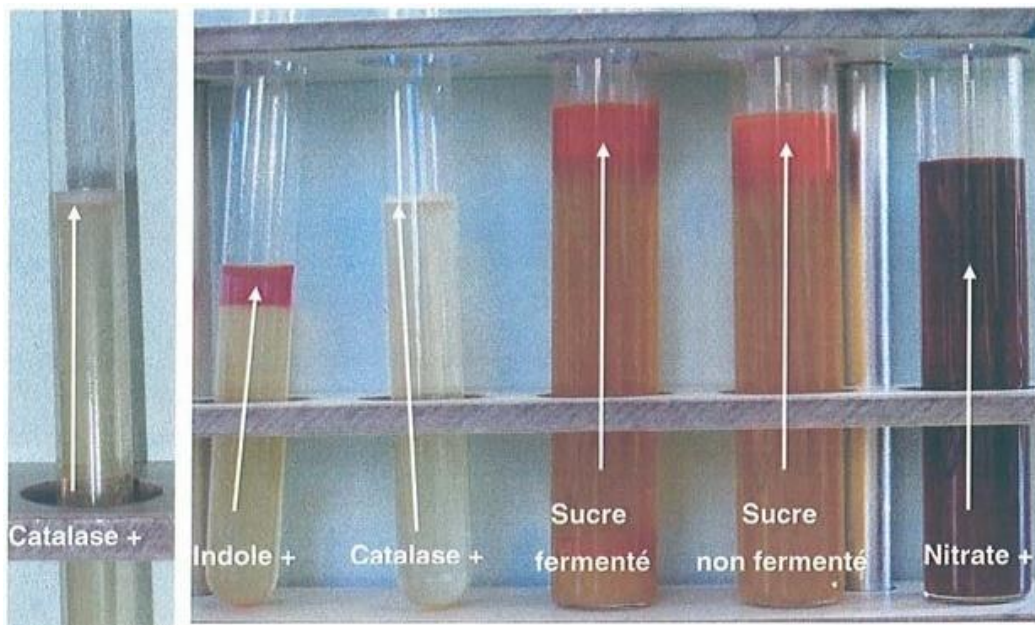
### 6.3. Caractères biochimiques :

*C. acnes* est caractérisée par la production de l'acide lactique, l'acide propionique et l'acide acétique à partir du glucose. En l'absence de ce dernier, la majorité des souches sont catalase positive et indole positive (voir tableau 02 et figure 10). (El Sayed, 2019).

En fonction de la capacité à fermenter le ribose, l'érythrol et le sorbitol, cinq biotypes différents ont été identifiés (El Sayed, 2019).

**Tableau 02:** Principaux caractères biochimiques de *Cutibacterium acnes*

	<i>Cutibacterium acnes</i>
Réduction des nitrates	+
Lactose	-
Saccharose	-
Maltose	-
Esculine en anaérobiose	-
Oxydase	-



**Figure 10 :** Principaux caractères biochimiques d'identification de *P. acnes* (Fougnot, 2003).



#### 6.4. Génomique :

Le génome de *C. acnes* a été entièrement séquencé en 2004 par Brüggeman et *al.* Il s'agit d'un chromosome circulaire unique de 2,5 Mpb correspondant à 2333 gènes potentiels. Le taux de GC est de 60 %. La population de *C. acnes* reste très clonale avec un génome qui montre une grande stabilité. La partie variable du génome de *C. acnes* représente environ 15 % du génome entier (El Sayed, 2019).

Un plasmide de grande taille a été détecté dans des isolats de type I et de type II de *C. acnes*. La taille du plasmide (de 47 kb à 57 kb) ainsi que le contenu en GC% (61,7 % à 63 %) varie d'une souche à l'autre. Pour l'instant, aucun plasmide n'a été détecté dans des isolats de type III (El Sayed, 2019).

#### 7. Facteurs de virulence :

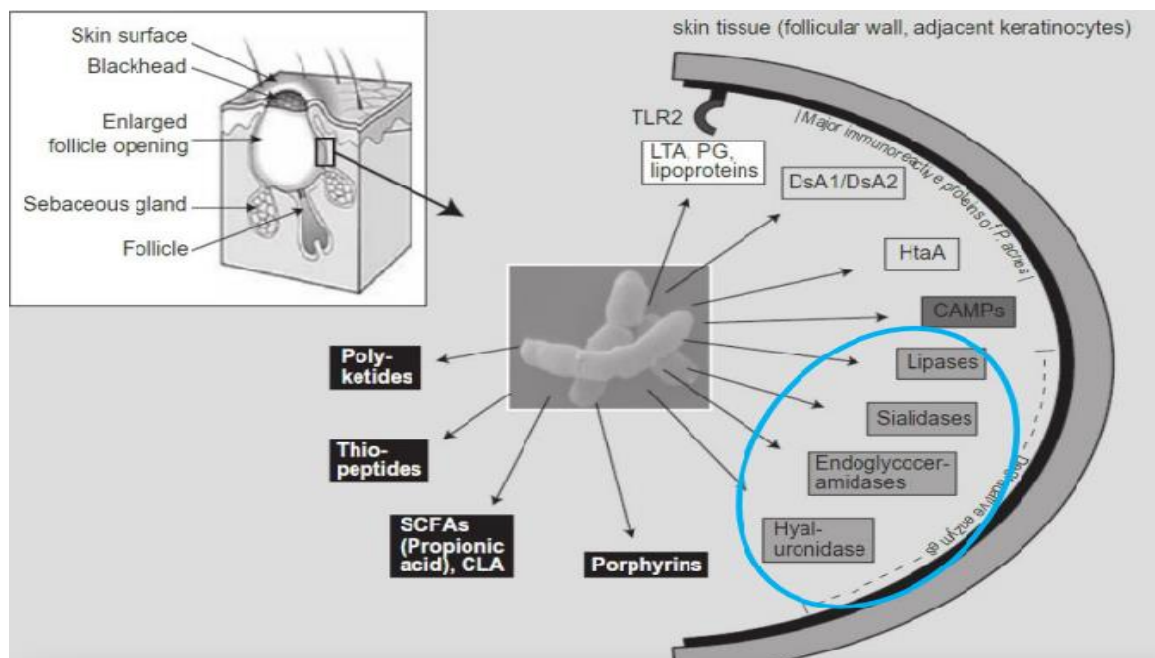
*C. acnes* a longtemps été considérée comme une bactérie commensale, mais au cours de la dernière décennie, plusieurs analyses biochimiques, transcriptomiques et protéomiques ont identifié et caractérisé plusieurs facteurs de virulence putatifs potentiellement impliqués dans la pathogénicité de cette bactérie (Mayslich, 2021).

Cette propriété pathogène, comme celle d'autres bactéries cutanées, peut être médiée par plusieurs mécanismes moléculaires, dont la production de biofilm de nature polysaccharidique et l'expression de facteurs de virulence déclenchant des réponses immunitaires chez l'hôte ou favorisant l'adaptation de *C. acnes* à son environnement. Divers gènes de facteurs de virulence putatifs ont été identifiés dans le génome de *C. acnes*. Certains peuvent être impliqués dans l'adhésion cellulaire, tandis que d'autres peuvent être à l'origine de l'inflammation et sa propagation, de l'invasion/dégradation des tissus chez l'hôte et de la synthèse des polysaccharides de la capsule (voir figure 11). Ces gènes putatifs codent pour des sialidases, des neuraminidases, des endoglycocéramidases, des adhésines, des protéines de choc thermique, des glycosidases, isomérase d'acide gras polyinsaturé, RoxP, sortase F et la protéine DsA1 dont les principaux sont:

- 1) Lipases : sont les enzymes responsables du métabolisme du sébum et de la libération des acides gras libres en plus de plusieurs triglycérides, les lipases semblent jouer un rôle déterminant dans la croissance de *C. acnes* en milieu lipophile.
- 2) Hyaluronate Lyase : l'hyaluronate lyase (HYL) est une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique (HA) et d'autres glycosaminoglycanes (GAG), présents dans la matrice

extracellulaire de l'épiderme et du derme. Elle est considérée comme un facteur de virulence en facilitant l'invasion bactérienne des tissus et dégradant les composés des couches supérieures de la peau et de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi la propagation de l'inflammation.

- 3) Porphyrines : les porphyrines sont des molécules fluorescentes capables d'induire une inflammation.
- 4) Biofilm : les bactéries peuvent former des biofilms qui confèrent aux bactéries une résistance à certains antibiotiques non observée sous la forme planctonique. Le biofilm de *C. acnes* contient majoritairement des polysaccharides poly-(1-6)-N-acétylglucosamine (PNAG), des protéines, dont la chaperonine GroEL, les facteurs d'élongation et de nombreuses enzymes.
- 5) Pili/fimbriae : de nombreuses bactéries expriment des appendices protéiques à leur surface pour interagir avec la cellule hôte à des fins d'adhésion et faciliter sa colonisation.
- 6) Facteurs CAMP : les facteurs Christie-Atkins-Munch-Petersen sont des toxines qui forment des pores dans les membranes entraînant des lésions tissulaires de l'hôte (Mayslich et al., 2021).



**Figure 11** : Protéines immunoréactives majeurs de *P.acnes* (Heslan et Mamou, 2019).

### 8. Profil de résistance :

Comme toutes les bactéries anaérobies, *C. acnes* est naturellement résistante aux aminoglycosides, à l'aztréonam et au triméthoprim. Par ailleurs, elle est également résistante aux 5-nitroimidazoles, à la fosfomycine et à la colistine (**Fougnot, 2003**).

La résistance acquise concerne certains antibiotiques utilisés pour le traitement de l'acné, à savoir les macrolides (15 à 20 % des souches de *C. acnes* résistantes à la clindamycine), les fluoroquinolones (40% de souches I ou R à l'ofloxacine) et les tétracyclines (**Barbeyrac, 2014**).

Elle est sensible à de nombreux antibiotiques, comme les bêta-lactamines (y compris amoxicilline et très sensible au céfotaxime), ciprofloxacine, moxifloxacine et rifampicine (**Barbeyrac, 2014**).

### 9. Activité antibactérienne :

En analysant le génome d'une bactérie du microbiote cutané, des biologistes ont mis en évidence un groupe de gènes codant un nouveau antibiotique désormais nommé « cutimycine » dont la structure ressemble à celle d'un antibiotique connu, la berninamycine, un thiopeptide est produit par la bactérie *Streptomyces bernensis* (**Mangin, 2020**).

Après avoir isolé et purifié cette molécule, les chercheurs l'ont testée sur différentes souches bactériennes. Ils ont démontré que la cutimycine inhibe le développement de plusieurs espèces de staphylocoques, dont le doré, y compris certains *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline. C'est une source d'espoir pour lutter contre des maladies impliquant cette bactérie (**Mangin, 2020**).

En revanche, la cutimycine n'a montré aucune activité contre d'autres commensaux cutanés courants (**Mangin, 2020**).



# Chapitre 03

## Chapitre 03 : La cutimycine

### 1. Définition :

La cutimycine est une substance antibactérienne naturelle d'origine chromosomique de type peptidique élaborée par la bactérie *Cutibacterium acnes*, c'est un métabolite secondaire extracellulaire de synthèse ribosomique.

Ce néo antibiotique est un thiopeptide qui appartenant à la famille de sulfure, utilisé dans le cadre de compétition contre les germes de genre *Staphylococcus* (y compris certains staphylocoques multirésistants dont le doré), il est également connu de berninamycine-like à cause de leurs forte similarité en structure (Vinogradov et al., 2020).

Bien que connus depuis plus de 50 ans, les molécules bioactives de type bactériocines suscitent actuellement un très fort regain d'intérêt de la communauté scientifique internationale en raison de leur puissance remarquable (Martin, 2011).

### 2. Découverte :

Récemment, Katherine Lemon de l'institut de microbiologie Forsyth, à Cambridge, aux États-Unis et ses collègues sont intéressés au génome de *Cutibacterium acnes* qui fait partie de microbiote cutané humain (Mangin, 2020). L'analyse de génome a mis en évidence un groupe de gènes biosynthétiques (BGC) codant un nouveau antibiotique. Après avoir isolé et purifié cette molécule, ils l'ont nommé «cutimycine» (Mangin, 2020).

Ensuite, des tests de compétitions *in vitro* ont montré que la cutimycine a une puissante inhibition contre *S. aureus* résistante à la méthicilline ainsi que des souches de *Staphylococcus epidermidis* (Claesen et al., 2020).

Pour déterminer si la cutimycine est produite *in vivo* dans l'habitat naturel de *C. acnes*, ils ont utilisé la spectrométrie de masse ciblée, ils ont détecté la cutimycine dans 28 % des échantillons avec des concentrations à 0,97 +/- 0,12 µm. Sur la base de ces données, ils ont mis en œuvre que la cutimycine joue un rôle dans la modulation des quantités de *Staphylococcus* dans le contexte de la colonisation cutanée humaine (Claesen et al., 2020).

Il est noté que parmi les BGC thiopeptidiques les plus largement distribués dans le microbiome humain est celui qui code pour la cutimycine, il est présent dans les génomes d'environ 4 % seulement des isolats de *C. acnes* séquencés, dont la plupart appartiennent à un

clade commun comprenant la souche KPA171202, donc elle devient l'un des rares BGC du microbiome cutané humain à fonction moléculaire connue (Claesen et al., 2020).

Face à l'apparition alarmante et continue de résistance massive des bactéries à l'arsenal actuel d'antibiotiques, cette découverte est une source d'espoir, car ces bactéries apparues en 1961, soit deux ans à peine après le début de l'utilisation de la méticilline, sont aujourd'hui courantes en milieu hospitalier et entraînent de nombreuses septicémies (Mangin., 2020).

### 3. Propriétés moléculaires, physicochimiques et structurales :

La détermination de la masse moléculaire précise à 1131,3411 g/mol a permis de prédire une formule chimique de  $C_5 H_{51} N_1 O_4 S_{15}$  avec une masse monoisotopique prévue de 1131,3373 m/z (Claesen et al., 2020).

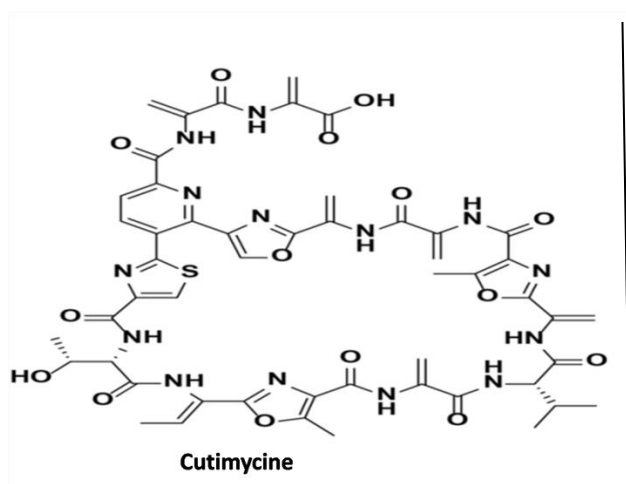
La cutimycine est une substance antagoniste cationique, thermorésistante et amphiphatique.

La structure des thiopeptides a été étudiée à l'aide de différentes techniques, qui ont également été utilisées pour élucider la conformation active et les contacts clés nécessaires à l'exercice de leur activité biologique (Just-Baringo et al., 2014).

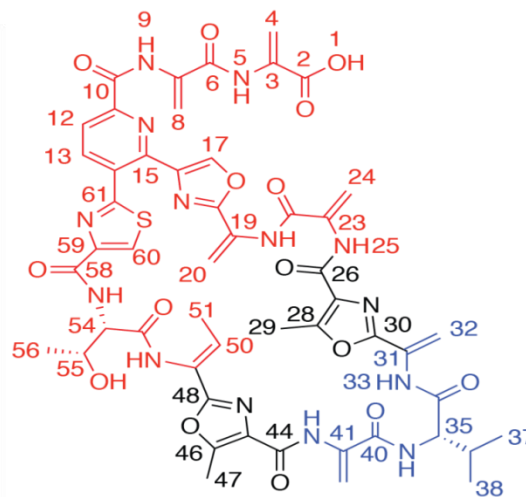
D'un point de vue structurel, cet antibiotique appartient à la famille de cyclopeptides azoliques, caractérisé par la condensation de certaines unités sérine, thréonine ou cystéine, avec des fonctions amide qui confèrent la rigidité requise par des liaisons efficaces (Claesen et al., 2020).

Il est constitué de trois composants principaux : noyau pyridinique, cycle macrocyclique et une queue. Le cycle pyridine central à six chaînons contenant de l'azote est le repère de cette structure. Une boucle macrocyclique de 35 atomes sert d'échafaudage pour une queue qui incorpore également des acides aminés et tous les deux peuvent être décorés avec divers acides déhydroaminés, thiazoles et les oxazoles (Claesen et al., 2020).

La cystéine est la particularité de cette molécule qui possède un soufre lié au carbone  $\alpha$  du peptide d'où leur structure cyclique (voir figures 12 et 13).



**Figure 12 :** La structure de thiopeptide cutimycine produit par *Cutibacterium acnes* (Claesen et al., 2020).



**Figure 13 :** La structure de cutimycine (Claesen et al., 2020).

**Remarque :** Etant donné que la cutimycine fait partie de la classe I des bactériocines qui sont modifiés par adaptation enzymatique après traduction et appartient à la série d selon leur état d'oxydation, elle répond donc aux règles suivants :

#### 4. Voie de biosynthèse :

La machinerie cellulaire des bactériocines n'a été élucidée que très récemment grâce aux efforts conjoints de la bioinformatique et de l'exploration du génome qui ont été essentiels pour l'identification de la voie de biosynthèse des antibiotiques et le système enzymatique nécessaire pour être actif (Just-Baringo et al., 2014).

La cutimycine est un RIPP (peptides synthétisés par ribosome et modifiés post-traduction) repose sur la synthèse d'un précurseur peptidique, par traduction d'un ARNm encodé dans le génome de la bactérie, réalisée au sein du ribosome, qui est suivie des modifications enzymatiques après translationalisation (Claesen et al., 2020).

Les bactériocine de classe I produisent par voie ribosomale dans le cytoplasme de la cellule productrice sous forme d'un précurseur inactif. Ce peptide précurseur linéaire est divisé en deux régions différentes, un peptide structural à l'extrémité C-terminale, qui contient les acides aminés qui constitueront le thiopeptide lui-même, et un peptide leader à l'extrémité N-terminale qui est clivé au cours du processus de bio-synthèse. Le peptide «signal» ou «leader» permet la sécrétion de la bactériocine dans le milieu extérieur et protège la bactérie contre l'action de sa propre bactériocine.

Les gènes impliqués dans la production des thiopeptides sont organisés sous forme d'opéron contenant des gènes de structure et des gènes d'immunité co-transcrits. Les éléments nécessaires à leur exportation trouvés sur un autre locus (**Taale et al., 2016**).

La production des molécules compétitives est souvent régulée par un système de Quorum Sensing, un mécanisme permettant à certains gènes d'être exprimés en fonction de la densité de population bactérienne (**Taale, 2016**).

- **Biosynthèse totale des thiopeptides antibiotiques :**

Les procédés de marquage ont montré que l'intégralité des composants des thiopeptides antibiotiques avait pour origine des acides aminés qui sont les briques élémentaires, aussi bien la partie peptidique que le cœur hétérocyclique (**Martin, 2011**).

- la cystéine est synthétisée d'abord à partir de la sérine par acétylation du groupement hydroxyle à l'aide du co-facteur acétylcoenzyme a suivi de la substitution du groupement acétate par un ion sulfure.
- Ensuite, la condensation du thiol de la cystéine ou de l'alcool de la sérine sur le groupement carbonyle de la liaison amide adjacente suivie de l'élimination d'une molécule d'eau conduit à la formation des unités azoliques.
- les résidus dehydro-alanines sont obtenus par élimination d'une molécule d'eau à partir de la sérine. La réduction consécutive de la double liaison permet en outre la formation d'une unité alanine.
- Concernant le cœur hétérocyclique central, il provient de la condensation de deux résidus dehydro-alanines selon un processus complexe souvent représenté comme une cycloaddition.
- A la suite de cette étape, l'élimination d'une molécule d'eau conduit à une 3-aminodehydropyridine, qui constitue un précurseur au cœur hétérocyclique.
- En effet, une réaction de désamination permet la formation de la pyridine caractéristique de cette structure (**Martin, 2011**).
- L'adaptation C-terminale est l'une des dernières étapes de la maturation des thiopeptides (**Just-Baringo et al., 2014**). (voir figure 14).



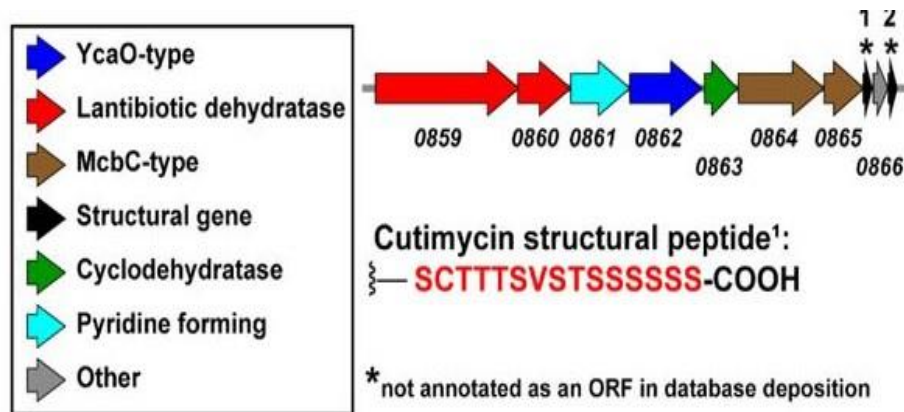


Figure 14 : Représentation en flèche du BGC PPA0859-0866 de *Cutibacterium acnes* KPA171202 (Claesen et al., 2020).

La séquence d'acides aminés de la cutimycine est :

**Peptide leader**— Sérine-Cystéine-Thréonine-Thréonine-Thréonine-Sérine-Valine-Sérine-Thréonine-Sérine-Sérine-Sérine-Sérine-Sérine-Sérine-COOH.

## 5. Activité antibactérienne :

### 5.1. Mécanisme d'action :

L'identification de la cible est la caractéristique la plus discriminante d'un nouvel antibiotique c'est-à-dire du constituant sur lequel il se fixe pour inhiber la croissance de la bactérie pathogène.

Généralement, le mécanisme d'action des thiopeptides se décompose en trois étapes :

- La fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible ou le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle lui permettant d'exprimer son activité.
- L'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique avec recrutement de plusieurs peptides antibactériens pour former un pore.
- Enfin, la formation de pores entraînent la dissipation du potentiel électrique et du gradient pH et des effets néfastes pour la cellule cible (Taale et al., 2016).

Concernant l'activité antibiotique, elle consiste en l'inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique lors de la synthèse protéique bactérienne. Les données cristallographiques ont montré que les bactériocines de classe I se lient à l'interface de la protéine de jonction L11 et de l'ARNr 23S (hélices 43 et 44) de la sous-unité ribosomique bactérienne 50S. Cette interaction affecte le facteur d'élongation GTPase (EF-G) en réduisant l'affinité de liaison de

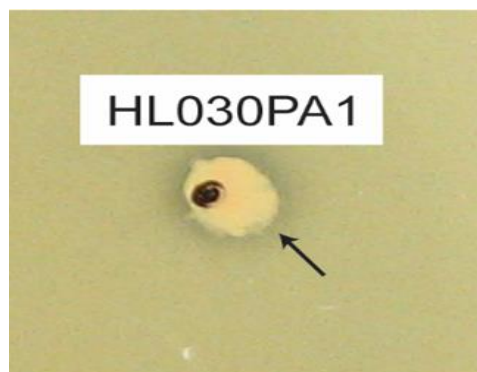
EF-G au ribosome, qui est nécessaire pour la translocation de l'ARNm et l'ARNt (Chan et Burrows, 2020).

La cutomycine est un inhibiteur très efficace dans la réaction de traduction ce qui réduit la croissance de la bactérie cible.

Cependant, le mécanisme exact est mal connu qui fait l'objet d'un débat actuellement (Chan et Burrows, 2020).

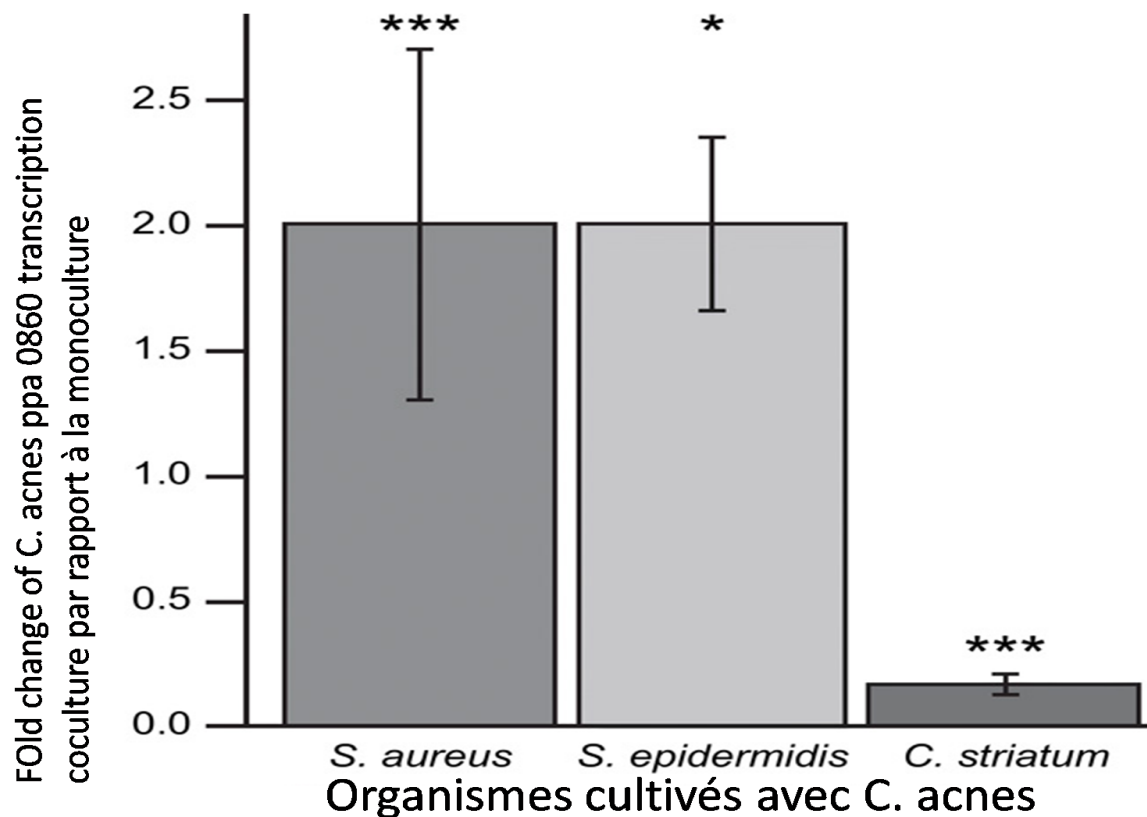
### 5.2. Spectre d'activité :

La cutimycine a une activité puissante *in vitro* contre les staphylocoques. Pour déterminer si la production de ce composé affecte la compétition entre *C. acnes* et *Staphylococcus*, un test de compétition *in vitro* a été effectué avec une souche de *C. acnes* contre *S. aureus* UAMS-01 dans des conditions de faible pH et de lipides élevés, imitant l'environnement folliculaire naturel. Le résultat a montré une zone d'inhibition pour *C. acnes* HL030PA1 contre *S. aureus* (Claesen et al., 2020). (voir figure 15).



**Figure 15** : Essai de compétition entre *C. acnes* et *S. aureus* dans des conditions imitant l'environnement folliculaire naturel (Claesen et al., 2020).

Le transcrits ppa0860 de la cutimycine de la souche *Cutibacterium acnes* KP171202 est doublé en présence de *S. aureus* ou *S. epidermidis* mais ont diminué en présence de *C. striatum* (0,16 fois) ce qui indique que la transcription de la cutimycine est augmentée sélectivement par la présence de la cible *Staphylococcus*, contrairement aux espèces résistantes. En outre, la régulation de la cutimycine pourrait être influencée à la fois par d'autres bactéries colonisatrices et par des facteurs hôtes (Claesen et al., 2020). (voir figure 16).



**Figure 16** : La transcription du BGC Cutimycine chez *C. acnes* augmente en coculture avec des espèces de staphylocoques (Claesen et al., 2020).

Sur la base de la similitude structurelle de la cutimycine avec la berninamycine et les résultats du test de compétition *in vitro*, il est évident qu'elle affiche une activité anti-staphylococcique mais manquerait d'activité contre les commensaux cutanés courants d'Actinobacteria (Claesen et al., 2020).

Pour cela, on a déterminé les CMI pour la cutimycine par rapport à une sélection d'espèces couramment trouvées sur les sites cutanés, y compris les narines. La cutimycine a montré une puissante inhibition de la souche NRS384 de *S. aureus* résistante à la méthicilline associée à la communauté USA300 (CMI 0,2  $\mu$ M), ainsi que des souches de *Staphylococcus epidermidis*. En revanche, un panel d'autres souches de *C. acnes*, plus deux espèces cutanées communes et deux espèces nasales de *Corynebacterium* (phylum Actinobacteria) ont montré une résistance accrue à la cutimycine avec des CMI  $\geq 3,2$  Mm (Claesen et al., 2020).

Ces données nous ont amenés à émettre l'hypothèse que la cutimycine favorise la croissance des actinobactéries cutanées résidentes, y compris *C. acnes*, par rapport à celle des espèces staphylococciques cutanées courantes (Claesen et al., 2020). (voir tableau 03).

**Tableau 03** : Concentrations minimales inhibitrices pour la cutimycine et la berninamycine (**Claesen et al., 2020**).

Souche	Cutimycine
<i>C. acnes</i> KPA171202*	>3.2
<i>C. acnes</i> HL030PA1*	>3.2
<i>C. acnes</i> HL110PA1	>3.2
<i>C. acnes</i> HL086PA1	>3.2
<i>C. acnes</i> HL053PA2	>3.2
<i>S. aureus</i> USA300 NRS384	0.2
<i>S. aureus</i> UAMS-1	0.8
<i>S. epidermidis</i> W23144	0.2
<i>S. epidermidis</i> DSM20042	0.8
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3.2
<i>C. accolens</i> ATCC 49725	>3.2
<i>C. jeikeium</i> DSM7171	>3.2
<i>C. striatum</i> DSM20668	3.2
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> DSM44287	>3.2

Notre élucidation de la fonction de la cutimycine facilitera l'exploration des applications cliniques possibles de la cutimycine, pour inhiber sélectivement la colonisation par *Staphylococcus*, tout en laissant intactes les actinobactéries commensales (**Claesen et al., 2020**).

### Conclusion :

A ce jour, seuls trois thiopeptides sont commercialisés. Bien que deux soient exclusivement dédiés à un usage vétérinaire, le thiostrepton et la nosiheptide (**Just-Baringo et al 2014**). La nisine est utilisée en domaine alimentaire en tant que conservateur (**Taale et al., 2016**).

Dernièrement, différentes stratégies ont été envisagées pour accomplir la synthèse chimique de cette classe d'antibiotiques mais elle est compliquée, coûteuse à cause de leur architecture complexe et structure difficile.

Il est donc nécessaire de produire de nouveaux thiopeptides par d'autres procédures fiables et économiques par ce qu'elles présentent un large champ d'investigation et sont la clé du développement futur des différents domaines notamment le clinique (**Just-Baringo et al 2014**).



# **Chapitre 04**

## Chapitre 04 : Méthodologie d'étude de la souche productrice de la cutimycine

Bien que connus depuis plus de 50 ans, les thiopeptides antibiotiques suscitent actuellement un très fort regain d'intérêt de la communauté scientifique internationale dans le cadre de la recherche urgente de nouvelles thérapies antibiotiques en raison de leurs propriétés antibactériennes remarquables, notamment contre les *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthiciline, impliquées dans de nombreuses infections qui engagent la vie des patients (Thibaut, 2011). Par conséquent, la recherche de nouveaux antibiotiques est devenue essentielle (Foti et al., 2021).

Depuis 2015, les recherches se concentrent sur la découverte des voies de la biosynthèse, le développement des méthodes de synthèse totale et la compréhension de l'activité biologique des thiopeptides (Chan et Burrows, 2020).

Dans cette partie, on va mentionner les méthodes principales qui ont été utilisées par le groupe de recherche (Katherine Lemon et ses collègues de l'institut de microbiologie Forsyth) et qui peuvent être un modèle de recherche dans des travaux ultérieurs pour mieux comprendre notre molécule, ainsi que d'autres méthodes originales publiés.

### 1. Prélèvement et Isolement microbiologique de *Cutibacterium acnes* :

Généralement, les isolats cliniques de *C. acnes* sont obtenus par écouvillonnage lésionnel et sites non lésionnels de la peau du visage des patients souffrant d'acné diagnostiqués, ainsi que des volontaires sains. Les sujets comprenaient à la fois hommes et femmes âgés de 14 à 35 ans. Tous les volontaires ont été informés du but de cette étude et ont signé un formulaire de consentement (O'Neill et al., 2020).

Les patients souffrant d'acné au moment du prélèvement de l'échantillon n'utilisaient aucun produit topique ou antibiotique systémique ou rétinoïde et ont reçu pour instruction d'éviter tout lavage et application cosmétique sur les sites cutanés dans le précédent 24 heures (O'Neill et al., 2020).

Il y avait plusieurs sites de prélèvement de peau pour la collecte d'échantillons : tout type de lésion acnéique (papules, pustules, nodules, kystes), front, joue droite, joue gauche, nez et menton, poitrine et dos qui ont été approuvée par le comité d'éthique, aussi les doigts de la main et les sites de possession (le côté droit du clavier et du côté gauche du clavier, du pavé

tactile de l'ordinateur portable et de l'écran du Smartphone) (Yang *et al.*, 2019).

Les patients qui souffrent d'une constitution cicatricielle avec de graves complications médicales, grossesse et allaitement, patients avec d'autres formes de l'acné comme acné conglobata et acné fulminant et les maladies systémiques ont été exclus de cette étude (El-Tonsy *et al.*, 2018).

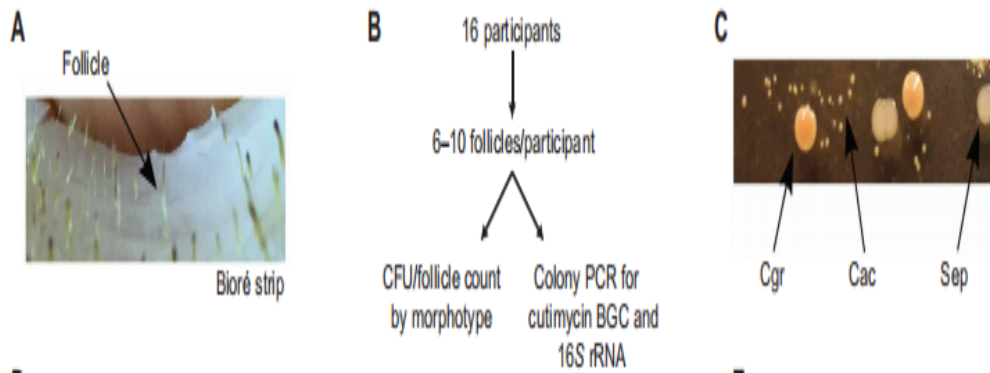
Après avoir essuyé les surfaces des lésions acnéiques des patients avec de l'alcool éthylique à 70 % et laisse sécher, des papules sont prélevés avec des écouvillons humidifiés par une solution saline pendant 30 s ou bien humecté de bouillon nutritif. S'il s'agit d'une pustule ou d'un nodule, le contenu de la lésion est prélevé avec une aiguille à insuline (Özel Kaya *et al.*, 2021).

Dans d'autres études, la stérilisation de la peau se fait avec la teinture d'iode et les lésions acnéiques ont été comprimées avec un extracteur de comédons (Zhang *et al.*, 2019).

Alors que d'autres utilisent une lancette pour faire une égratignure sur la surface de la lésion et le contenu est ensuite extrait avec une légère pression de la main (Naghdi et Ghane, 2017).

Selon Katherine Lemon *et al.*, le contenu des follicules pileux de la peau a été récolté à partir des unités pilo-sébacées sur la surface externe du nez humain en utilisant les bioré bandes nettoyantes en profondeur pour les pores. Ils ont été immédiatement prélevé des bouchons folliculaires individuels sur la bande de pores fraîche de chaque participant avec un embout de pipette stérile et les remis en suspension séparément. Des dilutions en série sont effectuées et placées sur gélose BHI pour calculer les UFC après l'incubation (Claesen *et al.*, 2020). (voir figure 17 ).

Les échantillons transportés au laboratoire doivent avoir un milieu de transport anaérobie : solution saline physiologique tamponnée au phosphate (Özel Kaya *et al.*, 2021).



**Figure 17 :** La cutimycine modifie le rapport entre *C. acnes* et *S. epidermidis* dans les follicules pileux de la peau humaine. (A) La photographie montre une bande de pores Bioré contenant des follicules pileux de la peau prélevés à la surface du nez humain. (B) Le schéma montre le plan expérimental. Des bouchons de follicules de poils de peau ont été prélevés sur 16 volontaires sains. (C) La photographie montre les isolats bactériens cultivés à partir du contenu des follicules pileux de la peau humaine, révélant les morphologies distinctes des colonies de *C. acnes* (Cac), *S. epidermidis* (Sep) et *C. granulosum* (Cgr) (Claesen et al., 2020).

## 2. Culture et incubation de *Cutibacterium acnes* :

Après avoir transporté les échantillons, chaque spécimen a été inoculé sur deux boîtes de gélose au sang et incubé dans une chambre d'anaérobiose à 37°C Pendant 2 à 7 jours (Zhang et al., 2019).

Cependant, d'autres incubent des écouvillons dans un milieu clostridien renforcé, vortexé et étalé sur brucella enrichie et incubé dans un anaeropack (O'Neill et al., 2020).

Tous les échantillons ont été placés dans un bouillon de glycérine à 40 % et conservés à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ADN (Zhang et al., 2019) ou bien sous forme de stocks congelés dans un format de 96 puits (Claesen et al., 2020).

L'état physiologique de la bactérie productrice et les conditions expérimentales (concentration et pureté de la bactériocine, concentration de la cellule cible et milieu de culture) influencent l'action de l'antibiotique (Taale et al., 2016).

## 3. Test d'antagonisme pour dépister l'activité antimicrobienne :

Pour développer un test de compétition pour *C. acnes* et *S. aureus* qui imite l'environnement folliculaire naturel, le milieu de gélose BHI est complété avec 1 % de Tween80 comme source de lipide supplémentaire et le pH est ajusté à 5,5 conformément au



pH de la peau. *C. acnes* est déposée sur les plaques et incubée dans des conditions anaérobies (Claesen et al., 2020).

Après 5 jours d'incubation anaérobie à 30°C, les plaques sont recouvertes d'un top agar nutritif mou, ensemencé avec *S. aureus* UAMS-01 comme compétiteur. Des zones d'inhibition sont observées après incubation à 37°C pendant 15 heures (Claesen et al., 2020).

L'influence de *C. acnes* sur *S. aureus* est déterminée aussi à partir des surnageant des clones de *C. acnes* cultivé pendant cinq jours (Francuzik et al., 2018).

Les colonies de *C. acnes* sont centrifugées. *S. aureus* est ensuite cultivé dans du milieu LB frais avec ou sans addition de surnageant de *C. acnes* à des concentrations croissantes (0 %, 6,25 %, 12,5 %, 25 %, 50 % et 100 %) (Francuzik et al., 2018).

#### 4. Identification de l'espèce *Cutibacterium acnes* :

##### ➤ Identification phénotypique :

Après l'obtention d'une culture bactérienne pure, l'identification des isolats bactériens est réalisée en fonction de la morphologie coloniale sur des milieux de culture spécifiques, de la coloration de Gram et des réactions biochimiques à l'aide du système RapID ANA ou avec un système API-20A (Alkhawaja et al., 2020). Des tests de sensibilité aux antimicrobiens ont été effectués.

##### ➤ PCR avec des amorces spécifiques :

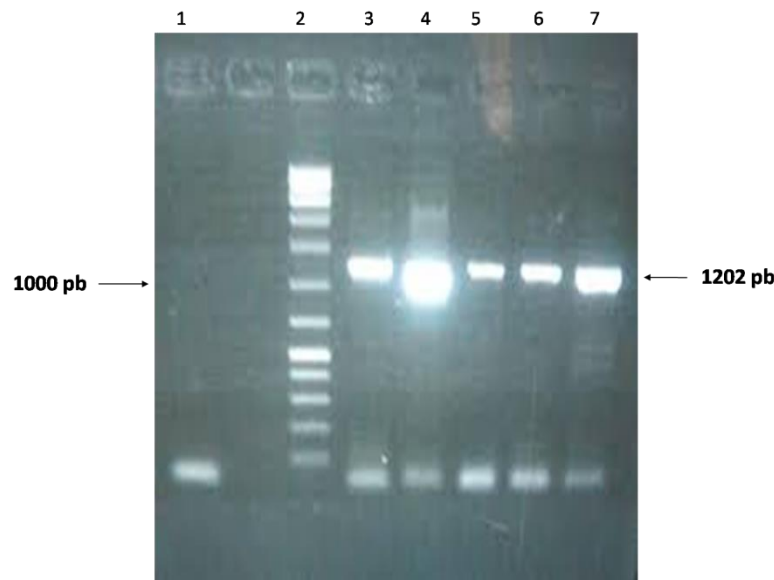
Une paire d'amorces spécifiques synthétisées ou un Kit PCR fabriqué sont utilisés pour effectuer la PCR (Naghdi et Ghane, 2017). Le mélange est ensuite bien vortexé, centrifugé et placé dans un thermocycleur. La PCR est réalisée en 35 cycles (Naghdi et Ghane, 2017). (voir tableau 04).

**Tableau 04** : Séquence d'amorce (Naghdi et Ghane, 2017).

Amorce	Séquence de l'amorce	Produit PCR
Amorce 1	5'-AGC TCG GTG GGG TTC TCT CAT C-3'	1202 pb
Amorce 2	5'-GCT TCC TCA TAC CAC TGG TCA TC-3'	1202 Pb

## ➤ Electrophorèse :

Pour réaliser l'électrophorèse, un volume chaque échantillon est transféré dans des puits de gel d'agarose avec un 1kb échelle d'ADN et ensuite soumis à une électrophorèse à 75 V pendant 40 min. Le gel est ensuite transféré dans un Transilluminateur et le dupliqué 1202 paires de bases est examiné sous lumière UV (Naghdi et Ghane, 2017). (voir figure 18).



**Figure 18** : Produits d'amplification soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose (1,5 %). Puit 1 : Négatif contrôler, Puits 2 : échelle d'ADN de 1kb, Puit 3 : témoin positif, Puit 4 à 7 : *P.acnes* positif échantillons (Naghdi et Ghane, 2017).

### 5. Identification de la souche *Cutibacterium acnes* KPA171202 par séquençage :

Pour confirmer les résultats obtenus à partir de la PCR, des échantillons sont sélectionnés pour le séquençage. Un total de produit de PCR est transféré à macrogen co encorée pour pouvoir déterminer la séquence et identifier les souches isolées.

Les séquences obtenues ont été prédites avec le pipeline d'annotation du génome procaryote du centre national pour les informations biotechnologiques (NCBI) ou le service web automatisé ; Technologie de sous-système d'annotation rapide (RAST) (Hui-jing, 2020).

Le séquençage du génome peut être aussi réalisé à l'aide de la technologie de séquençage MiSeq (Illumina), la technologie de pyroséquençage ou par la méthode Sanger. La séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S obtenue a été recherchée par rapport au projet de base de données ribosomiques (RDP) (O'Neill et al., 2020).

## 6. Fermentation et purification de la cutimycine :

- Des cellules de *Cutibacterium acnes* sont cultivées dans un bocal anaérobie (La concentration en oxygène, la température, le pH et les niveaux de nutriments doivent être optimaux et sont étroitement surveillés et ajustés si nécessaire) (Zhang et al., 2018).
- Une pré-culture est préparée dans des tubes de type flacon de 15 ml pour préparer l'inoculum et après que les cellules ont atteint la phase logarithmique, elles sont utilisées pour préparer l'inoculum final.
- L'inoculum final est préparé dans un flacon Erlenmeyer de 250 ml dans un milieu de culture optimale conçu avec une DO<sub>600</sub> initiale de 0,1.
- Après que les cellules aient atteint la phase logarithmique, les cellules sont inoculées dans le fermenteur à un taux de 5 à 10 % v/v de sorte que la DO<sub>600</sub> initiale dans le fermenteur était d'environ 0,1.
- Un fermenteur Biostat MD de 3 litres est utilisé pour la production des bactériocines, 2 litres du milieu de culture sont transférés dans le fermenteur dans des conditions stériles (Modiri et al., 2021).

Au laboratoire, la purification des bactériocines implique de nombreuses étapes :

- Les cellules sont éliminées par centrifugation à 8000 tr/min pendant 3 min.
- Une précipitation au sulfate d'ammonium permettant de concentrer la bactériocine à partir du surnageant de la bactérie productrice.
- Une extraction/purification au chloroforme et au méthanol.
- Une chromatographie liquide à haute pression et en phase inverse est ensuite développée pour standardiser ces méthodes ou par filtration à travers un filtre de 0,22µm et dialysée à l'aide d'une membrane de coupure (Proutière, 2021).

Selon Katherine Lemon et al, un extrait sec de *C. acnes* portant la cutimycine BGC est soumis à un gradient éluotrope par étapes (50, 60, 70, 80, 90, 100 % de méthanol avec de l'eau, fractions de 40 ml) sur une colonne pré-remplie discovery C18 de 5 g.

Les fractions de méthanol à 80, 90 et 100 % sont déterminées comme contenant de la cutimycine et sont combinées et concentrées à sec sous vide pour donner une huile mousseuse jaune.

Le produit est remis en suspension dans 2 ml de méthanol et la solution résultante est purifiée sur une HPLC Agilent. Après chaque gradient, la colonne est lavée avec 90 % MeOH/ 10 % MeCN pendant 5 min et équilibrée aux conditions initiales pour 5 min (Claesen et al., 2020).

#### 7. Concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée (Andrews, 2001).

Le teste d'activité inhibitrice de la cutimycine s'effectuée contre un ensemble de bactéries de la peau, dont des souches de *C. acnes* (KPA171202, HL030P A1, HL110PA1, HL086PA1 et HL053PA2), les souches de *Staphylococcus* (*aureus* USA300, NRS384 et UAMS-1 et *epidermidis* W23144, DSM20042, et ATCC 35984), et des souches de *Corynebacterium* (*accolens* ATCC 49725, *jeikeium* DSM7171, *striatum* DSM20668 et *pseudodiphtheriticum* DSM44287). *Corynebacterium spp.* et *Staphylococcus spp.* sont cultivés en aérobiose à 37°C pendant la nuit dans du BHIT ou du TSB, respectivement et inoculés dans leur milieu d'essai frais respectif à une dilution finale de 1:2500. Les *Cutibacterium spp.* sont cultivées en anaérobiose à 37°C dans BHI pendant 4 jours avant d'être inoculées dans le milieu d'essai à une dilution finale de 1:25. La cutimycine est ajoutée au milieu d'essai à des concentrations finales de 0, 0,05, 0,2, 0,8 et 3,2 M, et les CMI sont déterminées après une incubation de 16 heures pour *Corynebacterium spp.* et *Staphylococcus spp.* et de 3 jours pour *C. acnes* (Claesen et al., 2020).

Les CMI obtenues étaient généralement cohérentes entre les duplicatas biologiques, mais lorsqu'une différence a été observée, la valeur la plus élevée est rapportée (Claesen et al., 2020). (voir tableau 03).

#### 8. Applications et avantages des bactériocines :

- Malgré les interventions et les politiques internationales hautement spécialisées en place aujourd'hui, l'émergence et la diffusion rapides d'espèces bactériennes résistantes continuent de se produire à l'échelle mondiale, menaçant la longévité des antibiotiques notamment dans le secteur médical (Meade et al., 2020).
- Les bactériocines offrent un potentiel prometteur en tant que substituts ou conjugués aux composés thérapeutiques actuels. Ces peptides non toxiques présentent une

puissance significative contre certaines bactéries (y compris les espèces multirésistantes), tandis que les souches productrices restent insensibles aux peptides bactéricides (**Meade et al., 2020**).

- Les progrès dans l'identification des bactériocines et leur caractérisation ont suscité un intérêt pour l'utilisation de ces molécules soit comme nouveaux additifs alimentaires soit comme agents thérapeutiques dans les secteurs de l'alimentation, de la santé et de la médecine vétérinaire (**Heilbronner et al., 2021**).
- Comme les bactériocines sont incolores, inodores et insipides, elles peuvent être incorporées dans des produits alimentaires sans modifier leurs propriétés organoleptiques. De plus, plusieurs bactériocines sont stables à faible pH, à haute température (**Heilbronner et al., 2021**).
- De plus, les bactériocines ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes et perdent leur activité dans le tractus gastro-intestinal en présence des protéases ; ces deux propriétés permettent de les classer dans la catégorie des substances sans danger pour l'homme (**Taale, 2016**).
- En tant qu'agents antimicrobiens naturels, les bactériocines sont une alternative intéressante aux conservateurs chimiques (**Meade et al., 2020**).
- La probabilité qu'un mécanisme d'échappement (une multirésistance) puisse se créer contre plusieurs bactériocines est beaucoup plus faible (**Mignolet, 2019**).
- Le coût de production des bactériocines diminue de mois en mois (**Mignolet, 2019**).



# **Matériel et méthodes**

## I. Matériel biologique :

### 1) But de travail :

Nous avons choisi de mener cette recherche sur *Cutibacterium acnes*, dans le but d'isoler et purifier cette bactérie et tester l'effet antagoniste entre *Staphylococcus* et *Cutibacterium acnes*. L'étude a été effectuée sur des prélèvements cutanés à partir de volontaires acnéiques et sains.

### 2) Centre de l'étude :

L'étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Microbiologie du centre de recherche en science pharmaceutique CRSP de Constantine.

### 3) Prélèvement :

- Essuyer la surface de certains sites cutanés (narines, dos et joues) avec l'alcool éthylique à 70% et laisser sécher.
- Prélever avec des écouvillons préhumidifiés par une solution saline pendant 30 secondes (voir figure 19).



**Figure 19** : Prélèvement cutané à partir d'un bouton d'acné.

### 4) Ensemencement :

Chaque spécimen est inoculé sur toute la surface du milieu gélose au sang frais avec des stries bien serrées, l'opération est répétée 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois pour assurer une distribution uniforme, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même pour décharger la majorité de l'inoculum (voir figure 20 et 21).

Faire passer l'écouvillon sur toute la périphérie de la boîte de Pétri avant de la fermer.



**Figure 20 et 21** : Ensemencement sur gélose au sang.

### 5) Culture et incubation :

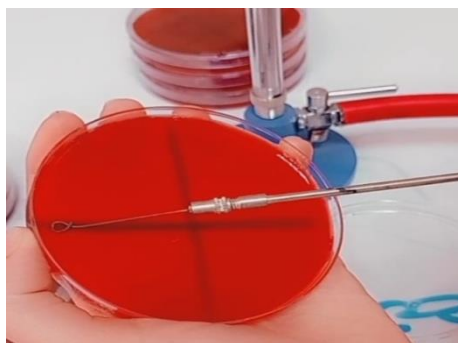
Les boîtes sont incubées dans une jarre d'anaérobiose par la méthode de bougie pendant 3 jours à 37°C (voir figure 22).



**Figure 22** : Culture dans jarre d'anaérobiose à 37°C pendant 3 jours.

### 6) Repiquage et purification :

Après incubation, chaque colonie est repiquée par la technique des cadrans sur milieu gélose au sang frais. Cette opération est répétée deux fois. Les boîtes sont incubées dans les mêmes conditions (voir figure 23).



**Figure 23** : Repiquage et ensemencement par la méthode des quatre cadrans.



## 7) Identification macroscopique :

Après l'obtention d'une culture bactérienne pure, l'examen macroscopique est la première étape d'identification en fonction de la morphologie coloniale (aspect, forme, opacité, consistance). Dans notre cas il fallait rechercher des colonies : petites colonies transparentes, opaques ou blanche, 0,4 à 0,7  $\mu\text{m}$  de largeur et de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de longueur.

## 8) Identification microscopique :

### 8.1. L'examen à l'état frais :

#### a) Principe :

L'état frais est une technique qui permet l'observation des bactéries vivantes entre lame et lamelle à l'objectif x40. Le but de cette étude est de déterminer la forme des bactéries ainsi que leur mobilité, leur morphologie et leur mode de regroupement.

#### b) Technique :

- Déposer une goutte d'eau distillée stérile sur une lame propre.
- Prélever une colonie à partir d'une culture bactérienne pure par une anse de platine stérile et l'étaler sur la lame.
- Recouvrir la goutte d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air.
- Observer immédiatement au microscope optique à l'objectif x40.
- Attendre 1 minute pour ne pas confondre une mobilité positive et un simple mouvement osmotique.

### 8.2. La coloration au bleu de méthylène :

#### a) Principe :

La coloration au bleu de méthylène (BM) permet de confirmer la forme et le mode de regroupement.

#### b) Technique :

- Déposer une goutte d'eau distillée stérile sur une lame propre.
- Prélever une colonie à partir d'une culture bactérienne pure par une anse de platine stérile et l'étaler sur la lame du centre vers l'extérieur.
- Sécher et fixer le frottis en deux ou trois passages à la flamme d'un bec Bunsen.

- Couler une solution de bleu de méthylène sur le frottis et laisser agir pendant 1-5 minutes.
- Rincer la lame à l'eau du robinet.
- Egoutter l'excès d'eau, éponger avec du papier absorbant.
- Examiner au microscope à immersion, à l'objectif x100.

### 8.3. Coloration de Gram :

#### a) Principe :

Sur le frottis bactérien préparé, le premier colorant, le cristal violet oxalate, va colorer en violet les bactéries, puis le lugol libère de l'iode qui va fixer le colorant précédent.

Un complexe iode-cristal violet se forme ; il sera solubilisé par l'alcool à 95° lors de la phase de décoloration. Uniquement pour les bactéries à Gram- .

Le deuxième colorant, dit de contraste, la fuchsine va colorer en rose les bactéries à Gram - . Les bactéries à Gram +, non décolorées par l'alcool vont conserver leur couleur violette.

#### b) Technique :

- Déposer une goutte d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette Pasteur stérile sur une lame propre.
- Prélever une colonie bien isolée avec une pipette Pasteur boutonné et la dissocier dans la goutte d'eau. Le frottis obtenu est séché, puis fixé.
- Recouvrir totalement avec du violet de gentiane pendant 1 min, rincer ensuite à l'eau de robinet. Le frottis est ensuite recouvert de lugol pendant 30 secondes.
- Décolorer par l'alcool pendant 30 secondes et laver rapidement à l'eau du robinet. Le frottis est enfin recouvert de fuchsine pendant 30 secondes, puis lavé à l'eau, séché au bec Bunsen.
- Examiner au microscope à immersion, à l'objectif x100.

Malheureusement, on n'a pas pu avoir de résultats en raison des conditions difficiles exigées pour la culture de la bactérie à savoir l'anaérobiose stricte pour l'isolement et pour l'identification biochimique nous ne disposons pas de galeries pour bactéries anaérobies.

C'est ainsi que nous avons orienté notre recherche vers le GenBank afin trouver les éléments nécessaires pour la production de la cutimycine.

## II. Etude bioinformatique :

### 1. Biosynthèse de la cutimycine :

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

La méthode de synthèse classique en utilisant la bactérie source est considérée inutile dans le cas de cet antibiotique, car *C. acnes* exige des conditions particulières de culture pour pousser en anaérobiose.

Malgré l'efficacité impressionnante de la cutimycine et ses rares caractéristiques, sa synthèse reste très difficile du fait que la durée de croissance de la bactérie est très lente (2 à 10 jours). La production elle-même de la cutimycine par la bactérie est à faible rendement et elle est augmentée sauf si sa cible est présente.

La production de bactériocines est souvent strictement réglementée pour ne permettre la production que dans des conditions de forte concurrence et lorsque la densité de cellules productrices est suffisamment élevée pour entraîner des concentrations inhibitrices de bactériocines (Heilborner et al., 2021).

En effet, certains scientifiques ont cherché pour créer des analogues de ces bactériocines par des procédures chimiques, mais, elles sont très compliquées, très exigeantes et peuvent coûter cher en même temps.

- **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'étudiantes 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 cutimycine.

### 2. Notre Proposition:

En raison de toutes les remarques citées précédemment, nous proposons une méthode alternative plus simple, moins coûteuse, autonome, rapide et plus productive. Nous parlons de la méthode du clonage en utilisant des procédures simples de la biologie moléculaire et du génie génétique (voir annexe 03).

**a. Définition du clonage :**

Le clonage est une manipulation génétique qui permet d'isoler des fragments d'acides nucléiques de leur organisme d'origine et de les propager dans un organisme hôte. 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 cutimycine pure issue de la bactérie qui la synthétise (*Cutibacterium acnes*) 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 qu'éventuellement nous serons capables de créer un microorganisme génétiquement modifié qui est capable de produire notre antibiotique à l'échelle industrielle.

**b. Les étapes du clonage :**

- 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 de l'hôte par le vecteur recombiné.
- La sélection des hôtes recombinants (Aryal, 2018).
- 

**c. Quelques notes importantes sur le gène à cloner:**

Le génome de *Cutibacterium acnes* est composé approximativement de 2,5 million pb. Il s'agit d'un chromosome circulaire correspondant à 2333 gènes potentiels (parmi eux le gène d'expression de notre ATB), qui code pour en moyenne 2577 cadres de lecture.

Le groupe de gènes biosynthétiques de la cutimycine a été déposé dans le GenBank via ce lien « <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Cutibacterium+acnes+strain+KPA171202+bacteriocin+PPA-RS04370#reference-sequences> », c'est une séquence d'ADN composé de 1200 nucléotides (voir figure 24 et 25).

## Summary

**Gene symbol** PPA\_RS04370  
**Gene description** thiopeptide-type bacteriocin biosynthesis protein  
**Locus tag** PPA\_RS04370  
**Gene type** protein coding  
**Organism** [Cutibacterium acnes KPA171202 \(strain: KPA171202\)](#)  
**Lineage** Bacteria; Actinobacteria; Propionibacteriales; Propionibacteriaceae; Cutibacterium  
**Old locus tag** PPA0860

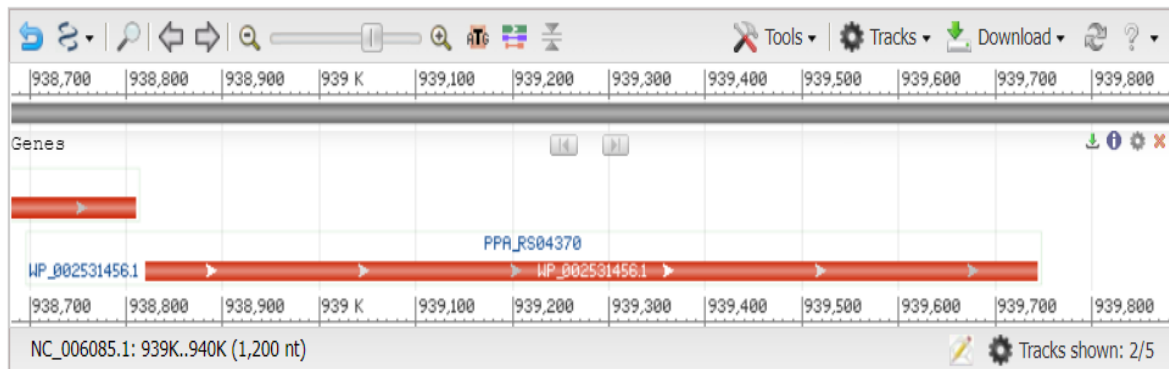
**NEW** Try the new [Gene table](#)  
 Try the new [Transcript table](#)

## Genomic regions, transcripts, and products

Go to [reference sequence details](#)

Genomic Sequence: NC\_006085.1

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)



## Bibliography

**Figure 24 et 25** : Capture d'écran de la page Web de GenBank qui illustre certaines informations sur la séquence codante de la cutimycine (**GenBank, 2021**).

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

L'isolement et le clonage de l'opéron de la cutimycine 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.

### **3.1. L'isolement de l'opéron de l'expression biosynthétique de la cutimycine :**

Afin que nous puissions séparer et isoler le gène de l'expression biosynthétique de la cutimycine à partir du génome total de *Cutibacterium acnes*, 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.

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

Les enzymes de restriction (également appelées endonucléases de restriction) sont comme des ciseaux moléculaires qui peuvent couper des séquences spécifiques d'ADN (Nagwa, 2022).

Il existe 3 types des enzymes de restriction, le type I et le type III doivent lire un site de reconnaissance spécifique pour atteindre le site de clivage, tandis que le site de reconnaissance du type II est lui-même le site de coupure ce qui rend leur manipulation plus fluide.

#### **3.1.2. Critère de choix de l'enzyme de restriction :**

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

- Elle doit couper l'ADN juste quelques bases avant le début et après la fin de la séquence du gène d'intérêt, de cette façon le fragment de restriction résultant sera notre gène d'intérêt qui code pour la cutimycine et de cette façon nous pouvons facilement le recombinaison à l'intérieur d'un vecteur.
- L'enzyme de restriction ne doit jamais couper à l'intérieur de la séquence du gène d'intérêt, sinon il sera fragmenté et il ne pourrait pas remplir sa fonction.

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

Après avoir réussi à digérer l'ADN de *Cutibacterium acnes* à l'aide de l'enzyme de restriction, l'étape suivante consiste à choisir un vecteur approprié pour le contenir, de sorte à créer un ADN recombiné pouvant être transformé en une cellule hôte pour assurer son expression.

### 3.2.1. Critères de choix du vecteur :

- 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 restrictions 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, bactériophages, 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.

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

Après avoir digéré l'ADN bactérien, le fragment de restriction contenant le gène d'intérêt aura 923 bases, il sera donc plus possible d'inclure cette séquence d'ADN à l'intérieur des vecteurs plasmidiques (car ils autorisent jusqu'à 8 k de bases).

## 3.3. 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, nous avons défini l'enzyme de restriction parfaite pour son isolement et le vecteur parfait qui le contiendra. Il ne reste qu'à trouver l'hôte cellulaire parfait qui contiendra notre ADN recombiné, une cellule qui assurera la création de plusieurs copies de notre gène lors de sa réplication, voir son expression.

En d'autres termes, nous allons littéralement créer un organisme génétiquement modifié (OGM) qui est capable de produire la cutimycine.

### 3.3.1. 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.

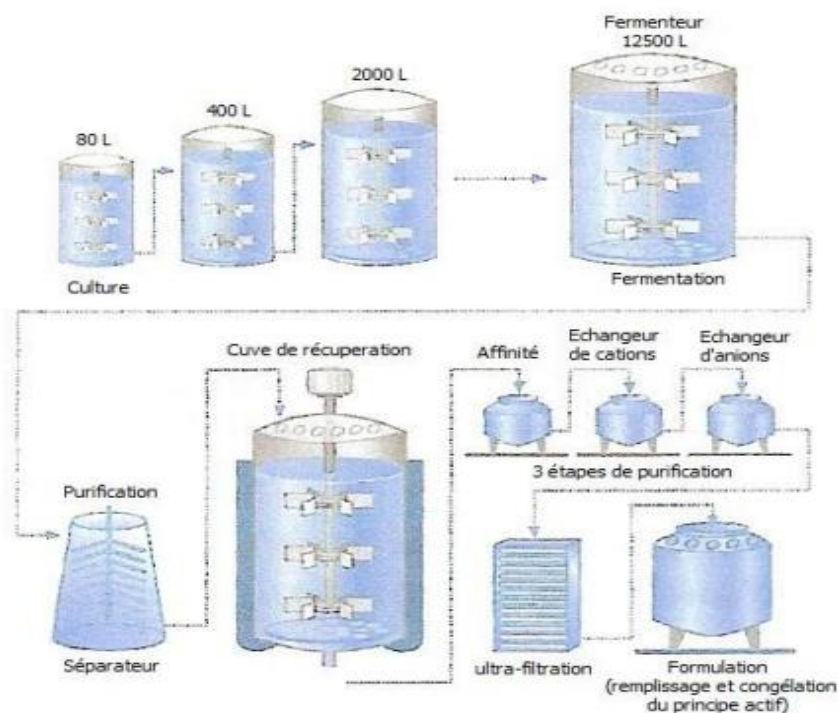
- ✓ une absence de pathogénicité.
- ✓ Stabilité (Aryal, 2018).

Compte tenu du fait que le gène de la cutimycine va être inséré à l'intérieur de la cellule hôte, il donc faut bien choisir une cellule qui n'est pas cible de cet antibiotique.

Nous avons choisi spécifiquement les cellules bactériennes et non les autres types de microorganismes en raison du choix du vecteur qui a été utilisé ; un vecteur plasmidique.

#### 3.4. La méthode proposée pour la production industrielle de la cutimycine :

La fermentation est la méthode couramment utilisée pour fabriquer des antibiotiques naturels. Après avoir sélectionné et conservé la souche bactérienne d'*Escherichia coli* (*cut20*) qui est capables de produire de grandes quantités de la cutimycine, on va pouvoir la mettre en culture dans des grands fermenteurs avec des précurseurs chimiques particuliers pour orienter la fabrication. 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). (voir figure 26 et 27).



**Figure 26:** Schéma qui représente la production des produits pharmaceutiques à l'aide des fermenteurs (Kroschwitz, 1992).



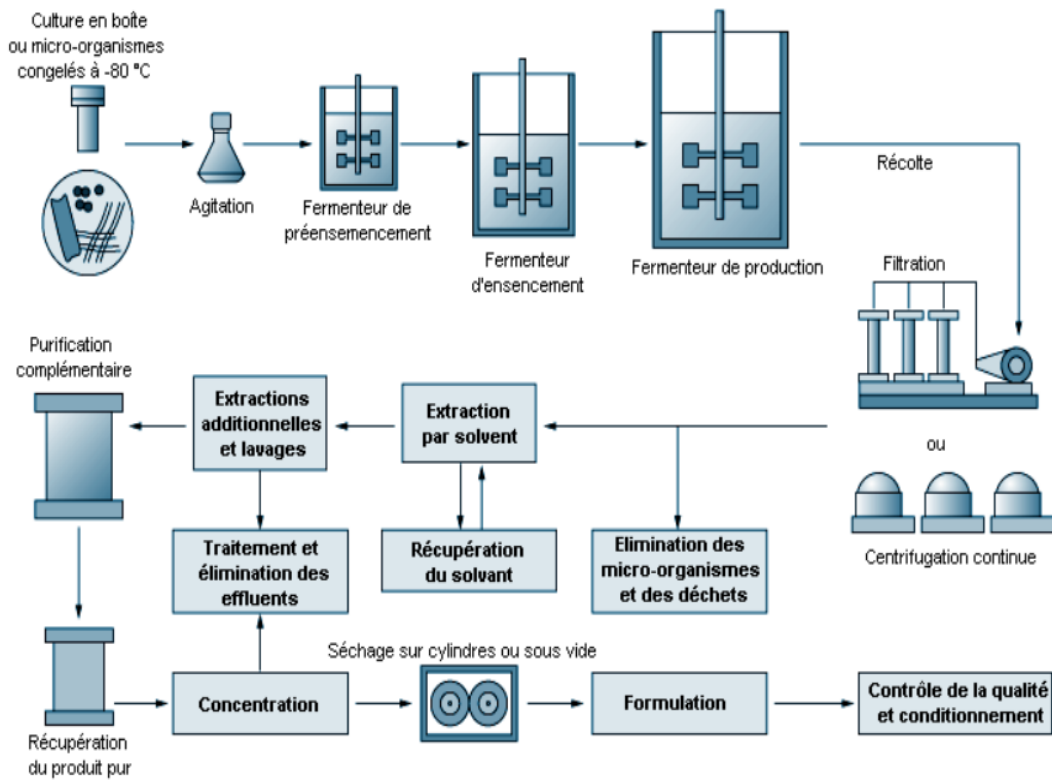


Figure 27 : Schéma d'un processus de fermentation (Kroschwitz, 1992).



# **Résultats et discussion**

**Avantages de la cutimycine :**

- D'après les données du CEPMC (Centre européen de prévention et de contrôle des maladies) et du CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 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 cutimycine représente un espoir pour lutter contre cette calamité et sauver des vies humaines (**De kraker et al., 2016**).
- La cutimycine est considérée comme l'une des solutions pour lutter contre les effets d'antibiorésistance des germes pathogènes en particulier les bactéries de type SARM.
- La cutimycine a une plage d'activité étroite et pourraient être un agent intéressant pour la thérapie de précision et la prévention des infections (**Heilbronner et al., 2021**).
- La cutimycine n'a montré aucune activité contre les germes commensaux de la peau.
- 

**I. Résultat de la culture :**

Comme nous avons déjà indiqué précédemment, nous avons essayé de faire un côté pratique et nous avons donné tous nos efforts pour le réaliser, mais en raison du manque de laboratoires disposant des bons outils et instruments pour notre recherche (surtout celles qui travaillent sur l'anaérobiose), manque des patients volontaires atteints d'acné vulgaire, manque d'échantillonnage, l'absence de souche bactérienne originale pour la manipulation et la faible disponibilité aussi du gélose au sang pour cultiver notre bactérie, nous avons malheureusement pas obtenu le résultat souhaité.

Néanmoins, nous avons obtenu des staphylocoques (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. albus*) qui sont aussi des membres majeurs du microbiote cutané. Ceci revient au caractère anaérobie des bactéries qui rend notre expérimentation difficile à réaliser.

Les colonies étaient obtenues : rondes, lisses, blanches (*S. albus*) ou dorées (*S.aureus*), opaques, atteignant 2 à 3 mm.

Voici quelques photos après culture et repiquage, ainsi que les résultats de la coloration du Gram.



Figure 28, 29 et 30 : Photos des boîtes de Pétri après incubation.

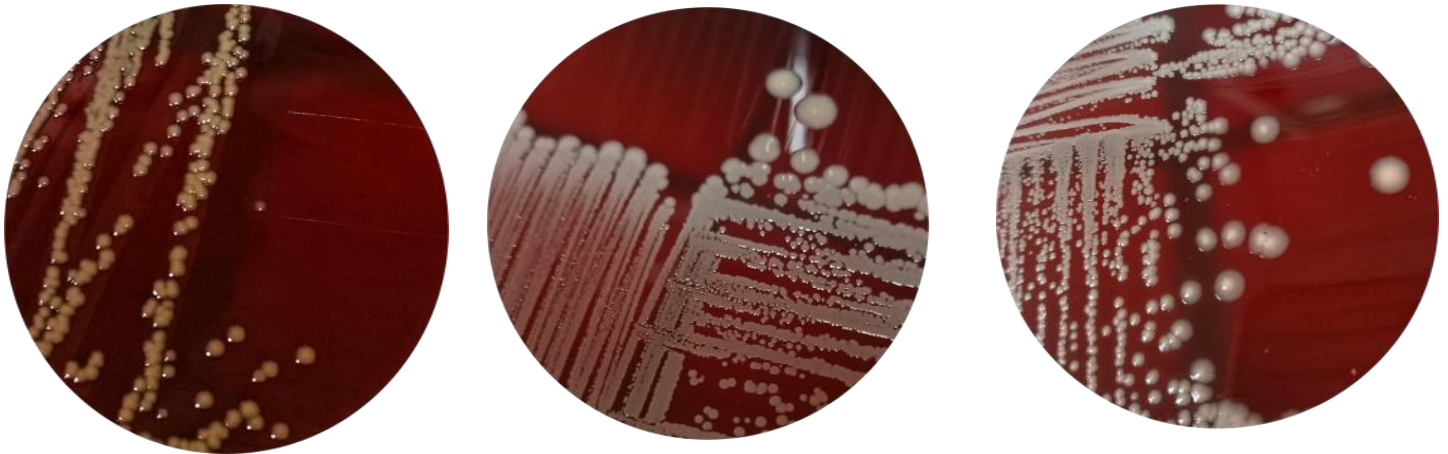


Figure 31, 32 et 33 : Aspects des colonies de *Staphylococcus Spp.* après repiquage.

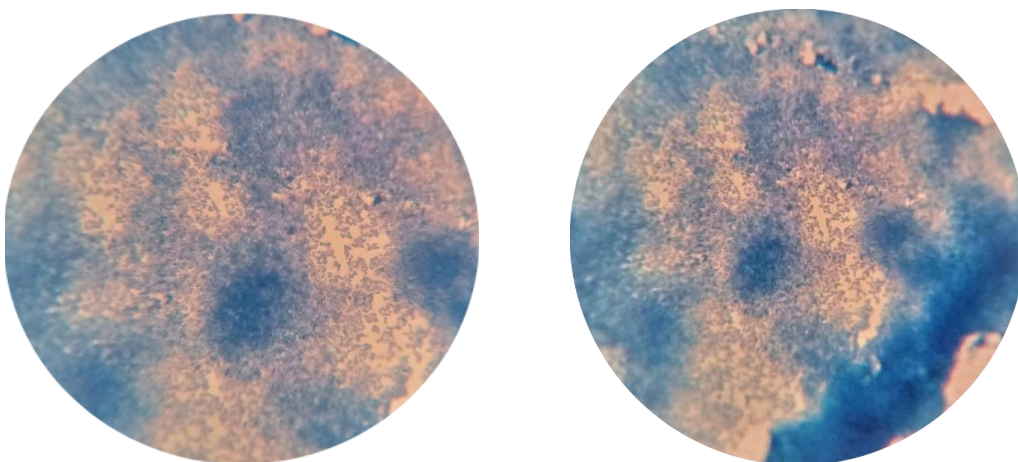


Figure 34 et 35 : Observation microscopique au bleu de méthylène à l'objectif x100.

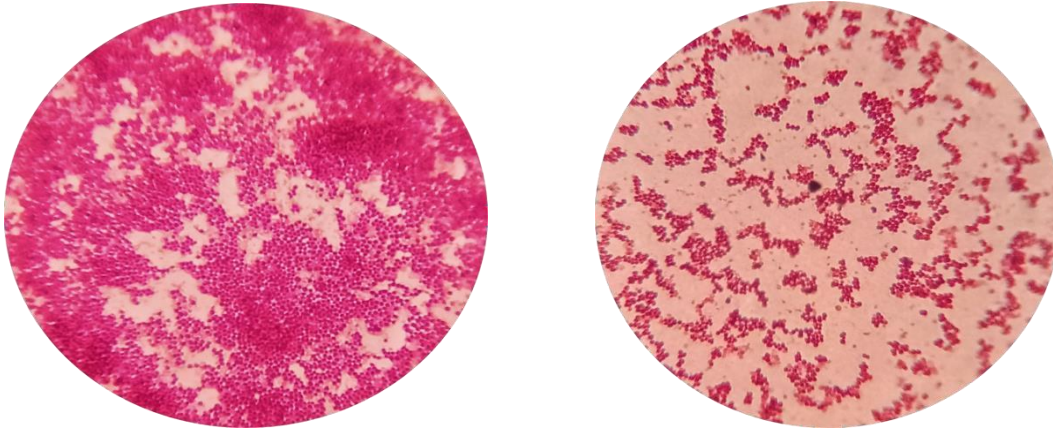


Figure 36 et 37 : Observation microscopique de la coloration de Gram à l'objectif x100.

## II. Résultat du GenBank :

### 1) Le choix de l'enzyme de restriction :

Après avoir fait de nombreuses recherches, nous avons trouvé qu'il existe 797 enzymes différentes permettant de couper la séquence d'ADN de *Cutibacterium acnes*.

La recherche manuelle de la bonne enzyme peut prendre beaucoup de temps, car de nombreuses enzymes que nous avons trouvées, y compris les plus courantes, coupent au milieu du gène d'intérêt, ce qui affectera sa fonction.

Le choix de l'enzyme de restriction appropriée était un peu difficile, mais fort heureusement ce problème a été résolu après avoir eu accès au un site Web de la biotechnologie (<https://www.genscript.com>) qui donne toutes les possibilités des enzymes de restriction qui existent et peuvent couper notre séquence d'ADN et qui peut donner la possibilité de filtrer les enzymes en fonction du nombre de sites de coupures au niveau de la séquence d'ADN.

Après de nombreuses heures de recherches, nous avons finalement trouvé l'enzyme de restriction parfaite, *Pfo* I issue de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* souche o ordre I.

C'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 7 nucléotides TCCNGGA et le site de clivage comme suit :

T<sup>^</sup>CCNGGA

AGGNCC<sup>^</sup>T

<sup>^</sup> : Site de coupure

La coupure sera effectuée après le premier nucléotide dans le brin sens 5'-3', tandis que l'autre brin 3'-5', la coupure est effectuée après le sixième nucléotide. Les extrémités résultantes seront cohésives.

Dans la séquence du GenBank, le gène d'intérêt commence à partir de la base n°938821 et se termine à la base n°939744. L'enzyme *Pfo* I coupe au niveau des trois sites : deux sites avant le gène d'intérêt entre les bases n°117/117 et 149/150 et un site après le gène d'intérêt entre les bases n°1934/1935. Donc notre gène est sauvé et il sera inclus parmi les fragments de restriction résultant après la digestion.

## 2) Le choix du vecteur :

A l'issue de multiples recherches dans l'interface GenBank, addgene et sur la base des paramètres déjà mentionnés, nous avons trouvé que le vecteur parfait sera le plasmide pLBU3 (à ne pas confondre avec le plbu3), c'est un vecteur largement utilisé dans les expériences génétiques pour le clonage des promoteurs forts (voir figure 38).

Il a montré une grande compatibilité avec notre étude pour ces raisons majeures :

- La taille de l'insert est compatible avec la taille de notre gène d'intérêt.
- Un gène de sélection *LacZ* qui code pour la  $\beta$ -galactosidase.
- Il contient un gène de résistance aux antibiotiques (ampicilline et tétracycline) permettent la sélection des cellules hôtes transformées ou non transformées.

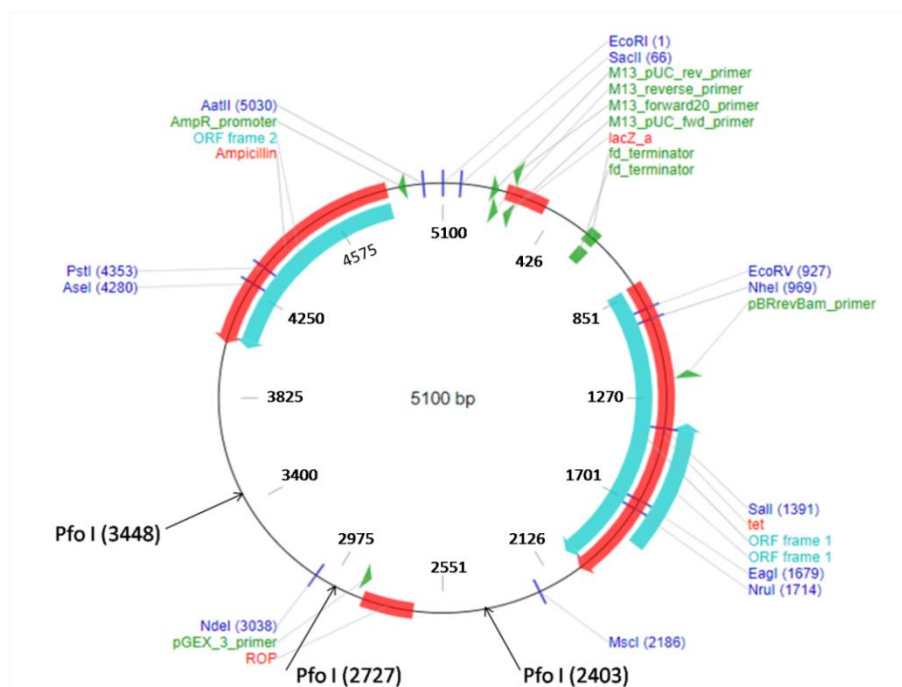


Figure 38 : Carte génétique du plasmide pLBU3 (Addgene, 2017).

### 3) 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.
- ✓ 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 efficace. En conséquence, la préparation des cellules compétentes n'est pas compliquée.
- ✓ Absence de pathogénicité (à l'exception de quelques souches), 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 et nous avons décidé de donner une référence à notre souche en tant que : *Escherichia coli* (*cut20*).



# **Conclusion**



## Conclusion :

Sur la base de toutes les études précédentes, nous pouvons certainement dire que la cutimycine montre un énorme potentiel pour inhiber sélectivement la colonisation par les staphylocoques multirésistants tout en laissant intactes les bactéries commensales. Cela suggère des applications éventuelles de la cutimycine notamment dans la thérapie de précision pour la prévention ou le traitement des maladies.

Cette découverte a révolutionné la médecine et la démographie mondiale, l'OMS estimant que l'accès aux antibiotiques permet d'augmenter l'espérance de vie de plus de dix ans.

Dans cette étude, nous avons procédé dans premier lieu à l'isolement et l'identification de la bactérie *Cutibacterium acnes* à partir de boutons acnéiques de certains collègues volontaires.

Malheureusement, on n'a pas pu avoir de résultats en raison des conditions difficiles exigées pour la culture de la bactérie à savoir l'anaérobiose stricte pour l'isolement.

C'est ainsi que nous avons orienté notre recherche vers le GenBank afin de trouver les éléments nécessaires pour la production de la cutimycine.

Les résultats de notre travail ont montré que l'enzyme de restriction c'est la *Pfo I*, le vecteur c'est pLBU3 et l'hôte le plus approprié c'est *E. coli*.

La méthode de clonage peut être une solution pour la production d'une telle molécule à l'échelle industrielle. C'est une voie prometteuse, rentable et précise contrairement aux procédés chimiques, complexes, coûteux et longs.



**Perspectives**

**Perspectives :**

Malgré que notre travail n'a pas aboutit à l'isolement de la bactérie *Cutibacterium acnes* pour les difficultés de l'anaérobiose. Néanmoins, ce travail ouvre la voie à d'autres applications et peut être complété et finalisé si les conditions de laboratoire sont réunies.

Les perspectives de notre travail sont :

- 1) Isolement et purification de la bactérie exigeante *Cutibacterium acnes*.
- 2) Etude des tests d'antagonismes entre le Staphylocoque et la bactérie *Cutibacterium acnes*.
- 3) Extraction et purification de la cutimycine à l'échelle du laboratoire et au niveau pilote et pourquoi pas à l'échelle industrielle.



# **Références bibliographiques**

## A

- **Addgene.** Plasmid : pLBU3 [en ligne] (page consultée le 17/06/2022).  
<https://www.addgene.org/vector-database/3401/>
- **Addgene.** Bacterial transformation [en ligne] (page consultée le 17/06/2022).  
<https://www.addgene.org/search/educational-resources/protocols/?q=AGA>
- **Alkhawaja, E. et al.** (2020). Antibiotic resistant *Cutibacterium acnes* among acne patients in Jordan: a cross sectional study. BMC Dermatology [en ligne], 20 (17) (page consultée le 26/05/2022).  
<https://bmcdematol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12895-020-00108-9>
- **Andrews, J.M.** (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of antimicrobial chemotherapy [en ligne], 48 (1) (page consultée le 01/06/2022).  
[http://academic.oup.com/jac/article/48/suppl\\_1/5/2473513?login=false](http://academic.oup.com/jac/article/48/suppl_1/5/2473513?login=false)
- **Aryal, S.** Gene Cloning- Requirements, Principle, Steps, Application [en ligne] (page consultée le 01/06/2022). <https://microbenotes.com/gene-cloning-requirements-principle-steps-applications/>
- **Aubin, G.G. et al.** (2017). Interaction of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* with bone cells: a step toward understanding bone and joint infection development. Scientific Reports [en ligne], 7 (page consultée le 26/05/2022).  
<https://www.nature.com/articles/srep42918>
- **Aubin, G.G. (2017).** Phylogénie et tropisme de *Cutibacterium acnes* : Impact sur la réaction inflammatoire et la réaction immunitaire lors des infections sur implant [en ligne]. Thèse de doctorat : Bactériologie. France : Université Bretagne Loire, 162 p. Disponible sur :  
[https://scholar.google.com/scholar?hl=fr&as\\_sdt=0%2C5&as\\_vis=1&q=Phylog%C3%A9nie+et+tropisme+de+Cutibacterium+acnes&btnG=#d=gs\\_qabs&t=1653772901550&u=%23p%3DP6ruVn4yTI4J](https://scholar.google.com/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&as_vis=1&q=Phylog%C3%A9nie+et+tropisme+de+Cutibacterium+acnes&btnG=#d=gs_qabs&t=1653772901550&u=%23p%3DP6ruVn4yTI4J) (Page consultée le 29/05/2022).

## B

- **Barbeyrac, P.** (2014). *propoinibacteruim acnes* Aspect microbiologique. 15es Journées Nationales d'Infectiologie, 11-13/06/2014, Palais des congrés de Bordeaux, 22 p. <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI14/2014-JNI-pacnes-barbeyrac.pdf>

- **Boisrenoult, P.** (2017). Infections de prothèses articulaires à *Propionibacterium acne* : diagnostic et traitement. Conférence d'enseignement 2017, Centre hospitalier de Versailles, (11/2017), Versailles, 256 p. <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/chirurgie/infections-de-protheses-articulaires-a-propionibacterium-acnes-diagnostic-et-traitement>
- **Biolabs.** Genomic DNA purification from Gram- positive Bacteria and Archaea (NEB T3010) [en ligne] (page consultée le 10/06/2022). <http://international.neb.com/protocols/2018/10/25/genomic-dna-purification-from-gram-positive-bacteria-t3010>
- **Byrd, A.L. et al.** (2018). The human skin microbiome. Microbiome [en ligne], 16 (page consultée le 29/05/2022). <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.157#citeas>

## C

- **Chan, D.C.k. Burrows, L.L.** (2020). Thiopeptides : antibiotics with unique chemical structures and diverse biological activities [en ligne], 10 (1). (page consultée le 01/06/2022). <10.1038@s41429-020-00387-x.pdf>
- **Cazivassilio, D.** Liste des infections de la peau [en ligne] (page consultée le 29/05/2022). <https://www.docteurcliv.com/maladie/liste-des-infections-de-la-peau.aspx#>
- **Christensen, G.J.M. et al.** (2016). Antagonism between *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and its genomic basis. BMC Genomics [en ligne], 17 (152) (page consultée le 29/05/2022). <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2489-5>
- **Claesen, J et al.** (2020). A *Cutibacterium acnes* antibiotic modulates human skin microbiota composition in hair follicles. Sciences translational medicine [en ligne], 12 (570) (page consultée le 25/05/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8478231/>
- **Coenye, T. et al.** (2022). The role of biofilm formation in the pathogenesis and antimicrobial susceptibility of *Cutibacterium acnes*. Biofilm [en ligne], 4 (page consultée le 29/05/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8671523/>
- **Corvec, S.** (2018). Clinical and biological features of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *avidum*, an underrecognized microorganism . ASM Journals[en

ligne], 31 (3) (page consultée le 29/05/2022).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6056840/>

- **Cronan, J.E.** Escherichia coli as an Experimental Organism [en ligne] (page consultée le 01/06/2022).  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0002026.pub2#:~:text=Escherichia%20coli%2C%20a%20gram%2Dnegative,coli>

## D

- **De Kraker, M et al.** (2016). Will 10 Million People Die a Year due to *Antimicrobial Resistance by 2050*. PLoS Medicine [en ligne], 13 (11) (page consultée le 1/06/2022).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/P+MC5127510/>
- **Di Domizio, D.J. et al.** (2016). Le microbiote cutané : le poids lourd sort de l'ombre. Dermatologie [en ligne], 2016 (12) (page consultée le 30/05/2022).  
[https://www.researchgate.net/profile/Jeremy-Di-Domizio/publication/301657909\\_The\\_skin\\_microbiota\\_A\\_colossus\\_steps\\_into\\_the\\_spotlight/links/57e5149208aed68d52f2ab55/The-skin-microbiota-A-colossus-steps-into-the-spotlight.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jeremy-Di-Domizio/publication/301657909_The_skin_microbiota_A_colossus_steps_into_the_spotlight/links/57e5149208aed68d52f2ab55/The-skin-microbiota-A-colossus-steps-into-the-spotlight.pdf)
- **Du, D. et al.** (2015). Genome engineering and direct cloning of antibiotic gene clusters via phage oBT<sub>1</sub> integrase-mediated site-specific recombination in *Streptomyces*. Scientific reports [en ligne]. 5 (8740) (page consultée le 17/06/ 2022).  
<https://www.nature.com/articles/srep08740>
- **Duda-Ferrand, J.** (2021). Rôle de l'activité inhibitrice des propionibactéries dans la structure de la population microbienne [en ligne]. Thèse de doctorat : Génie biotechnologique et alimentaire. Nancy : Université de Lorraine, 214 p. Disponible sur : <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02556063/document> (page consultée le 30/05/2022).

## E

- **Ecale, F.** (2021). Mise en place de modèle de microbiotes intestinal et cutané *in vitro* pour l'étude de leur interaction avec les xénobiotiques [en ligne]. Thèse de doctorat : biochimie, biologie moléculaire. France : Université de Poitiers, 235 p.  
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03261834>
- **El Sayed, F.** (2019). Bases de pathogénicité de *Cutibacterium acens* dans les infections sur matériel ostéo-articulaire : Corrélation entre le génotype et la réponse

immune [en ligne]. Thèse de doctorat : Sciences de la vie et de la santé. Boulogne-Billancourt : Université Paris-Saclay, 220 p. Disponible sur : [https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02121360/file/77119\\_EL\\_SAYED\\_2019\\_archivage.pdf](https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02121360/file/77119_EL_SAYED_2019_archivage.pdf) (page consultée le 23/05/2022).

- **El-Tonsy, T.M. et al.** (2018). Bacteriological study of Acne Vulgaris in Cairo Egypt. The Egyptian Journal of Hospital Medicine [en ligne], 72 (9) (page consultée le 26/05/2022). [https://ejhm.journals.ekb.eg/article\\_10742.html](https://ejhm.journals.ekb.eg/article_10742.html)

## F

- **Fitz-Gibbon, S. et al.** (2013). *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne. The Journal of investigative dermatology [en ligne], 133 (9) (page consultée le 26/05/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745799/>
- **Flowers, L., Grice, E.A.** (2020). The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward. Cell Host and Microbe [en ligne], 28 (2) (page consultée le 29/05/2022). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312820303589>
- **Foti, C. et al.** (2021). Oxazolidinone antibiotics : Chemical, biological and analytical aspects. multidisciplinary digital publishing institute (MDPI) [en ligne], 26 (14) (page consultée le 17/06/2022). <https://www.cell.com/cell-chemical-biology/fulltext>
- **Fournière, M. et al.** (2020). *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. multidisciplinary digital publishing institute (MDPI) [en ligne], 8 (11) (page consultée le 29/05/2022). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33171837/>
- **Fougnot, S.** (2003). Etude de l'activité des antibiotiques sur *propionibacterium acnes* implique dans les infections neuro-méningées. Mémoire du diplôme d'études : Biologie médicale : Nancy : université Henri Poincaré, 113 p. Disponible sur : [http://docnum.univorraine.fr/public/SCDMED\\_T\\_2003\\_FOUGNOT\\_SEBASTIEN.pdf](http://docnum.univorraine.fr/public/SCDMED_T_2003_FOUGNOT_SEBASTIEN.pdf) (page consultée le 26/05/2022).
- **Francuzik, W. et al.** (2018). *Propionibacterium acnes* Abundance Correlates Inversely With *Staphylococcus aureus* : Data from Atopic Dermatitis Skin Microbiome. Acta Dermato Venereologica [en ligne], 98 (page consultée le 26/05/2022). <https://www.medicaljournals.se/acta/content/html/10.2340/00015555-2896>



- **GenBank**, PPA\_RS04370 protéine de biosynthèse de la bactériocine de type thiopptide [*Cutibacterium acnes* KPA171202] [en ligne] (page consultée le 10/06/2022).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Cutibacterium+acnes+strain+KPA171202+bacteriocin+PPA-RS04370#reference-sequences>

## G

- **GenBank**. Vecteur de clonage pLBU3 pour le clonage de promoteurs forts [en ligne] (page consultée le 17/06/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L08929.1>
- **Goetz, A.** (2016). Le microbiote cutané [en ligne]. Monographie : cosmétologie. Chicoutimi : Université de Québec, 34 p. Disponible sur : <https://www.scc-quebec.org/wp-content/uploads/2017/08/Microbiote-cutane%CC%81-Anne-Goetz-2016.pdf> (page consultée le 29/05/2022).
- **Grange, P.** *Cutibacterium acnes* [en ligne]. (page consultée le 19/05/2022). <https://encyclopedia.pub/12329>
- **Grice, E.A., Segre, J.A.** (2011). Le microbiote cutané. Technology Networks [en ligne], 9 (8) (page consultée le 17 /06/2022). <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/the-skin-microbiome-356627>

## H

- **Heilbronner, S. et al.** (2021). The microbiome-shaping roles of bacteriocins. [en ligne]. 19 (page consultée le 5/06/2022). <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00569-w>
- **Heslan, CH., Mamou, Z.** (2019). Microbiologie du *Cutibacterium acnes*. Réunion bibliographique Criogo, Mamou Zahida, 20/03/2019, Rennes, 31 p. [http://www.criogo.fr/ckfinder/userfiles/files/recherche/diaporamas/2019/Bibliographie%20Rennes%2020%20mars%202019/C\\_acnes\\_Criogo\\_CHeslan\\_200319.pdf](http://www.criogo.fr/ckfinder/userfiles/files/recherche/diaporamas/2019/Bibliographie%20Rennes%2020%20mars%202019/C_acnes_Criogo_CHeslan_200319.pdf)
- **Hui-Jing, T. et al.** (2020). Complet Draft Genome Sequence of *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* Type Strain ATCC6919. International Journal of Dermatology and Venereology [en ligne], 3 (4) (page consultée le 26/05/2022). [https://journals.lww.com/ijdv/fulltext/2020/12000/complete\\_draft\\_genome\\_sequence\\_of\\_cutibacterium.6.aspx#:~:text=The%20total%20genome%20length%20of,9%20rRNA%20and%201%20sRNA](https://journals.lww.com/ijdv/fulltext/2020/12000/complete_draft_genome_sequence_of_cutibacterium.6.aspx#:~:text=The%20total%20genome%20length%20of,9%20rRNA%20and%201%20sRNA)

## I

## J

- **Just-Baringo, X., Albericio, F., Alvarez, M.** (2014). Thiopiptide Antibiotic: Retrospective and Recent Advances. Multidisciplinary digital publishing institute (MDPI) [en ligne], 12 (1) (page consultée le 25/05/2022).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917276/>

## K

- **Kroschwitz.** (1992). L'industrie pharmaceutique [en ligne] (page consultée le 25/05/2022). <https://www.ilocis.org/fr/documents/ilo079.htm>

## L

- **Laboratoires dermatologique Ducray.** Bactérie : *Cutibacterium acnes* [en ligne] (page consultée le 23/05/2022). <http://www.ducray.com/fr-fr/acne/cutibacterium-acnes>
- **Laboratoire Pileje.** Le microbiote cutané [en ligne] (page consultée le 29/05/2022). <https://www.pileje.fr/revue-sante/le-microbiote-cutane>
- **Lorier-Roy, E.** Les mycoses cutanée [en ligne] (page consultée le 12/06/2022). <https://dermato-info.fr/fr/les-maladies-de-la-peau/les-mycoses-cutan%C3%A9es#:~:text=les%20mycoses%20superficielles%20sont%20des%20infections%20de%20la%20peau%20tr%C3%A8s,%3A%20Candida%2C%20Dermatophytes%2C%20Malassezia>
- **Lozano, C. et al.** (2017). Actualizacion en la resistencia antibiotica en Gram-positivos Update on antibiotic resistance in Gram-positive bacteria. Enfermedades infecciosas y Microbiologia clinica [en ligne], 35 (1) (page consultée le 21/06/2022).  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28129816>

## M

- **Mangin, L.** Un nouvel antibiotique découvert dans le microbiote de la peau [en ligne]. (Page consultée le 22/05/2022). <https://www.pourlascience.fr/sd/microbiologie/un-nouvel-antibiotique-decouvert-dans-le-microbiote-de-la-peau-20645.php>
- **Mayslich, C. et al.** (2021). *Cutibacterium acnes* as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factor. Multidisciplinary digital publishing institute (MDPI) [en ligne], 9 (2) (page consultée le 19/05/2022).  
<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/303/htm>
- **McLaughlin, J et al.** (2019). *Propionibacterium acnes* and acne vulgaris : new insights from the integration of population genetic, multi\_omic, biochemical and host-

- microbe studies. Multidisciplinary digital publishing institute (MDPI), 7 (5) (page consultée le 19/05/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6560440/>
- **Meade, E. et al.** (2020). Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance is Futile. Multidisciplinary digital publishing institute (MDPI) [en ligne]. 9 (1) (page consultée le 5/06/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7168330/>
  - **Miller, S.A. et al.** (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research [en ligne], 16 (3) (page consultée le 10/06/2022). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC334765/>
  - **Mignolet, J.** Bacteriocins. An alternative to antibiotics? [en ligne] (page consultée le 5/06/2022). <https://uclouvain.be/en/sciencetoday/news/bacteriocins-an-alternative-to-antibiotics.html>
  - **Modiri, S. et al.** (2021). Growth Optimization of *Lactobacillus acidophilus* for Production of Antimicrobial Peptide Acidocin 4356: Scale up from Flask to Lab-Scale Fermenter. Iranian Journal of biotechnology [en ligne]. 19 (3) (page consultée le 5/06/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8590721/>
  - **Mokni, M., Abdelhak, S.** (2014). Flore cutanée, microbiote et microbiome. Dermatologie infectieuse [en ligne], 1 (page consultée le 29/05/2022). [https://elearning.univbejaia.dz/pluginfile.php/643867/mod\\_resource/content/1/F%20cutan%C3%A9e.pdf](https://elearning.univbejaia.dz/pluginfile.php/643867/mod_resource/content/1/F%20cutan%C3%A9e.pdf)

## N

- **Naghdi, N., Ghane, N.** (2017). A Comparison of culture and PCR methods for identifying *Propionibacterium acnes* in lesions isolated patients with acne. Turkish Journal of Medical Sciences [en ligne], 47 (page consultée le 26/05/2022). <https://aj.tubitak.gov.tr/medical/issues/sag-17-47-3/sag-47-3-38-1602-51.pdf>
- **Nagwa.** Fiche explicative de la leçon : Utilisation des enzymes de restriction [en ligne] (page consultée le 01/06/2022). <https://ww.nagwa.com/fr/explainers/947179145028>

## O

- **O'Neill, A.M. et al.** (2020). Identification of a human skin commensal bacterium that selectively kills *Cutibacterium acnes*. The Journal of investigative dermatology [en ligne], 140 (8) (page consultée le 26/05/2022).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375939/>
- **Ozel Kaya, N. et al.** (2021). Akne Vulgarisli Hastalardan Uretilen *Cutibacterium acnes* İzolatlarının Filotiplendirilmesi ve Antimikrobilyallere Duyarlılık Durumlarının Belirlenmesi. RDIZIN [en ligne], 55 (4) (page consultée le 26/05/2022).  
<https://app.trdizin.gov.tr/makale/TkRjMk9USTNOdz09/akne-vulgarisli-hastalardan-uretilen-cutibacterium-acnes-izolatlarinin-filotiplendirilmesi-ve-antimikrobilyallere-duyarlilik-durumlarinin-belirlenmesi>

## P

- **Pasamon, M.** (2021). Microbiote cutané et cicatrisation [en ligne]. Thèse de doctorat : pharmacie. France : Université de Limoges, 122 p. Disponible sur : <https://dune.univ-angers.fr/fichiers/20052339/2011PPHA464/fichier/464F.pdf> (page consultée le 30/05/2022).
- **Perry, A., Lambert, P.** (2011). *Propionibacterium acnes* : infection beyond the skin. Taylor and Francis [en ligne], 9 (12), (Page consultée le 29/05/2022).  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22114965/>
- **Pierce, E.C., Dutton, R.J.** (2022). Putting microbial interactions back into community contexts. Current opinion in microbiology [en ligne], 56 (page consultée le 29/05/2022).  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527421001442>
- **Proutière, A.** (2021). Biosynthèse, mécanisme d'action et régulation d'une bactériocine sécrétée par *Streptococcus gallolyticus* [En ligne]. Thèse de doctorat : microbiologie. Paris : Université de Paris, 144 p. Disponible sur : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03279086/document> (consultée le 26/05/2022).

## Q

## R

- **Radan, C.** (2017). Viral skin infections. Actualités Pharmaceutiques [en ligne], 56 (565) (page consultée le 5/06/2022).  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0515370017300721>

- **Rasigade, J.P., Tristan, A.** Diagnostic bactériologique des infections cutanées [en ligne] (page consultée le 12/06/2022). [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE\\_InfectionsCutanees.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE_InfectionsCutanees.pdf)
- **Rehmus, W.E.** Présentation des infections bactériennes de la peau [en ligne] (page consultée le 30/05/2022). <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/troubles-cutan%C3%A9s/infections-bact%C3%A9riennes-de-la-peau/pr%C3%A9sentation-des-infections-bact%C3%A9riennes-de-la-peau#:~:text=Des%20infections%20bact%C3%A9riennes%20de%20la%20peau%20s%20d%C3%A9veloppent%20lorsque%20des,insecte%2C%20des%20%C3%A9sions%20ou%20des>
- **Rozas, M. et al.** (2021). From dysbiosis to healthy skin : major contributions of *Cutibacterium acnes* to skin homeostasis. Multidisciplinary digital publishing institute (MDPI), 9(3) (page consultée le 29/05/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8003110/>

## S

- **Scholz, Ch. F.P. et al.** (2016). Genome stability of *Propionibacterium acnes*: a comprehensive study of indels and homopolymeric tracts. Scientific reports [en ligne], 6 (page consultée le 26/05/2022). <https://www.nature.com/articles/srep20662>
- **Scholz, Ch.F.P., Kilian, M.** (2016). The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. Nov. And *Pseudopropionibacterium* gen.nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology [en ligne], 66 (11) (page consultée le 26/05/2022). [https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/66/11/4422\\_ijsem001367.pdf?expires=1654004400&id=id&accname=guest&checksum=38296023CB21AE0151600C70D73FE00C](https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/66/11/4422_ijsem001367.pdf?expires=1654004400&id=id&accname=guest&checksum=38296023CB21AE0151600C70D73FE00C)
- **Société française de dermatologie et de pathologie sexuellement transmissible.** Les mycoses cutanées [en ligne] (date de consultation 5/06/2022). <https://dermato-info.fr/fr/les-maladies-de-la-peau/les-mycoses-cutan%C3%A9es>
- **Shields BS, M.G. et al.** (2016). The challenge of *Propionibacterium acnes* and revision shoulder arthroplasty: a review of current diagnostic options. Journal of shoulder and elbow surgery [en ligne], 25 (6) (page consultée le 10/06/2022). <http://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S105827461600032X>

- **Skowron, K. et al.** (2021). Human Skin Microbiome: Impact of Intrinsic and Extrinsic Factors on Skin Microbiota. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) [en ligne], 9 (3) (page consultée le 29/05/2022).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7998121/>
- **Suzuki, k. et al.** (2021). Scalp Microbiome and Sebum Composition in Japanese Male Individuals with and without Androgenetic Alopecia. Multidisciplinary digital publishing institute (MDPI) [en ligne], 9 (10) (Page consultée le 22/5/2022).  
[https://www.google.com/url?esrc=s&q=&rct=j&sa=U&url=https://www.mdpi.com/2076-2607/9/10/2132/pdf%3Fversion%3D1634199848&ved=2ahUKEwi44eno-fL3AhXB04UKHTueCEwQFnoECAEQAg&usg=AOvVaw07j\\_DneXaTs1iFN3Yh1DDt](https://www.google.com/url?esrc=s&q=&rct=j&sa=U&url=https://www.mdpi.com/2076-2607/9/10/2132/pdf%3Fversion%3D1634199848&ved=2ahUKEwi44eno-fL3AhXB04UKHTueCEwQFnoECAEQAg&usg=AOvVaw07j_DneXaTs1iFN3Yh1DDt)

### T

- **Taale, E. et al.** (2016). Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : cas des bactériocines. International Journal of Biological and Chemical Sciences [en ligne], 10 (1) (page consultée le 25/05/2022).  
<https://www.ajol.info/index.php/ijbcs/article/download/141617/131357>
- **Taale, E. (2016).** Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : Caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du *Soumbala*, du *Bikalga* et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrice de bactériocines [en ligne]. Thèse de doctorat : Microbiologie-Biologie Moléculaire. Burkina Faso : Université de Ouaga I Pr Joseph Ki-Zerbo, 199 p. Disponible sur :  
[https://www.researchgate.net/profile/EssodolomTaale/publication/299338438\\_Bioactive\\_molecules\\_from\\_bacteria\\_strains\\_biochemical\\_and\\_molecular\\_characterization\\_of\\_bacteriocins\\_producing\\_strains\\_isolated\\_from\\_Soumbala\\_Bikalga\\_and\\_some\\_yoghurt\\_consumed\\_in\\_Burkina\\_Faso/links/5712843608aeebe07c03a33f/Bioactive-molecules-from-bacteria-strains-biochemical-and-molecular-characterization-of-bacteriocins-producing-strains-isolated-from-Soumbala-Bikalga-and-some-yoghurt-consumed-in-Burkina-Faso.pdf?origin=publication\\_detail](https://www.researchgate.net/profile/EssodolomTaale/publication/299338438_Bioactive_molecules_from_bacteria_strains_biochemical_and_molecular_characterization_of_bacteriocins_producing_strains_isolated_from_Soumbala_Bikalga_and_some_yoghurt_consumed_in_Burkina_Faso/links/5712843608aeebe07c03a33f/Bioactive-molecules-from-bacteria-strains-biochemical-and-molecular-characterization-of-bacteriocins-producing-strains-isolated-from-Soumbala-Bikalga-and-some-yoghurt-consumed-in-Burkina-Faso.pdf?origin=publication_detail) (page consultée le 25/05/2022 ).
- **Taoufik.** Infections bactériennes cutanées superficielles folliculaires et non folliculaires [en ligne]. (Page consultée le 30/05/2022).  
<https://www.medixdz.com/cours/infection-bacterienne-cutanee.php>

- **Teyssou, R., Buisson, Y.** (1997). La Flore cutanée. Revue Française des Laboratoires [en ligne], 1997 (291) (page consultée le 30/05/2022).  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S033898989780114X#:~:text=L a%20flore%20cutan%C3%A9e%20joue%20en,d'infections%20locales%20ou%20syst%C3%A9miques>
- **Thibaut, M.** (2011). Etude de nouvelles méthodologies d'hétéroarylation directe de liaison C-H et C-Br en série thiazolique : application à la synthèse de cœurs thiazolypyridiniques des thiopeptides de la série d [en ligne]. Thèse de doctorat : Chimie organique. France : Institut National des Sciences Appliquées de Rouen, 163 p. Disponible sur :  
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00577166> (page consultée le 25/05/2022)

## U

## V

- **Vandenbroucke-Grauls, C.M.** (1993). The threat of multiresistant microorganisms. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases [en ligne], 12 (1) (page consultée le 21/06/2022). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8386639/>
- **Vinogradov, A.A. et al.** (2020). Introduction to thiopptides : Biological activity, biosynthesis, and strategies for functional reprogramming. Cell press [en ligne], 27 (8) (page le 17/06/2022). [https://www.cell.com/cell-chemical-biology/fulltext/S2451-9456\(20\)30245-2?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2451945620302452%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-chemical-biology/fulltext/S2451-9456(20)30245-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2451945620302452%3Fshowall%3Dtrue)

## W

- **Wang, J. et al.** (2010). Identification and analysis of the biosynthetic Gene Cluster Encoding the Thiopptide Antibiotic Cyclothiazomycin in *Stereptomyces hygroscopicus*. Applied and Environmental Microbiology [en ligne], 76 (7) (page consultée le 25/05/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849233/>
- **Wiktionary.** *Cutibacterium* [en ligne]. (page consultée le 22/05/2022).  
<https://en.wiktionary.org/wiki/Cutibacterium>
- **Wilson, M., Wilson, P.J.K.** (2021). Close Encounters of the Microbial Kind: Everything You Need to Know About Common Infections. Swaziland : Springer Nature. 526 p.  
<https://books.google.it/books?id=Zh8SEAAAQBAJ&pg=PA57&lpg=PA57&dq=que+signifie+cutibacterium++acnes+en+latin&source=bl&ots=PlCydk7siD&sig=ACfU3U>

[37fKILV\\_EFN2DyPSQzGaJhLX9PyQ&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwjQr\\_3o1bj2AhWwSvEDHXekAZkQ6AF6BAghEAM#v=onepage&q=que%20signifie%20cutibacterium%20%20acnes%20en%20latin&f=false](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37fKILV_EFN2DyPSQzGaJhLX9PyQ&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwjQr_3o1bj2AhWwSvEDHXekAZkQ6AF6BAghEAM#v=onepage&q=que%20signifie%20cutibacterium%20%20acnes%20en%20latin&f=false)

X

Y

- **Yang, J. et al.** (2019). *Cutibacterium acnes* ( *Propionibacterium acnes*) 16S rRNA Genotyping of Microbial Samples from Possessions Contributes to Owner Identification. *mSystems* [en ligne], 4 (6) (page consultée le 26/05/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6880042/>

Z

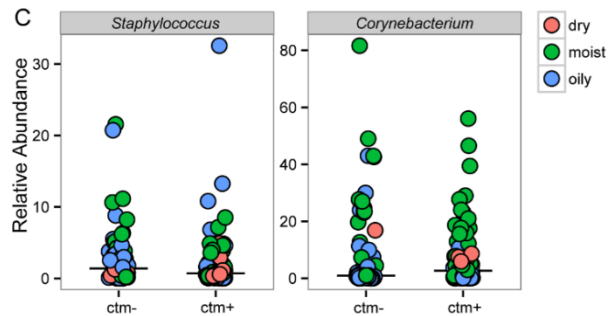
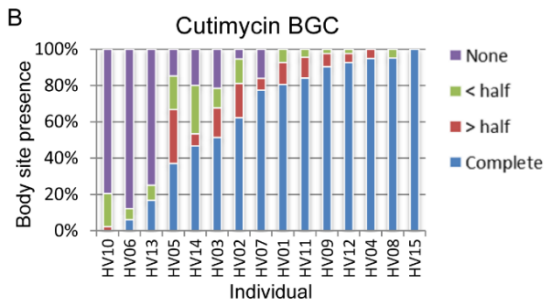
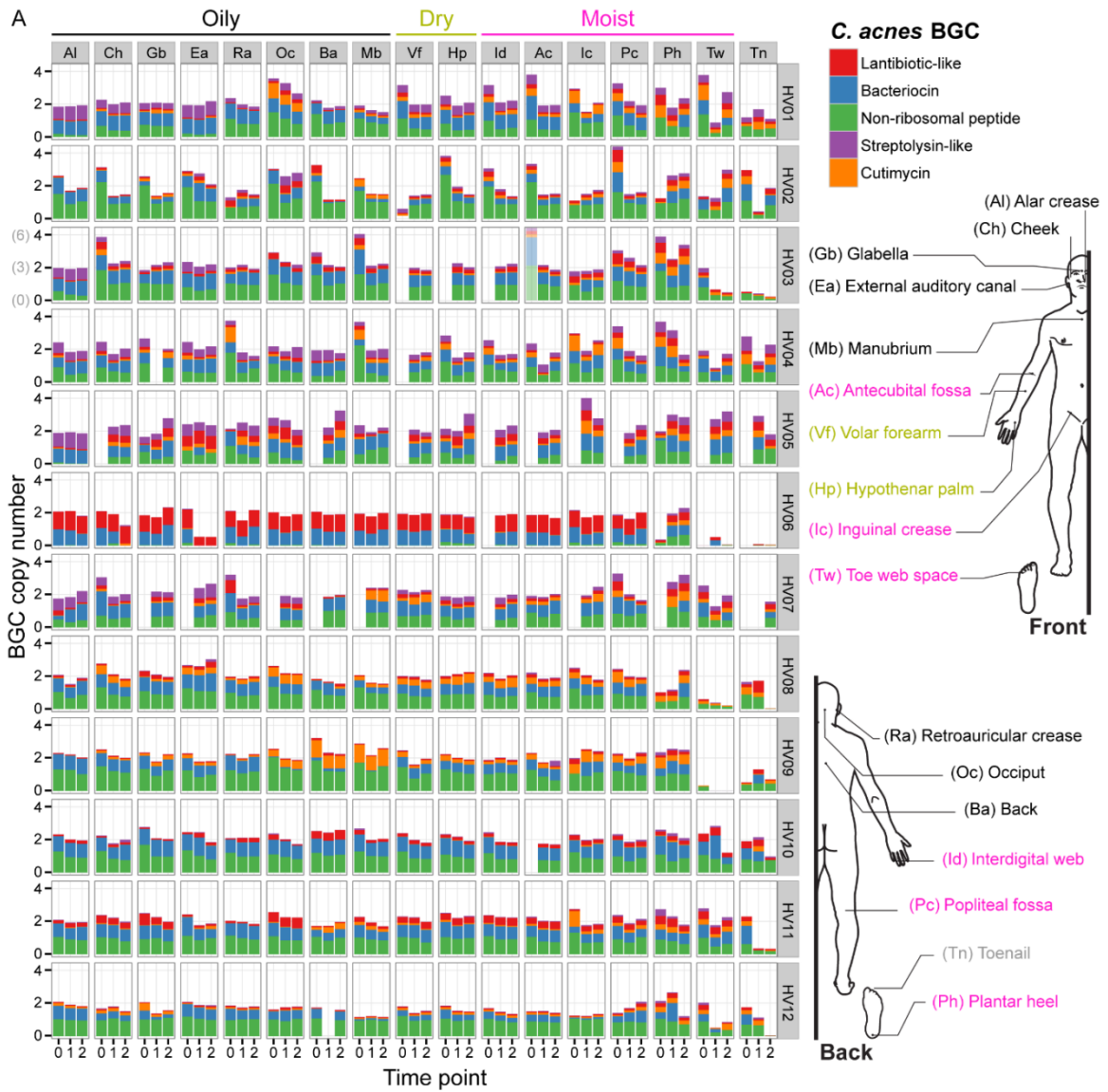
- **Zhang, J. et al.** (2018). Purification and Partial Characterization of Bacteriocin Lac-B23, a Novel Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* J23, Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk. *Frotiers in Microbiology* [en ligne]. 9 (page consultée le 5/06/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC174205/>
- **Zhang, N. et al.** (2019). Antimicrobial Susceptibility Biotypes and Pylotypes of clinical *Cutibacterium* (Formerly *Propionibacterium*) *acnes* Strains Isolated from Acne Patients : An Observational Study. *Dermatology and Therapy* [en ligne], 9 (4) (page consultée le 26/05/2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6828986/>





# **Annexes**

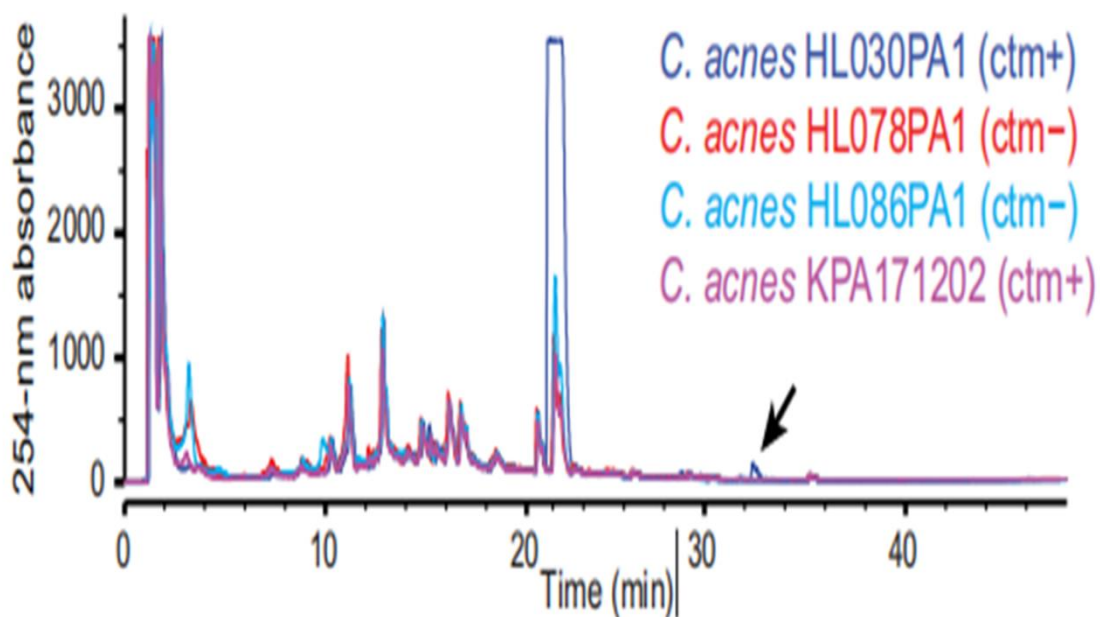
Annexe 01



Analyse métagénomique des BGC de *C. acnes* sur 17 sites cutanés à partir de sites de 12 participants en bonne santé (Claeasen et al., 2020).

A) Présence de *C. acnes* BGC dans les métagénomomes cutanés de 12 individus en bonne santé sur trois points dans le temps. Les BGC sont codés par couleur selon la légende (le BGC de cutimycine est en orange) et les numéros de copie relatifs sont empilés pour chaque site corporel et point de temps. Une hauteur de barre BGC de 1 indique que BGC particulier est présent dans ~ 100 % de *C. acnes* sur le site d'échantillonnage particulier. Les sites corporels sont regroupés en fonction de leurs caractéristiques prédominantes huileuses, sèches ou humides, et les abréviations sont expliquées dans l'encart. Notez que pour HV03 individuel, la moyenne par rapport à l'échelle d'abondance de BGC est représentée en gris, uniquement pour Ac au point temporel 0. B) Pourcentage d'échantillons sur les sites corporels et les points temporels de chaque participant pour lesquels la cutimycine BGC a été détectée dans la métagénomique donnée. Des gènes séparés sont comptés comme présents si plus de 40 % de leur longueur est couverte par les lectures de séquence et le degré de gènes détectés pour la cutimycine BGC est classé comme suit : « aucun » (violet), « moins de la moitié » (vert), « supérieur à la moitié » (rouge) et « complet » (bleu). C) L'analyse métagénomique n'a révélé aucune corrélation entre la présence (ctm+) ou l'absence (ctm-) de la cutimycine BGC avec le genre *Corynebacterium* ou le genre *Staphylococcus*. Les échantillons Ctm+ étaient ceux où les 9 gènes de la cutimycine BGC ont été identifiés comme présents.

## Annexe 02



**Profils HPLC pour des extraits bruts d'acétate d'éthyle de souches sélectionnées de *C. acnes* ppa0859-0866 BGC-positives et BGC-négatives.**

Le produit thiopeptidique de ppa0859-0866, appelé cutimycine (ctm), est élué à 73,5 % d'acétonitrile (MeCN), comme l'indique le tracé bleu pour *C. acnes* HL030PA1. La flèche noire indique le pic de cutimycine.

### Annexe 03

#### Protocole proposé pour la méthode du clonage:

Cette partie se concentre sur la méthode de clonage que nous avons proposé dans le chapitre 5 pour pouvoir produire la cutimycine à l'échelle industrielle. C'est le fruit de longues recherches et d'un travail bien organisé afin de créer un protocole qui permet la création d'un nouvel organisme génétiquement modifié capable de produire la cutimycine. Nous avons utilisé des ressources fiables pour ces procédures qui ont été utilisées dans un but similaire. Le procédé passera par 8 étapes principales afin de créer notre nouvel OGM et de l'utiliser pour la production industrielle :

1. Isolement et purification de l'ADN de *C. acnes*
2. Digestion par l'enzyme de restriction
3. Électrophorèse sur gel d'agarose
4. Ligature insert-vecteur
5. La transformation génétique
6. Sélection des cellules recombinantes
7. Conservation de la souche bactérienne productrice
8. Production à l'échelle industrielle

#### 1. Isolement et purification de l'ADN de *C. acnes* :

Les *Cutibacterium* sont des bactéries à Gram-positif, ce qui rend l'isolement d'ADN difficile en raison de leur résistance à la lyse cellulaire. Cette difficulté est attribuée à la couche plus épaisse de peptidoglycane dans leurs parois cellulaires qui les rendent plus difficiles à casser que les bactéries à Gram-négatif (**Shields BS et al., 2011**).

La plupart des méthodes utilisent le lysozyme et le dodécylsulfate de sodium (SDS) pour la rupture cellulaire. Pour augmenter encore la lyse, la glycine est souvent incorporée dans les milieux pour minimiser la réticulation du peptidoglycane.

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
- Solution de lysozyme
- Microtubes à centrifuger de 1,5 ml
- Protéinase K
- Bain-marie, 60°C
- RNase

- bain-marie, 37°C
- Tampon phosphate saline froid
- Tampon de lyse tissulaire
- Centrifugeuse
- Vortex
- Tampon de liaison A

### Procédure :

1. On ajoute 1 ml d'une culture d'*C. acnes* dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml.
2. On centrifuge à 13000 – 16000 g pendant 2 minutes pour sédimenter les cellules. Retirez le surnageant.
3. Ajouter 80 µl du tampon phosphate saline froid ou 10 Mm de tris-Cl (pH = 8) et remettre en suspension le culot bactérien au vortex.
4. Ajouter 200 µl de solution de lysozyme (25mg/ml) et vortexer brièvement.
5. Puis ajouter 100 µl de tampon de lyse tissulaire et vortexer soigneusement.
6. Incuber à 37°C pendant 5 à 10 minutes ou jusqu'à ce qu'ils soient clairs. D'autres enzymes comme la lysostaphine peuvent également être testées si les bactéries semblent difficiles à lyser.
7. Ajouter 10 µl de protéinase K, vortexer brièvement en incubant à 56°C pendant au moins 30 minutes dans un dégagement thermique sous agitation à pleine vitesse (environ 4000 tr/min).
8. Ajouter 3 µl de RNase au lysat et incubant pendant au moins 5 minutes à 56°C sous agitation à pleine vitesse.
9. Ajouter 400 µl de tampon de liaison ADNg à l'échantillon et bien mélanger en pulsant au vortex pendant 5 à 10 secondes. Un mélange minutieux est essentiel pour des résultats optimaux.
10. Transférer le mélange lysat/tampon de liaison dans une colonne (600 µl) de purification d'ADNg prés-insérée dans un tube de collecte, sans toucher la zone supérieure de la colonne.
11. Fermer le bouchon et centrifuger : d'abord pendant 3 minutes à 1000 g pour lier l'ADNg, puis pendant 1 minute à vitesse maximale (12000 g) pour nettoyer la membrane.

**N.B :** Pour des résultats optimaux, assurez vous que la colonne de centrifugation est placée dans la centrifugeuse dans la même orientation à chaque étape.

12. Transférer la colonne dans un nouveau tube de collecte et ajouter 500 µl de tampon de lavage ADNg. Centrifuger immédiatement pendant 1 minute à vitesse maximale (12000 g) et jeter l'écoulement.
13. Réinsérez la colonne dans le tube de collecte. Ajouter 500 µl de tampon de lavage ADNg et fermer le bouchon. Centrifuger immédiatement pendant 1 minute à vitesse maximale (12000 g), puis jeter le tube de prélèvement et faire couler.
14. Placer la colonne de purification d'ADNg dans un tube de microcentrifugeuse sans DNase de 1,5 ml. Ajouter 35-100 µl de tampon d'éluion d'ADNg préchauffé (60°C), fermer le bouchon et incubant à température ambiante pendant 1 minute (**Biolabs, 2020**).

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

Il s'agit d'un protocole pour une digestion préparatoire, qui consiste à couper notre gène d'intérêt pour le préparer à la ligature avec un autre morceau d'ADN.

**Matériel :**

- Chambre d'électrophorèse
- Pipetman

**Réactifs :**

- L'ADN de *C. acnes*
- Colorant de chargement de gel
- Plasmide pLBU3
- Tampon d'électrophorèse
- Enzyme de restriction appropriée : *Pfo* I
- Pointes de pipette
- Tampon de digestion de restriction.

**2.1. Digestion de l'ADN de *C. acnes* :**

1. Dans un tube de 1,5 ml, combinez les éléments suivants :

- 1 µg d'ADN de *C. acnes*
- 1 µl d'enzyme de restriction *Pfo* I
- 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 plasmide pLBU3 :**

1. Dans un tube de 1,5 ml, combinez les éléments suivants :

- 10-20 µl du plasmide pLBU3
- 1.5-2 µl d'enzyme de restriction *Pfo* I
- 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).

#### Matériel / Réactifs :

- Plateau de coulée • Tampon TAE (pour Tris, Acétate, EDTA)
- Bien peignes • Agarose
- Source de voltage • Bromure d'éthidium
- Boîte de gel
- source de lumière UV
- Four micro-onde

#### 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.

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 diagnostique de digestion est celle dans laquelle nous vérifions la taille de l'insert/ plasmide en fonction de pb.

→ pour le plasmide pLBU3, la taille du vecteur après la digestion devrait être : 324pb, 721pb, 4055pb.

### 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 plasmide/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 pLBU3 digéré.
  - L'insert (fragment d'ADN qui contient le gène d'intérêt).
  - Tampon ligase (1µl/10µl de réaction pour le tampon 10X et 2µl/10µl de réaction pour le tampon 5X).

- 0,5-1 µl d'ADN ligase T4
  - Remplir avec H<sub>2</sub>O 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 du tranformation (**Addgene, 2017**).

### **5. La transformation génétique :**

La transformation est le processus qui va assurer l'introduction de l'ADN recombiné à l'intérieur du cellule hôte d'*E.coli*.

#### **Matériel :**

- 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 ou tétracycline)
- Milieu LB ou SOC
- Cellules compétentes d'*Escherichia coli*
- L'ADN recombiné (le gène d'intérêt + plasmide pLBU3)

#### **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 ou tétracycline) 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 transformation 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 1000 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 transformation 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 transformées qui contiennent le vecteur recombiné ou non recombiné survivront à l'intérieur du milieu contenant de l'ampicilline ou tétracycline (car pLBU3 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 pLBU3 contient un gène de résistance à l'ampicilline et tétracycline, donc en passant par l'étape précédente nous pouvons filtrer les cellules qui contiennent le vecteur pLBU3, mais nous ne savons toujours pas si le vecteur contient le gène d'intérêt ou non (nous ne savons pas encore si la ligature des fragments d'ADN a réussi) et nous pouvons pas utiliser la technique de criblage bleu-blanc par ce que le gène *lacZ* n'est pas affecté par la l'enzyme de restriction *PfoI* (il reste intacte).

Nous proposons alors de faire une autre technique permette la distinction entre les cellules contenant le vecteur recombiné ou non par culture des cellules survivantes avec notre cible ; *Staphylococcus*. L'apparition des zones d'inhibitions après incubation indique la souche qui contient le vecteur recombiné.

### **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
- Agar-Agar: 10 g
- Peptone: 10 g
- Eau Distillé: 1,000 ml
- NaCl: 5 g
- pH Final (25°C) = 7.3 ± 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 bactérienneensemencée 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 microbiologie industrielle pour être utilisée pour produire la cutimycine via notre bactérie OGM.

La souche d'*Escherichia coli* (*cut20*) productrice de la cutimycine 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 maximal est obtenu avant que les cellules ne meurent. Une fois le processus terminé, la cutimycine 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 (voir figure 35).

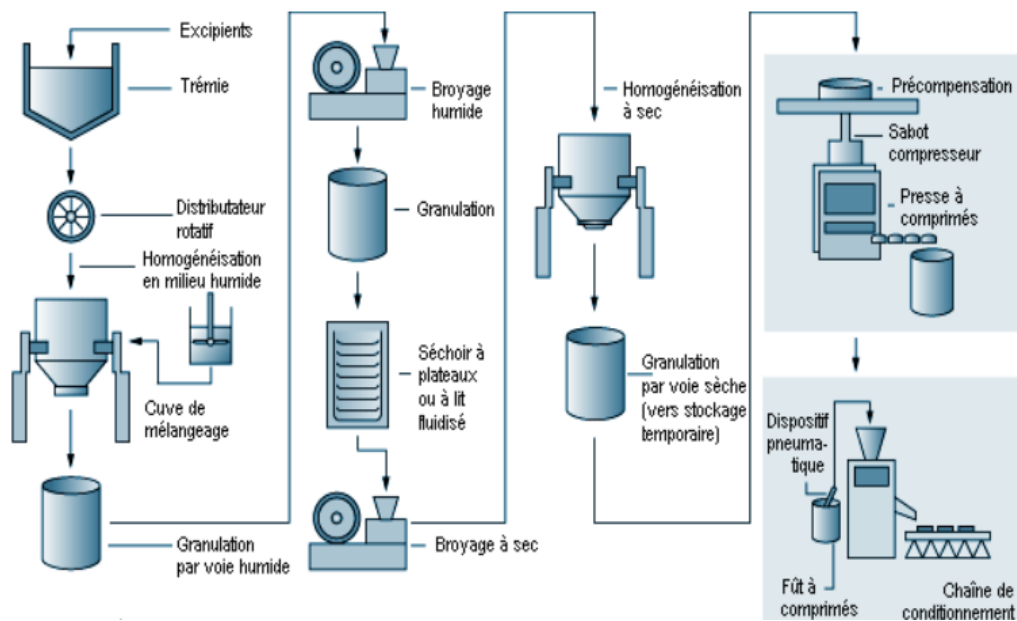


Schéma de fabrication de comprimés contraceptifs pour administration par voie orale (Kroschwitz, 1992).



Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : Boudaoud Raounek  
Terrouche Hind  
Boudjenoui Nesrine

La cutimycine : un nouvel antibiotique découvert dans le microbiote cutané.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie moléculaire des microorganismes.

### Résumé :

*Cutibacterium acnes* (anciennement *Propionibacterium acnes*) est la célèbre bactérie commensale du microbiote cutané. Récemment, il a été montré qu'elle produit un nouvel antibiotique nommé la cutimycine secrété dans le cadre de compétition contre certaines espèces.

La cutimycine est un peptide antimicrobien synthétisé par voie ribosomale et modifié après traduction. Elle a une activité puissante contre les bactéries du genre *Staphylococcus* (y compris certains staphylocoques multirésistants dont le doré). En revanche, elle n'a montré aucune activité contre d'autres commensaux cutanés courants. Leur mécanisme d'action consiste en l'inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique lors de la synthèse protéique bactérienne. La cutimycine a été totalement efficace dans les expérimentations en réduisant la charge bactérienne des SARM, ce qui en fait un candidat prometteur pour créer une solution à la menace d'antibiorésistance.

Ce travail constitue une tentative de proposition de la production de la cutimycine par la méthode du clonage en se basant sur les interfaces GenBank, Addgene et GenScript. Les résultats de notre travail ont montré que l'enzyme de restriction c'est la *Pfo* I, le vecteur c'est le pLBU3 et l'hôte le plus approprié c'est *E.coli*.

Au terme de ce travail, nous pouvons conclure que la cutimycine peut être mieux biosynthétisée par voie biologique, une méthode rapide, facile, efficace, moins dispendieuse que les procédés chimiques longs, compliqués et coûteux.

**Mots-clés :** Cutimycine, *Cutibacterium acnes*, Microbiote cutané, Interactions microbiennes, SARM, Antibiotique, L'antibiorésistance, Clonage.

### Laboratoires de recherche :

Laboratoire de ..... (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadreur :** SEKHRI-ARAFA Nedjouda (Maître de conférences A – UFM Constantine1).

**Examineur 1 :** ABDELAZIZ Ouided (Maître de conférences B- UFM Constantine 1).

**Examineur 2 :** MEZIANI Meriem (Maître de conférences B – UFM Constantine1).