

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS**

**UNIVERSITÉ DE TOURS**

**FACULTE DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »**

Année 2021

N° 75

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**

**Spécialité Biologie médicale**

**TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE**

**pour le**

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

RUFFIER D'EPENOUX Louise, née le 20 Janvier 1992 à Paris

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 13 Septembre 2021

**Evaluation de l'activité de différentes substances actives sur des  
souches de *Cutibacterium acnes* après croissance en biofilm**

**JURY**

Président : Professeur Philippe LANOTTE, Faculté de Pharmacie – Tours

Membres : Professeur Brigitte DRÉNO, Faculté de Médecine – Nantes

Professeur Stéphane CORVEC, Faculté de Médecine – Nantes

Docteur Aurélie GUILLOUZOUIC, Nantes

**ANNEE : 2020 - 2021**

**Directrice : Pr Véronique MAUPOIL**

**Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS**

**Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### **10 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### **6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS**

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
GIRAudeau	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAULT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### **2 PROFESSEURS ÉMERITES**

GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### **35 MAITRES DE CONFÉRENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAJE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAJE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

### 3 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

### 1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

VANIER	Antoine	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
--------	---------	-----------------------------

### 1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

### 2 CHARGÉS DE RECHERCHE

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE

### 1 PHARMACIEN D'OFFICINE – PAST (Enseignant Associé)

JOYEUX	VINCENT	Filière Pharmacie
--------	---------	-------------------

### 2 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### 1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

HEREDIA-MARQUEZ	Arturo Vladimir	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
-----------------	-----------------	--



## **SERMENT DE GALIEN**

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

*Date :* 13 Septembre 2021

*L'étudiant*

Madame Louise Ruffier d'Epenoux

*Le Doyen de la Faculté*

Mme Véronique Maupoil

## Remerciements

**A Monsieur le Professeur Philippe LANOTTE,**

De me faire l'honneur de présider ce jury et de juger mon travail.

**A Madame le Professeur Brigitte DRÉNO,**

D'avoir accepté de juger ma thèse. Merci de m'avoir intégrée dans votre unité de recherche.

**A Monsieur le Professeur Stéphane CORVEC,**

De m'avoir proposée ce sujet de thèse. Merci pour votre rigueur scientifique, vos précieux conseils, votre implication dans mes différents projets et votre temps qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Merci pour votre bienveillance à mon égard, votre confiance et votre soutien.

**A Madame le Docteur Aurélie GUILLOUZOUIC,**

D'avoir accepté de juger mon travail. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance durant ces trois stages de Bactériologie. Merci pour tous tes précieux conseils et toutes tes connaissances transmises.

**Aux personnels du service de Bactériologie et des contrôles microbiologiques du CHU de Nantes,**

Merci à tous, techniciens et chefs pour votre disponibilité et toutes vos connaissances transmises.

**A Monsieur le Professeur Alban LE MONNIER,**

Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour effectuer mon Master 1 et mon FFI. Merci de m'avoir transmis le goût de la bactériologie, de vos conseils et de vos encouragements. Saint Joseph aura toujours une place particulière dans mon cœur.

**A mes amis,**

De Paris à Nantes en passant par Poitiers, merci pour tous ces moments partagés, pour votre soutien et pour votre fidélité. Louise, Barbara et Eugénie l'internat aurait été différent sans vous, merci pour tout.

**A mes frères,**

Félix,

Je suis si fière de toi, de la personne que tu es devenue, de ta réussite, de ta force de caractère et de ta gentillesse. Je te souhaite le meilleur avec ta Théo !

Edouard,

Merci d'avoir été ce grand frère bienveillant, attentionné mais pas trop protecteur. Ton intelligence, ta détermination, ton charisme m'impressionneront toujours. Je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle vie à Amsterdam !

**A ma Maman,**

Merci de m'avoir transmis le goût de la recherche. Ta force de caractère, ta détermination, ton sens de l'organisation, ton anticipation sont une source d'inspiration. Merci pour ton amour, ton soutien, ta confiance. Merci de toujours veiller sur nous trois.

**A mon Papa,**

Merci d'avoir été mon coach d'escrime, mon plus grand supporter durant toutes mes années d'études. Merci pour tout l'amour que tu m'as donné, pour ton soutien indéfectible et pour la confiance que tu m'apportais. J'espère que, de là-haut, tu es fière de la personne que je suis devenue. Je te dédie cette thèse.

# Table des matières

Liste des Abréviations.....	11
Liste des Figures .....	13
Listes des Tableaux.....	16
Partie I : Revue Bibliographique .....	17
I.    Le biofilm.....	17
1-1.    Définition.....	17
1-2.    Etapas de formation du biofilm .....	17
1-2-1.    Adhérence réversible .....	17
1-2-2.    Adhérence irréversible .....	18
1-2-3.    Développement précoce du biofilm .....	18
1-2-4.    Maturation .....	18
1-2-5.    Détachement.....	19
1-3.    Composition du biofilm .....	20
1-4.    Techniques d'analyse <i>in vitro</i> du biofilm au laboratoire.....	20
1-4-1.    Méthodes d'étude de la biomasse totale.....	20
1-4-2.    Méthode d'étude de la matrice : le DMMB.....	21
1-4-3.    Méthodes de la viabilité cellulaire.....	21
1-4-4.    BioFilm Ring Test® .....	22
1-4-5.    Méthodes dynamiques en flux .....	22
II.    Importance clinique des biofilms.....	23
2-1.    Résistances des bactéries au sein des biofilms.....	23
2-1-1.    Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens .....	23
2-1-2.    Résistance des biofilms au système immunitaire .....	24

2-2.	Infections impliquant les biofilms bactériens .....	24
2-3.	Traitement des infections bactériennes liées aux biofilms .....	24
III.	L'acné.....	27
3-1.	Epidémiologie.....	27
3-2.	Physiopathologie .....	27
3-2-1.	L'hyperséborrhée .....	28
3-2-2.	L'hyperkératinisation .....	32
3-2-3.	Colonisation de la peau par <i>C. acnes</i> .....	32
3-3.	Aspects cliniques .....	32
3-3-1.	Scores d'évaluation de l'acné .....	32
3-3-2.	Facteurs associés à la sévérité de l'acné .....	33
3-3-3.	Formes cliniques de d'acné .....	33
3-4.	Traitement de l'acné .....	35
3-4-1.	Les antibiotiques par voie topique .....	35
3-4-2.	Les antibiotiques par voie générale.....	35
3-4-3.	Substance anti-biofilm : la Myrtacine® .....	36
3-4-4.	Vers un vaccin contre l'acné ? .....	37
IV.	<i>Cutibacterium acnes</i> .....	41
4-1.	Taxonomie et phylogénie de <i>C. acnes</i> .....	41
4-2.	Niche écologique et caractéristiques bactériologiques de <i>C. acnes</i> .....	42
4-2-1.	Habitat .....	42
4-2-2.	Caractères morphologiques, biochimiques et culturels .....	44
4-3.	Pouvoir pathogène .....	46
4-3-1.	Facteurs de virulence .....	47



4-3-2.	Capacité à former un biofilm.....	49
4-4.	Rôle de <i>C. acnes</i> dans l'acné .....	51
4-4-1.	<i>C. acnes</i> et inflammation .....	51
4-4-2.	<i>C. acnes</i> et comédogenèse .....	57
4-4-3.	<i>C. acnes</i> et hyperséborrhée.....	58
4-4-4.	<i>C. acnes</i> , biofilm et acné.....	59
4-4-5.	Microbiote cutané, acné et <i>C. acnes</i> .....	60
4-5.	<i>C. acnes</i> et résistance au traitement antibiotique .....	64
4-5-1.	Résistance aux macrolides et aux lincosamides : érythromycine et clindamycine.....	64
4-5-2.	Résistance aux tétracyclines : doxycycline et lymécycline.....	65
4-5-3.	Epidémiologie des résistances de <i>C. acnes</i> aux antibiotiques .....	65
Partie II	.....	68
I.	Objectifs .....	68
II.	Matériel et Méthodes.....	68
2-1.	Origine des souches de <i>C. acnes</i> utilisées.....	68
2-2.	Méthodes d'étude <i>in vitro</i> du biofilm de <i>C. acnes</i> .....	69
2-2-1.	Méthode de coloration au Crystal Violet.....	69
2-2-2.	Méthode du BioFilm Ring Test® .....	71
2-2-3.	Variation des conditions expérimentales .....	73
III.	Résultats .....	75
3-1.	Mise au point de la technique du BioFilm Ring Test® .....	75
3-2.	Détection de la capacité à produire un biofilm par les huit souches de <i>C. acnes</i> .	75
3-2-1.	Méthode de coloration au Crystal Violet.....	75

3-2-2.	Méthode du BioFilm Ring Test® .....	77
3-2-3.	Corrélation entre les deux méthodes .....	79
3-3.	Influence de l'ajout de différentes substances actives sur les premières phases de formation du biofilm : technique du BioFilm Ring Test® .....	79
3-3-1.	Influence de l'ajout d'antibiotiques.....	79
3-3-2.	Influence de l'ajout d'une substance anti-biofilm : la Myrtacine® .....	81
3-4.	Influence de l'ajout, sur un biofilm mature, de différentes substances actives selon deux protocoles : technique du Crystal Violet .....	82
3-4-1.	Influence de l'ajout de substances actives sur la production de biofilm par huit souches de <i>C. acnes</i> : épreuve curative .....	82
3-4-2.	Influence de l'ajout de substances actives sur la production de biofilm par huit souches de <i>C. acnes</i> : épreuve préventive .....	88
IV.	Discussion .....	92
	Références.....	98

## Liste des Abréviations

17HSD = 17 $\beta$ HSD	17 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase
4-A = $\Delta$ 4-A	$\Delta$ 4-androstènedione
ADN	Acide DésoxyRibonucléique
AKT	Serine/ threonine specific protein kinase
AMPs	AntiMicrobial Peptides
AR	Récepteur aux Androgènes
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNr	Acide RiboNucléique Ribosomique
ARNt	Acide RiboNucléique Transfert
ATBs	AnTiBiotiques
BHI	Brain Heart Infusion
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Peterson facteur
CD36	Cluster of Differentiation 36
CRH	Corticotropine Releasing Hormone
DHA	DiHydroépiAndrostérone
DHT	DiHydroTestostérone
DMMB	1,9 DiMethyl Methylene Blue
ECLA	Echelle de Cotation des Lésions de l'Acné
FDA	Food and Drug Administration
GEA	Global Evaluation Acne
GH	Growth Hormone
HAS	Haute Autorité de Santé
hBD-2	Bêta-Défensin-2
IGF-1	Insulin- like Groth Factor
IL	InterLeukine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MIP-2	Macrophage – Inflammatory Protein 2
MMPs	MétalloProtéinases Matricielles

NFκB	Nuclear Factor-kappa B
NLRP-3	Nod-Like Receptor Protein 3
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Pattern
Pb	Paire de bases
PI-3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PNN	PolyNucléaire Neutrophile
Récepteur RXR	Retinoid X Receptor
Récepteurs PPAR α/ β/ σ	Peroxisome Proliferator- Activated Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
SCH	Gélose Schaedler
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
T	Testostérone
TLRs	Toll-Like Receptor
TNF α	Tumor Necrosis Factor α

## Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm (Van Houdt et Michiels, 2005) .....	17
Figure 2 : Le biofilm : site de gradients inverses (Flemming <i>et al.</i> , 2016) .....	19
Figure 3 : Schéma de l'étude du biofilm en cuves à flux continu ou "flow cell" (Tolker- Nielsen <i>et al.</i> , 2014) .....	22
Figure 4 : Schéma représentatif du follicule pilo sébacé .....	27
Figure 5 : Composition en lipides du sébum .....	28
Figure 6 : Action des androgènes sur le sébocyte.....	29
Figure 7 : Echelle GEA évaluant le degré de sévérité de l'acné (Dréno <i>et al.</i> , 2011) .....	33
Figure 8 : Evaluation du nombre de cellules adhérentes (log CFU/cm <sup>2</sup> ; n = 2 ; moyenne ±SD) de <i>C. acnes</i> à différents temps (5 h, 24 h et 48 h) après ajout de différentes concentrations de Myrtacine® (0,1 %, 0,01 % et 0,001 %) (Feuillolay <i>et al.</i> , 2016) .....	37
Figure 9 : Effet d'un anticorps monoclonal ciblant le facteur CAMP de <i>C. acnes</i> sur le taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et IL-1β) (Wang <i>et al.</i> , 2018) .....	38
Figure 10 : Recommandations de la prise en charge de l'acné, Société Française de Dermatologie, 2015.....	40
Figure 11 : Arbre phylogénétique suite à l'analyse de 16 séquences nucléotidiques de 1173pb du gène codant pour l'ARNr 16S de différents <i>Propionibacteriaceae</i> (Corvec <i>et al.</i> , 2019)....	42
Figure 12 : Abondance cutanée relative des espèces de <i>Cutibacterium</i> (Achermann <i>et al.</i> , 2014) .....	43
Figure 13 : Distribution des bactéries selon le site cutané (Grice <i>et al.</i> , 2011) .....	44
Figure 14 : <i>Cutibacterium acnes</i> (coloration de Gram) .....	44
Figure 15 : Pouvoir hémolytique de <i>C. acnes</i> sur gélose SCH en fonction de son phylotype (Corvec <i>et al.</i> , 2015) .....	46

Figure 16 : Carte génétique du chromosome de <i>C. acnes</i> (Brüggemann <i>et al.</i> , 2005) .....	46
Figure 17 : Facteurs de virulence de <i>C. acnes</i> (d'après Mayslich <i>et al.</i> , 2021) .....	48
Figure 18 : Microscopie électronique à balayage d'un biofilm d'isolat de <i>C. acnes</i> (souche AD49, phylotype II) formé sur du plastique (Holmberg <i>et al.</i> , 2009) .....	49
Figure 19 : Microscopie électronique du biofilm formé par la souche de <i>C. acnes</i> KPA171202, phylotype IB sur une bille de verre (Jahns <i>et al.</i> , 2016). .....	49
Figure 20 : Biofilm formé par la souche de <i>C. acnes</i> ATCC11827 (phylotype IA <sub>1</sub> ), par microscopie électronique, sur une tige d'acier inoxydable (Achermann <i>et al.</i> , 2014). .....	50
Figure 21 : <i>C. acnes</i> sous forme de macrocolonie (Jahns <i>et al.</i> , 2012) .....	51
Figure 22 : <i>C. acnes</i> et immunité innée (Renaud, 2014) .....	52
Figure 23 : Schéma général du fonctionnement de NLRP3 (Jamilloux <i>et al.</i> , 2013) .....	54
Figure 24 : Rôle de <i>C. acnes</i> dans l'inflammation (Lee YB <i>et al.</i> , 2019) .....	56
Figure 25 : Rôles de <i>S. epidermidis</i> et <i>C. acnes</i> dans les interactions entre les bactéries et la peau saine (Fournière <i>et al.</i> , 2020) .....	61
Figure 26 : Analyses de l'abondance relative des espèces bactériennes retrouvées dans les follicules pileux de patients acnéiques <i>versus</i> patients sains (Barnard <i>et al.</i> , 2016b) .....	62
Figure 27 : Phylotypes de <i>C. acnes</i> chez patients sains <i>versus</i> patients acnéiques (Dagnelie <i>et al.</i> , 2018) .....	63
Figure 28 : Principe de la mesure de la biomasse par la technique du Crystal Violet (Auger, 2011 (144)) .....	69
Figure 29 : Principe de la méthode du BioFilm Ring Test® (d'après BioFilm Control®) .....	72
Figure 30 : Schéma du protocole d'une épreuve curative .....	74
Figure 31 : Schéma du protocole d'une épreuve préventive .....	74
Figure 32 : Photographie d'une plaque 96 puits après redissolution au Crystal Violet .....	76

Figure 33 : Indice de formation du biofilm (SBF) calculé pour l'ensemble des souches testées avec la technique du Crystal Violet.....	77
Figure 34 : Pourcentage de formation du biofilm calculé pour l'ensemble des souches testées à T3h et à T6h avec la technique du BioFilm Ring Test® .....	78
Figure 35 : Corrélation entre les méthodes du Crystal Violet (CV) et du BioFilm Ring Test® (BRT).....	79
Figure 36 : Impact de l'ajout d'antibiotique sur les premières étapes de formation du biofilm de <i>C. acnes</i> : exemple de la souche ATCC 6919 à T6h avec la technique du BioFilm Ring Test® .....	80
Figure 37 : Effet paradoxal de la Myrtacine® sur les billes magnétiques du BioFilm Ring Test® .....	81
Figure 38 : Impact de l'ajout des antibiotiques (érythromycine, clindamycine, doxycycline) sur la biomasse totale des souches de <i>C. acnes</i> : exemple de la souche ATCC 6919 .....	83
Figure 39 : Impact de l'ajout de la Myrtacine® sur les différentes souches de <i>C. acnes</i> : épreuve curative .....	85
Figure 40 : Impact de l'ajout de l'association Myrtacine® / doxycycline à différentes concentrations sur des souches de <i>C. acnes</i> : épreuve curative .....	87
Figure 41 : Impact de l'ajout de la doxycycline sur les différentes souches de <i>C. acnes</i> : épreuve préventive .....	89
Figure 42 : Impact de l'ajout de la Myrtacine® sur les différentes souches de <i>C. acnes</i> : épreuve préventive .....	91

## Listes des Tableaux

Tableau 1 : Composition du biofilm bactérien (Flemming <i>et al.</i> , 2001) .....	20
Tableau 2 : Caractéristiques phénotypiques permettant de différencier les différentes espèces du genre <i>Cutibacterium</i> (Aubin <i>et al.</i> , 2016b) .....	45
Tableau 3 : Différents taux de résistance de <i>C. acnes</i> aux antibiotiques chez des patients acnéiques dans différents pays (Platsidaki <i>et al.</i> , 2018 (184)) .....	67
Tableau 4 : Liste des souches de référence et cliniques de <i>C. acnes</i> sélectionnées pour l'étude .....	68
Tableau 5 : Indice de formation du biofilm calculé (SBF) pour l'ensemble des souches testées avec la technique du Crystal Violet.....	76
Tableau 6 : Pourcentage de formation du biofilm (% BFI) calculé pour l'ensemble des souches testées à T3h et à T6h avec la technique du BioFilm Ring Test® .....	78
Tableau 7 : Impact de l'ajout d'antibiotiques sur les premières étapes de formation du biofilm avec la technique du BioFilm Ring Test® .....	80



## Partie I : Revue Bibliographique

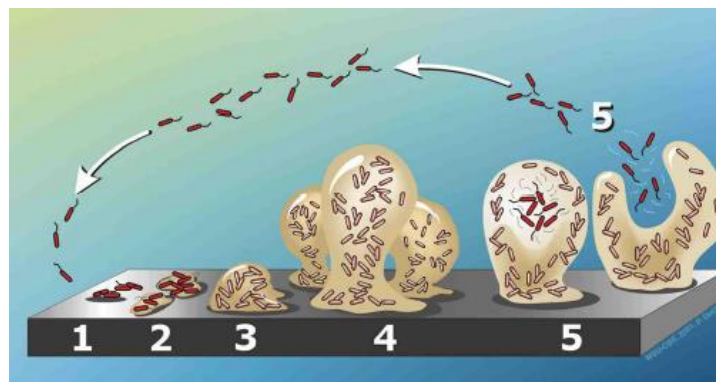
### I. Le biofilm

#### 1-1. Définition

Les biofilms bactériens sont des structures hétérogènes constituées d'agrégats de populations bactériennes englobées dans une matrice exopolysaccharidique (1,2). Les bactéries peuvent adhérer et former des biofilms sur des surfaces biotiques (tissus, peaux, muqueuses...) ou abiotiques (implants médicaux, coques de bateaux, rochers...) (3).

#### 1-2. Etapes de formation du biofilm

Les bactéries initient la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale (manque d'oxygène, de nutriment, ou présence d'un traitement). Cinq étapes se distinguent lors de la formation des biofilms (Figure 1) (4).



**Figure 1 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm (Van Houdt et Michiels, 2005)**

1 : Adhérence réversible ; 2 : Adhérence irréversible ; 3 : Développement précoce du biofilm ; 4 : Maturation ; 5 : Détachement

#### 1-2-1. **Adhérence réversible**

Dans un milieu liquide, les bactéries se déplacent grâce à la force du flux et aux mouvements de leurs flagelles (5,6). Lorsque les bactéries arrivent au contact d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques (forces d'attraction de Van der Waals, forces électrostatiques, interactions hydrophobes, interactions stériques) sont mises en jeu permettant une interaction réversible entre la bactérie et la surface (7). La faible énergie de ces liaisons explique la notion de « réversibilité ».

D'autres paramètres interviennent dans cette étape tels que les conditions environnementales (pH, osmolarité du milieu, température, concentration en oxygène et en nutriments (8)) mais aussi la nature du milieu (rugosité, polarité, hydrophobicité). Ainsi, les bactéries adhèrent mieux sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (8).

#### **1-2-2. Adhérence irréversible**

Suite à l'adhérence réversible, les bactéries se divisent, synthétisent des structures d'adhérence (fimbriae, curli, pili, adhésine), et adhèrent de manière irréversible à la surface (4,8). Les bactéries forment alors des amas sur la surface biotique ou abiotique.

#### **1-2-3. Développement précoce du biofilm**

Les bactéries se multiplient, s'agrègent entre elles et produisent un exopolysaccharide. Elles forment alors des microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent mais aussi de nouvelles bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation. Ces microcolonies sont alors protégées par la matrice exopolysaccharidique (9).

#### **1-2-4. Maturation**

La maturation du biofilm correspond d'une part, au développement des microcolonies et, d'autre part, à la structuration du biofilm. Une modification du transcriptome, une diminution de la synthèse d'adhésines et de flagelles, et une augmentation de la synthèse de la matrice exopolysaccharidique sont observées (9). L'architecture complexe du biofilm se met place. Des espaces séparant les microcolonies se forment, permettant l'acheminement de l'oxygène et des nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes ainsi qu'à l'élimination des déchets (10). Le biofilm mature est le site de gradients inverses en nutriments, en oxygène et en déchets (Figure 2, page 19) (9,11). Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement plus en anaérobiose et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (12).

Dans le biofilm, les bactéries ont un métabolisme et un mode de croissance différents des bactéries planctoniques (13).

Pour coordonner ces modifications, les bactéries communiquent entre elles grâce à un système : le quorum sensing (14). Ce système, *via* la production de molécules diffusibles, notamment autoinducer-2 chez *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*) (15) permet aux bactéries d'avoir une indication sur la densité cellulaire dans un environnement donné et ainsi de réguler leur expression génétique.

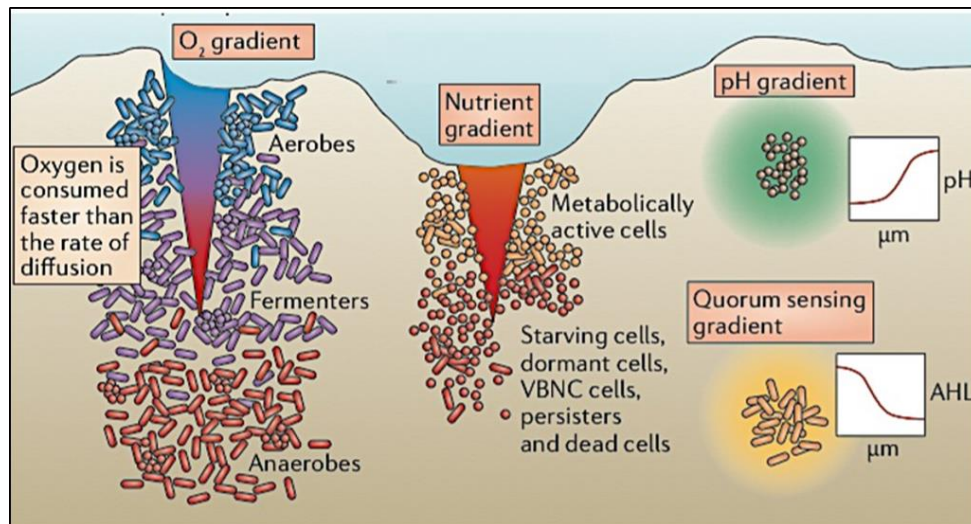


Figure 2 : Le biofilm : site de gradients inverses

### 1-2-5. Détachement

Sur une surface donnée, la densité bactérienne peut atteindre  $10^7$  cellules/cm<sup>2</sup> (2). Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature, retourner à un état planctonique et se disperser dans le milieu environnant. Le phénomène de détachement est dépendant des signaux environnementaux mais aussi de la communication entre les bactéries.

Le détachement des bactéries, seule ou par amas, est un phénomène passif dû aux forces de flux du milieu.

Cependant, certains auteurs considèrent que le détachement des bactéries est un phénomène actif, initié par la bactérie elle-même, pour coloniser de nouvelles surfaces, afin de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités au sein du biofilm (9).

Le biofilm bactérien constitue donc un réservoir de bactéries pouvant aller coloniser d'autres surfaces (métastases septiques secondaires).

### 1-3. Composition du biofilm

Le biofilm bactérien est une structure hétérogène complexe, variable d'un biofilm à l'autre selon les conditions environnementales et les micro-organismes qui le composent (16).

Le biofilm bactérien est composé d'agrégats de micro-organismes, séparés par des espaces libres permettant la circulation de fluides nécessaires à l'apport de nutriments et d'oxygène mais aussi à l'élimination des produits de dégradation (17).

Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm. La matrice extracellulaire inclut tous les éléments du biofilm autre que les micro-organismes. Cette structure hautement hydratée, peut contenir jusqu'à 99 % d'eau (18). Elle est composée, de plus, de polymères polysaccharidiques (19) sécrétés par les micro-organismes, des produits de dégradation, des substances provenant du milieu extérieur mais aussi de l'ADN, de l'ARN et des lipides (20) (Tableau 1).

**Tableau 1 : Composition du biofilm bactérien**

	<b>Composés</b>	<b>Fraction</b>	
	Bactéries	1-2 %	
Matrice extracellulaire	Eau	87-99 %	
	Polysaccharides	2-5 %	40-95 %
	Protéines		<1 à 60 %
	Acides Nucléiques		<1 à 10 %
	Lipides		<1 à 40 %

### 1-4. Techniques d'analyse *in vitro* du biofilm au laboratoire

#### **1-4-1. Méthodes d'étude de la biomasse totale**

##### **Crystal Violet**

Le principe de cette méthode sera décrit dans le paragraphe « Matériel et Méthodes » (21,22).

### **Syto9**

Les marqueurs SYTO® sont des molécules ayant une fluorescence intrinsèque nulle. Lorsqu'ils se lient à des acides nucléiques, ils émettent une fluorescence importante. Ces fluorophores diffusent à travers toutes les membranes cellulaires. Ainsi, le Syto9 se lie aux acides nucléiques des bactéries vivantes et mortes mais aussi à la matrice extracellulaire. Ce marqueur permet donc de quantifier la biomasse totale du biofilm (23).

#### **1-4-2. Méthode d'étude de la matrice : le DMMB**

Le DMMB (1,9 dimethyl methylene blue) est une molécule qui se lie aux polysaccharides de la matrice du biofilm par complexation. Après ajout d'une solution de décomplexation, le taux de colorant libéré est mesuré par spectrophotométrie. La densité optique obtenue est alors proportionnelle à la quantité de polysaccharides de la matrice du biofilm (24).

#### **1-4-3. Méthodes de la viabilité cellulaire**

### **Sel de tétrazolium**

Le sel de tétrazolium est un composé jaune qui est réduit par les bactéries métaboliquement actives en composé orange : le formasan. Le formasan peut être quantifié par spectrophotométrie. Cette méthode permet ainsi de quantifier les cellules viables, métaboliquement actives, présentes dans un biofilm (25).

### **Résazurine**

La résazurine est un colorant bleu pouvant être réduit en résorufine (composé rose fluorescent) par les bactéries viables. La quantité de résorufine, mesurée par fluorimétrie, est proportionnelle au nombre de bactéries métaboliquement actives présentes dans le milieu (26, 27).

### **FDA : fluorescéine diacétate**

La FDA est une molécule non fluorescente capable de traverser les membranes de toutes les cellules. Ce marqueur est hydrolysé en composé jaune très fluorescent, par les estérases bactériennes. Ce marqueur quantifie le nombre de cellules viables (23).

#### 1-4-4. BioFilm Ring Test®

Le principe de cette méthode sera décrit dans la section « Matériel et Méthodes » (28).

#### 1-4-5. Méthodes dynamiques en flux

Les cuves à flux continu ou « flow cell », sont des petites chambres continuellement approvisionnées en éléments nutritifs *via* la « Media bottle », avec un système d'élimination des déchets la « Waste bottle » (Figure 3 (29)). Ce système permet d'observer la formation d'un biofilm à l'interface solide-liquide grâce l'utilisation d'un microscope confocal à balayage laser (30) et de reproduire les conditions auxquelles il est exposé dans son environnement naturel. Il est, de plus, possible de modifier les conditions hydrodynamiques.

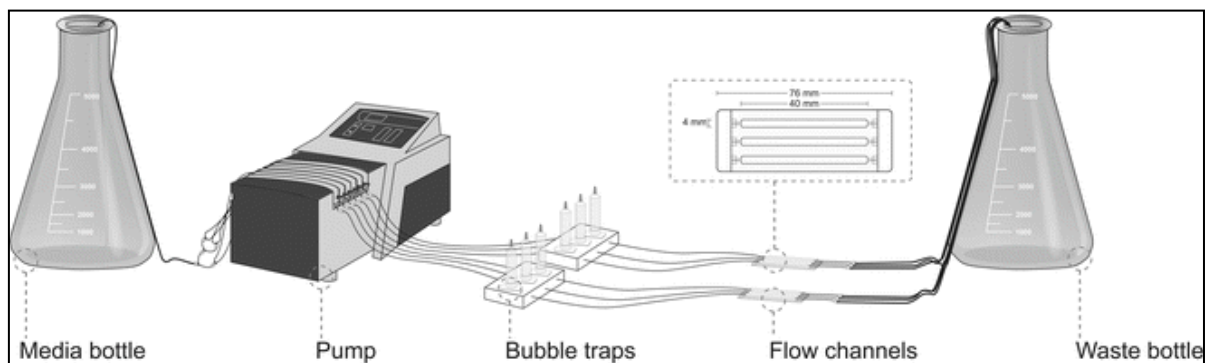


Figure 3 : Schéma de l'étude du biofilm en cuves à flux continu ou "flow cell" (Tolker- Nielsen *et al.*, 2014)

- Les biofilms bactériens sont des structures hétérogènes constituées d'agrégats de populations bactériennes englobées dans une matrice exopolysaccharidique, pouvant se développer sur des surfaces biotiques et abiotiques.
- Il existe de nombreuses techniques d'analyses *in vitro* des biofilms au laboratoire permettant l'étude de cette structure complexe.

## II. Importance clinique des biofilms

### 2-1. Résistances des bactéries au sein des biofilms

#### **2-1-1. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens**

Les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que les bactéries sous formes planctoniques. En 2007, Coenye *et al.*, (15) ont montré, *in vitro*, une plus grande résistance aux antibiotiques de *C. acnes* lorsque cette bactérie est dans un biofilm plutôt que sous forme planctonique. Les concentrations d'antibiotiques nécessaires pour inhiber les bactéries du biofilm sont de 100-1000 fois plus importantes que celles utilisées pour les bactéries planctoniques (31). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette plus grande résistance aux agents antimicrobiens :

- La matrice polymérique agit comme une barrière réduisant la diffusion des agents antimicrobiens aux bactéries contenues dans le biofilm. Les charges électrostatiques à la surface de la matrice polymérique peuvent aussi interagir avec certains agents antimicrobiens. Par exemple, les aminosides chargés positivement interagissent avec les exopolysaccharides de la matrice chargés négativement (32).
- Les bactéries au centre des agrégats bactériens ont un moins bon accès à l'oxygène et aux nutriments, elles sont donc moins actives métaboliquement et ont un taux de croissance faible, elles sont dites en dormance (33). Du fait de leur mécanisme d'action, de nombreux antibiotiques, comme les  $\beta$ -lactamines, s'avèrent moins efficaces sur ces bactéries métaboliquement peu actives (34).
- Enfin, la proximité spatiale des bactéries au sein du biofilm favorise le transfert horizontal de matériel génétique pouvant contenir des gènes de résistance aux antibiotiques et ainsi favoriser l'antibiorésistance (35).

### **2-1-2. Résistance des biofilms au système immunitaire**

Le biofilm protège les bactéries vis-à-vis du système immunitaire. Deux facteurs peuvent être évoqués :

- La taille du biofilm est un frein au processus de phagocytose. Lors de ce processus, les cellules phagocytaires pénètrent difficilement dans la matrice extracellulaire, et deviennent plus vulnérables à l'action inactivatrice des enzymes bactériennes (36).
- La matrice polymérique entourant le biofilm est une barrière physique empêchant la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps (1).

L'immunité cellulaire et humorale ne permettent donc pas d'éliminer le biofilm.

### **2-2. Infections impliquant les biofilms bactériens**

Les biofilms bactériens sont responsables du développement ou de l'exacerbation d'infections chroniques telles que les endocardites infectieuses (37), la mucoviscidose (38), la pathologie cutanée inflammatoire chronique qu'est l'acné (39), les infections urinaires récidivantes (40), et contribuent également aux infections nosocomiales, en se développant sur divers dispositifs implantés (41) (sondes urinaires, cathéters, prothèses, pacemakers ...).

### **2-3. Traitement des infections bactériennes liées aux biofilms**

En raison de la grande résistance/tolérance des bactéries au sein des biofilms, l'objectif premier est d'empêcher son établissement. Certaines règles concernant les dispositifs médicaux sont à respecter : limiter leurs utilisations aux recommandations des sociétés savantes, les implanter dans des conditions d'hygiène stricte et les garder en place le moins de temps possible. Plusieurs études préconisent l'utilisation de dispositifs médicaux imprégnés d'argent (42), de substances hydrophiles (43) ou de substances antimicrobiennes (44) afin de lutter contre la formation du biofilm.

En cas d'infection liée au matériel implanté, l'ablation de ce dernier est recommandée, son maintien exposant à des risques d'échec thérapeutique (45). Par exemple, la Haute Autorité de Santé recommande pour la prise en charge d'une infection sur prothèse de hanche ou de genou dans le mois suivant l'implantation de réaliser un changement en un temps de la prothèse infectée (46).



Si l'état du patient contre-indique le retrait du matériel en place, d'autres stratégies peuvent être mises en place :

- L'antibiothérapie

L'intérêt de l'antibiothérapie est de ralentir la formation du biofilm, d'éliminer les bactéries planctoniques et de limiter l'activité des bactéries en surface (10). Dans des contextes d'infection sur matériel en orthopédie, l'utilisation d'antibiotiques pouvant pénétrer le biofilm, tels que la rifampicine, les fluoroquinolones est nécessaire. Le cotrimoxazole ou les glycopeptides pénètrent, eux, moins bien dans le biofilm (47,48).

- Eradication de la matrice extracellulaire

La matrice exopolysaccharidique est un élément indispensable au développement du biofilm bactérien. Comme nous l'avons vu précédemment, elle est composée en majorité d'eau, mais aussi de polysaccharides, de protéines associées à des lipides et des acides nucléiques. L'intérêt d'éradiquer cette matrice est de pouvoir, ensuite, exposer les micro-organismes, aux agents antimicrobiens.

En fonction de la composition de la matrice extracellulaire, différentes enzymes (protéases, cellulases, polysaccharide dépolymérases, alginate-lyases) semblent pouvoir être utilisées pour éradiquer cette matrice (45). Certains bactériophages, produisant des enzymes telles que la polysaccharide dépolymérase, ont montré une certaine efficacité sur la dégradation de la matrice extracellulaire (49).

- Eradication des bactéries persistantes

Cette stratégie consisterait à détruire les bactéries persistantes en profondeur du biofilm (45).

- Inhibition de la communication entre les bactéries : inhibition du quorum sensing

Le quorum sensing joue un rôle dans la communication des bactéries entre elles et dans la maturation du biofilm (44). Des molécules, comme les furanones (43) (analogues structuraux des homosérines lactones), interféreraient dans les voies de signalisation du

quorum sensing et ainsi perturberaient l'établissement du biofilm. En 2011, une étude a montré l'intérêt de l'utilisation de ces molécules en association avec des antibiotiques (50).

- Vaccin anti-biofilm

L'objectif de l'utilisation d'un vaccin anti-biofilm serait d'immuniser un patient contre certains antigènes bactériens exprimés lors de l'adhérence initiale (adhésines) ou dans le biofilm mature (polysaccharides de la matrice) afin d'empêcher le développement du biofilm.

- Les bactéries contenues dans un biofilm sont moins sensibles aux antibiotiques et à l'action du système immunitaire.
- Plusieurs stratégies existent afin de lutter contre ces structures complexes en thérapeutique.

### III. L'acné

#### 3-1. Epidémiologie

En France, on estime que 15 millions de personnes sont touchés par l'acné. Chez l'adolescent la prévalence se situe entre 70-80 % (51). L'âge de début de l'acné est légèrement plus précoce chez la jeune fille que chez le jeune homme (11 ans *versus* 12 ans) avec un pic dans les deux sexes aux alentours de 15-16 ans (51). L'acné modérée à sévère représente 20 % des acnés (51).

#### 3-2. Physiopathologie

L'acné est une dermatose inflammatoire chronique qui touche les glandes pilo-sébacées (52) et induit des lésions inflammatoires apparaissant principalement au niveau du dos, du visage, du cou, du tronc et des bras (53).

Le follicule pilo-sébacé est l'élément essentiel de l'acné. Cette cavité constituée d'un poil fin contenu dans un canal, s'enfonce dans le derme. De part et d'autre de cette invagination, on retrouve des glandes sébacées, contenant les sébocytes qui sécrètent le sébum (Figure 4).

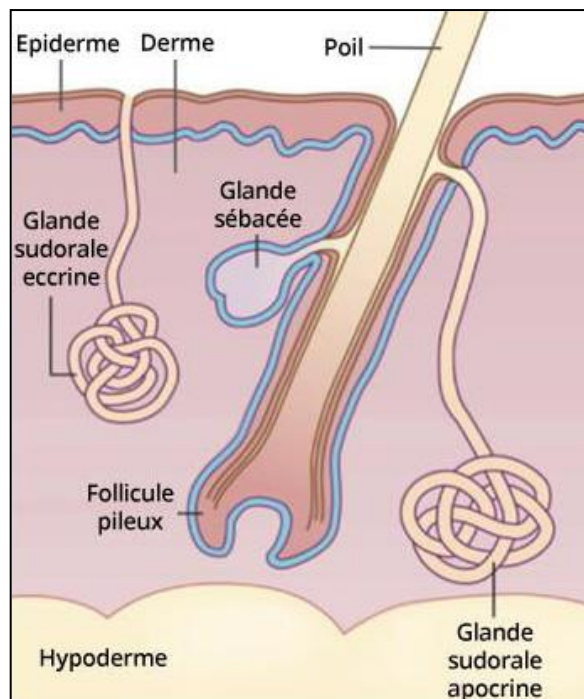


Figure 4 : Schéma représentatif du follicule pilo

Le sébum est constitué de lipides, en majorité des triglycérides, permettant de former un film hydrolipidique, protecteur pour la peau (Figure 5). Le sébum est déversé dans le canal excréteur (le canal infundibulaire) et s'écoule dans la couche cornée.

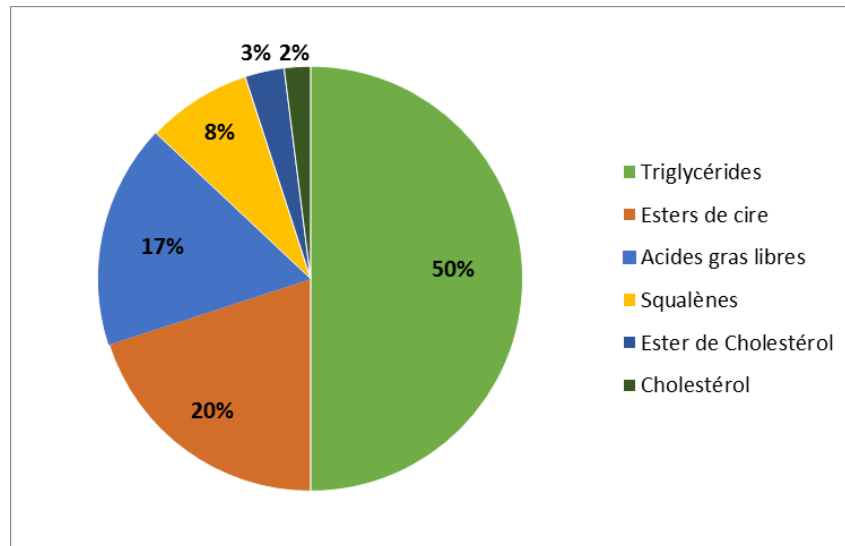


Figure 5 : Composition en lipides du sébum

Trois facteurs jouent un rôle clef dans le développement de l'acné : une hyperséborrhée, une kératinisation infundibulaire et une colonisation de la peau par *C. acnes* (anciennement *Propionibacterium acnes*) connue pour intervenir dans le développement et le maintien du processus inflammatoire local cutané (54).

### 3-2-1. L'hyperséborrhée

L'hyperséborrhée est la conséquence d'une production massive de sébum par les glandes sébacées, dont la composition peut également être modifiée (55).

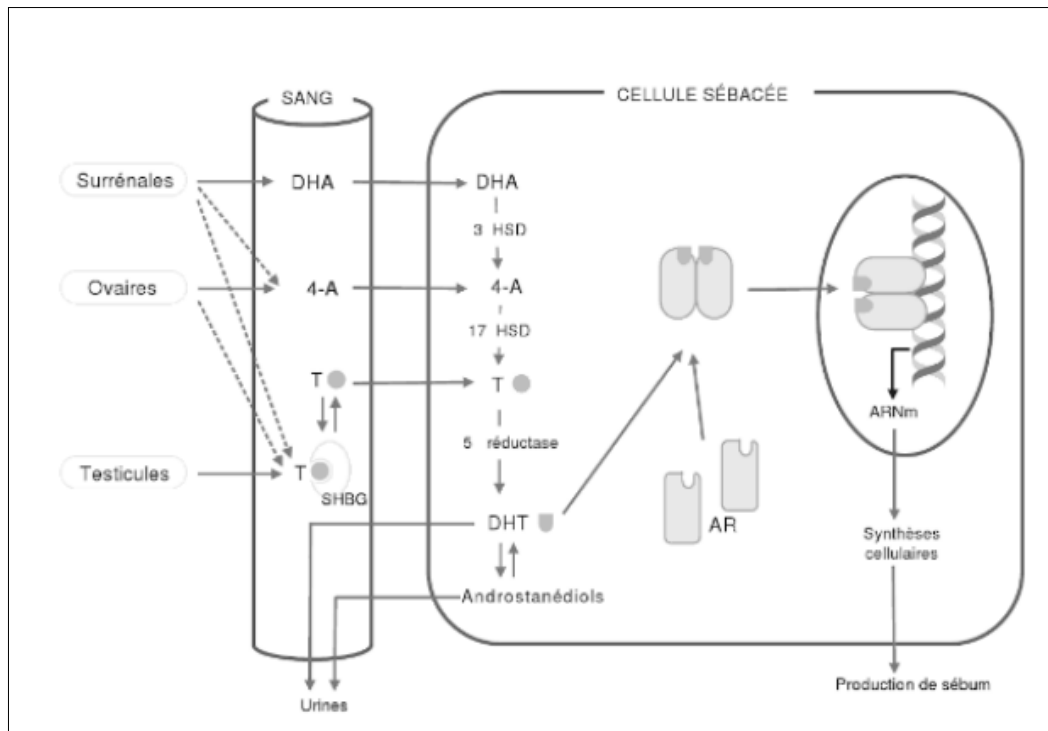
Les causes de cette production excessive de sébum sont multiples :

- Hyperandrogénie

Les hormones androgènes d'origine surrénalienne ou gonadique (la déhydroépiandrostérone, la delta 4 androstenedione ou la testostérone) sont transformées en hormone active, la dihydrotestostérone (DHT) au sein du sébocyte. La DHT se fixe à son récepteur cytosolique puis pénètre dans le noyau de la cellule sébacée et se lie

à un récepteur nucléaire au niveau du domaine ARE de l'ADN. La transcription de l'ADN en ARNm induit la synthèse de protéines et d'enzymes nécessaires à la production de sébum (56) (Figure 6).

Lors de la puberté, la synthèse d'androgènes augmentent induisant une hyperséborrhée physiologique (57).



**Figure 6 : Action des androgènes sur le sébocyte**

DHA = dihydroépiandrostérone ; 4-A = Δ4-A = Δ4-androstènedione ; T = testostérone ; DHT = dihydrotestostérone ; SHBG = Sex Hormone Binding Globulin ; 3HSD = 3βHSD = 3β-hydroxystéroïdédéshydrogénase ; 17HSD = 17βHSD = 17β-hydroxystéroïde-déshydrogénase ; 5-réductase = 5-α-réductase ; AR : récepteur aux androgènes

- Hypersensibilité des récepteurs cytosoliques aux androgènes

Chez les patients acnéiques, on observe une augmentation du nombre de récepteurs, notamment les récepteurs PPAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , au niveau de la glande sébacée. Les acides gras libres, les androgènes, l'acide linoléique peuvent se lier à ces récepteurs, qui se lient ensuite aux récepteurs RXR des rétinoïdes.

Ce complexe induit :

- Des modifications de la prolifération et de la différenciation des sébocytes ;
- Une stimulation de la lipogenèse ;
- La production d'Interleukine-1 (IL-1) et de Tumor Necrosis  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) par les glandes sébacées qui sont des médiateurs de la réaction inflammatoire.

- Modification de la composition du sébum

Une modification de la composition du sébum est observée chez les patients acnéiques avec une augmentation des cires, des squalènes, des acides gras saturés et une diminution du cholestérol et des acides gras insaturés. Ces modifications qualitatives du sébum conduisant à une inversion de la balance entre lipides pro-inflammatoires et lipides anti-inflammatoires (55).

- L'IGF-1 (insuline growth factor 1)

Ce facteur de croissance majeur de la puberté, produit par le foie, est stimulé par l'hormone de croissance (GH). Les connaissances actuelles montrent que l'IGF-1 :

- Active la prolifération locale des kératinocytes dans les cellules épithéliales et les sébocytes (58–62) ;
- Favorise la synthèse des hormones androgènes en stimulant les ovaires et les testicules ;
- Favorise la lipogenèse *via* l'activation de la voie IGF-1/ PI-3K/ AKT en augmentant la quantité de triglycérides produits (63).

L'IGF-1 induit donc une perturbation de l'équilibre et de la composition du sébum et favoriserait la comédogénèse.

- Neurohormones et neuropeptides

En 2003, Chiu *et al.*, (64) suggèrent un lien entre stress et acné. Chez 19 étudiants en situation de stress liée aux examens, les auteurs montrent qu'ils présentent une exacerbation des lésions d'acné. Plusieurs hormones sont libérées en situation de stress notamment la CRH (Corticotropine Releasing Hormone) et la substance P.

#### La CRH

Cette hormone est libérée par les neurones hypothalamiques en situation de stress. En 2009, Isard *et al.*, (65) ont montré que *C. acnes* stimulait la production de CRH par les kératinocytes.

Cette hormone induit :

- La lipogenèse en augmentant l'expression de la 3 $\beta$ -HSD (hydroxy-steroid deshydrogenase), enzyme responsable de la synthèse des androgènes ;
- Un effet pro-inflammatoire en stimulant la synthèse d'IL-6 et d'IL-8 par les sébocytes.

#### La substance P

Ce neuropeptide est relargué dans les fibres nerveuses du derme en situation de stress. Sa libération induit une réponse pro-inflammatoire au niveau cutané. Au sein des glandes sébacées, la substance P stimule la prolifération des sébocytes et la production de sébum (66). En 2002, une étude a montré que les fibres nerveuses des peaux acnéiques contenaient plus de substance P que les peaux saines (67). Actuellement, une étude est menée dans l'unité de recherche U1232 équipe 2, afin d'évaluer l'effet de la substance P sur la production de biofilm par deux bactéries de l'acné : *C. acnes* et *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*).

### **3-2-2. L'hyperkératinisation**

La kératinisation infundibulaire est due à des anomalies de la prolifération et de la différenciation kératinocytaire au niveau du canal infundibulaire. Ce phénomène provoque :

- Une hyperprolifération des kératinocytes au niveau du canal infundibulaire ;
- Une augmentation de leur adhérence ;
- Une diminution de leur desquamation physiologique.

Ainsi, le sébum produit s'écoule moins bien par le canal infundibulaire. Cette rétention du sébum conduit à la formation de comédons (68).

### **3-2-3. Colonisation de la peau par *C. acnes***

Le rôle essentiel de *C. acnes* dans le développement et le maintien de l'acné sera développé largement dans le paragraphe 4-4.

## **3-3. Aspects cliniques**

### **3-3-1. Scores d'évaluation de l'acné**

L'évaluation de l'acné prend en compte deux types de mesures :

- La mesure de l'impact de l'acné sur la qualité de vie : score Skindex 16, Cardiff acne disability index (69) ;
- La mesure de l'activité de la maladie : score ECLA (décompte par type de lésions sur le visage) (70), échelle GEA (échelle d'évaluation globale de l'acné) (71).

La Haute Autorité de Santé (HAS), recommande, à ce jour, d'utiliser l'échelle Global Acne Evaluation (GEA) comme outil d'évaluation de l'acné (Figure 7, page 33) (72).



0	Pas de lésion	Une pigmentation résiduelle et un érythème peuvent être présents	
1	Pratiquement pas de lésion	Rares comédons ouverts ou fermés dispersés et rares papules	
2	Légère	Facilement identifiable ; moins de la moitié du visage est atteinte Quelques comédons ouverts ou fermés, et quelques papulo-pustules	
3	Moyenne	Plus de la moitié de la surface du visage est atteinte Nombreuses papulopustules Nombreux comédons ouverts ou fermés	
4	Sévère	Tout le visage est atteint, couvert de nombreuses papulo-pustules, comédons ouverts ou fermés et rares nodules	
5	Très sévère	Acné très inflammatoire recouvrant le visage avec des nodules	

Figure 7 : Echelle GEA évaluant le degré de sévérité de l'acné (Dréno *et al.*, 2011)

### 3-3-2. Facteurs associés à la sévérité de l'acné

En 2007, plusieurs études cliniques ont montré qu'un antécédent familial d'acné au premier degré était associé à une fréquence plus importante d'apparition de l'acné, à un début plus précoce, à une résistance et à une rechute après un traitement par isotrétinoïde (73).

Le rôle de l'alimentation comme facteur associé à l'acné est parfois décrit, cependant aucune étude clinique n'a pu montrer un réel lien (74).

Les relations entre stress/acné et facteurs hormonaux/acné sont établies, comme nous avons pu le démontrer ci-dessus. En effet le stress et les facteurs hormonaux induisent une hyperséborrhée qui est un des facteurs clef de l'acné. Enfin, les épisodes de poussées menstruelles, la cigarette chez la femme et une alimentation sucrée seraient également corrélés à des acnés plus sévères (51).

### 3-3-3. Formes cliniques de d'acné

- Acné polymorphe juvénile (75) ou acné vulgaire. Elle touche 70 à 80 % des adolescents (57). Il s'agit d'une dermatose bénigne, mais inesthétique, qui commence par quelques lésions rétentionnelles (comédons fermés ou ouverts) avant la puberté et se termine avant 20 ans. Elle touche principalement le visage et est

habituellement mixte rétentionnelle et inflammatoire (papules rouges, pustules, nodules).

- Acné de l'adulte (75)
  - Chez la femme, il s'agit d'une acné le plus souvent à prédominance inflammatoire, située sur les régions mandibulaires et le menton, avec des poussées prémenstruelles.
  - Chez l'homme, il s'agit d'une acné inflammatoire papulo-nodulaire prédominant sur le dos.
- Acné du nouveau-né, du nourrisson et de l'enfant (76). L'acné du nouveau-né est fréquente (20 %) probablement due au fonctionnement de l'axe gonadotrope. Elle se présente sous la forme de comédons fermés des joues et plus rarement de lésions inflammatoires, associés à une hyperséborrhée. Elle est souvent modérée et disparaît en un à trois mois. L'acné du nourrisson et de l'enfant est plus rare et est associée souvent à une pathologie hormonale.
- Formes modérées à sévères (77) qui représentent 20 % des patients atteints d'acné (78)
  - *Acné nodulaire* (anciennement nodulo-kystique) est une atteinte d'évolution cicatricielle. Elle touche surtout les hommes de 18-30 ans. Les localisations préférentielles sont le visage, le cou, le tronc parfois les fesses et les racines des membres. Cette acné est définie par l'existence de comédons multiporaux, des lésions rétentionnelles et inflammatoires et des nodules qui peuvent s'abcéder.
  - *Acné conglobata* est une acné nodulaire suppurative chronique, d'apparition grave d'emblée. Cette acné associe des nodules (multiples, volumineux, douloureux pouvant fistuliser), des comédons multipores et des tunnels suppuratifs (79).
  - *Acné fulminans* est la forme la plus grave de l'acné. Elle touche principalement les adolescents de sexe masculin. Le tableau clinique est d'apparition brutale

avec des lésions inflammatoires, douloureuses qui peuvent se fistuliser et être ulcéro-nécrotiques. En plus des lésions cutanées, cette forme s'accompagne de signes généraux, notamment d'une hyperthermie, d'une altération de l'état général et d'arthralgies.

#### 3-4. Traitement de l'acné

L'algorithme thérapeutique de l'acné, publié par la Société Française de Dermatologie, se base sur l'échelle GEA (Figure 10, page 40). Selon les indications, les antibiotiques sont utilisés, soit par voie topique, soit par voie générale. L'intérêt d'utiliser des antibiotiques est de réduire la quantité de *C. acnes* afin de diminuer l'inflammation, la lipogenèse et la comédogenèse.

##### **3-4-1. Les antibiotiques par voie topique**

Les antibiotiques par voie topique sont l'érythromycine et la clindamycine utilisés en gel ou en solution.

L'érythromycine est un macrolide naturel, à 14 chaînons. Cet antibiotique se fixe à la sous-unité 50S du ribosome bactérien (au niveau du domaine V de l'ARNr 23S), entraînant un blocage de la sortie du polypeptide, une libération prématurée du peptidyl-ARNt et une inhibition de la translocation du ribosome. Cette famille d'antibiotique inhibe ainsi la synthèse protéique.

La clindamycine est un antibiotique obtenu par hémisynthèse, de la famille des lincosamides. Son mécanisme d'action est similaire à celui des macrolides.

L'utilisation de ces antibiotiques par voie locale est réservée aux formes inflammatoires papulo-pustuleuses de l'acné légère polymorphe juvénile (Grade 2 de l'échelle GEA) en cas d'échec du traitement d'attaque (80). Ils sont administrés en association avec un rétinoïde local ou l'acide azélaïque, afin de limiter la sélection de bactéries résistantes (81).

##### **3-4-2. Les antibiotiques par voie générale**

Selon les recommandations, la doxycycline et la lymécycline peuvent être utilisées par voie systémique. L'érythromycine orale peut aussi être prescrite mais compte tenu du faible

niveau de preuve de son efficacité, sa prescription est réservée à des situations exceptionnelles (80).

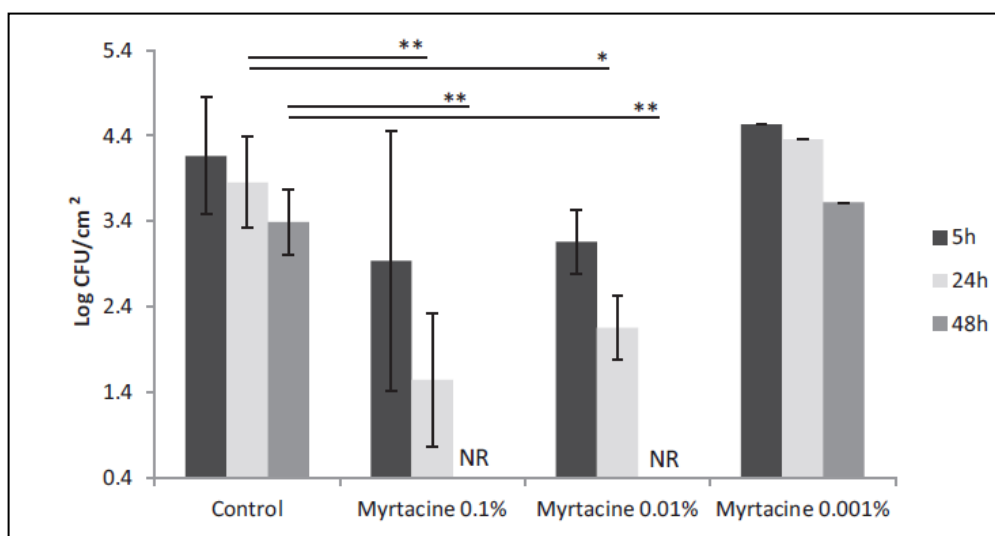
La doxycycline et la lymécycline appartiennent à la famille des tétracyclines et inhibent la synthèse protéique en se fixant sur l'ARNr 16S de la sous unité 30S du ribosome bactérien. Les tétracyclines interagissent avec les hélices 31, 34, et 44 qui sont les sites de liaison de l'ARNt. Ainsi, par encombrement stérique, elles empêchent la liaison de l'aminoacyl-ARNt sur le complexe ARNm-ribosome. Ces molécules interfèrent aussi avec les systèmes enzymatiques de la bactérie par un mécanisme de complexation ionique. (82)

Les antibiotiques par voie systémique, sont utilisés en deuxième intention après échec du traitement d'attaque dans les acnés dites légères (Grade 2 de l'échelle GEA), et sont prescrits dans les acnés moyennes (Grade 3 de l'échelle GEA) à sévères (Grade 4 de l'échelle GEA) comme traitement d'attaque (80). Ces molécules doivent être combinées à un traitement local associant le peroxyde de benzoyle et un rétinoïde local (83).

#### **3-4-3. Substance anti-biofilm : la Myrtacine®**

Avec l'augmentation des résistances aux antibiotiques de *C. acnes*, de nouvelles approches thérapeutiques ont été étudiées.

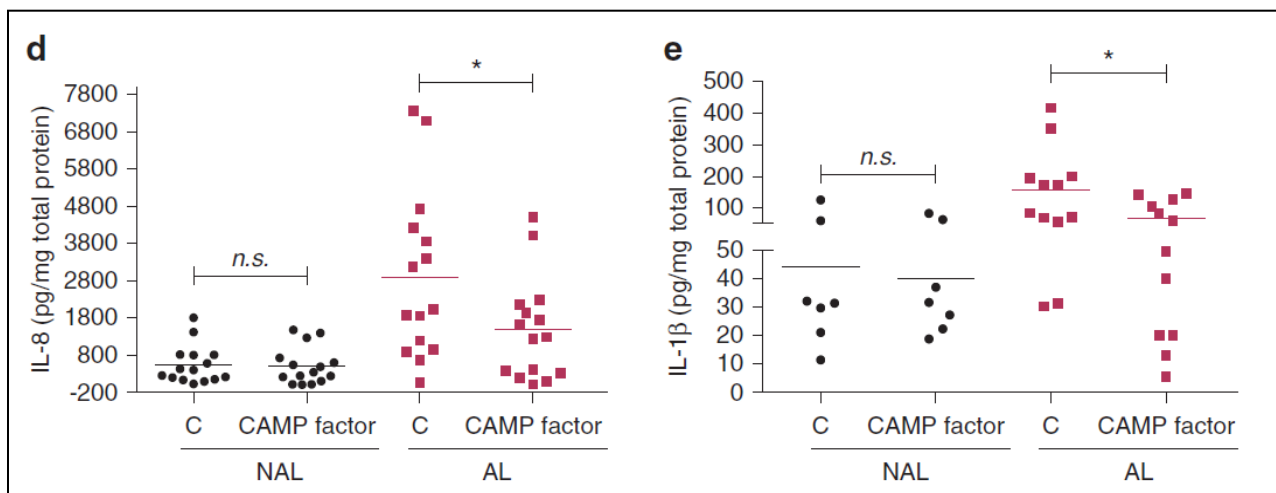
Une nouvelle molécule l'isopropyl acetate extraite de feuilles de *Myrtus communis* (Myrtacine®) a été étudiée pour son activité anti-biofilm sur des souches de *C. acnes*. Dans une étude publiée en 2016, Feuillolay *et al.*, ont montré, *in vitro*, que cette molécule diminuait la formation du biofilm de *C. acnes* (Figure 8, page 37) et avait un effet significatif sur le biofilm mature après seulement 5 minutes de contact. De plus, les auteurs ont montré que l'effet anti-biofilm de cette molécule était amplifié lorsqu'elle était associée aux antibiotiques (érythromycine et clindamycine) (84).



**Figure 8 : Evaluation du nombre de cellules adhérentes (log CFU/cm<sup>2</sup> ; n = 2 ; moyenne ±SD) de *C. acnes* à différents temps (5 h, 24 h et 48 h) après ajout de différentes concentrations de Myrtacine® (0,1 %, 0,01 % et 0,001 %) (Feuillolay *et al.*, 2016)**

#### **3-4-4. Vers un vaccin contre l'acné ?**

En 2018, Wang *et al.*, (85) ont montré le rôle essentiel du facteur CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson facteur) de *C. acnes* dans la réponse inflammatoire de l'acné. Dans leur publication, les auteurs ont montré qu'en vaccinant des souris avec ce facteur de virulence cela réduisait la croissance de cette bactérie et la production d'une cytokine pro-inflammatoire MIP-2 (homologue murin de l'IL-8). Ces résultats ont été retrouvés *ex vivo*, lorsque les auteurs ont co-cultivé des explants de peau de patients acnéiques avec des anticorps monoclonaux ciblant le facteur CAMP. Les taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et IL-1β) étaient significativement plus bas lorsque les explants étaient co-cultivés avec des anticorps monoclonaux ciblant le facteur CAMP (Figure 9, page 38).



**Figure 9 : Effet d'un anticorps monoclonal ciblant le facteur CAMP de *C. acnes* sur le taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et IL-1β) (Wang *et al.*, 2018)**

(d) Des explants de peau, isolés de patient non acnéique (NAL), ont été séparés en deux morceaux égaux. Le premier morceau a été incubé avec un anticorps monoclonal (IgG1) ciblant le facteur CAMP de *C. acnes* durant 24h (« CAMP factor »). La deuxième partie est incubée avec un anticorps monoclonal (AgHBs) servant de control (« C »). Le taux de la cytokine pro-inflammatoire IL-8 a été quantifié par une mesure de type ELISA. Cette expérience a été renouvelée avec des explants de peau isolés de patients acnéiques (AL).

(e) Le protocole de la figure (d) a été refait mais en mesurant cette fois-ci de taux de la cytokine pro-inflammatoire IL-1β par une technique ELISA.

D'autres auteurs ont souligné l'intérêt de ce facteur CAMP comme cible potentielle pour un futur vaccin contre l'acné (86). Ce facteur de virulence étant sécrété, une vaccination ciblant le facteur CAMP présente moins de risque de perturber l'écosystème de la peau (87).

- L'acné est une dermatose inflammatoire chronique qui touche les glandes pilo-sébacées et induit des lésions inflammatoires.
- Trois facteurs jouent un rôle clef dans le développement de l'acné : une hyperséborrhée, une kératinisation infundibulaire et une colonisation par *C. acnes* connue pour intervenir dans le développement et le maintien du processus inflammatoire local cutané.
- L'algorithme thérapeutique de l'acné, publié par la Société Française de Dermatologie, se base sur l'échelle GEA. Selon le critère de gravité, les antibiotiques peuvent être utilisés soit par voie topique, soit par voie générale.
- La Myrtacine® semble être une molécule intéressante pour son activité anti-biofilm sur les souches de *C. acnes*.

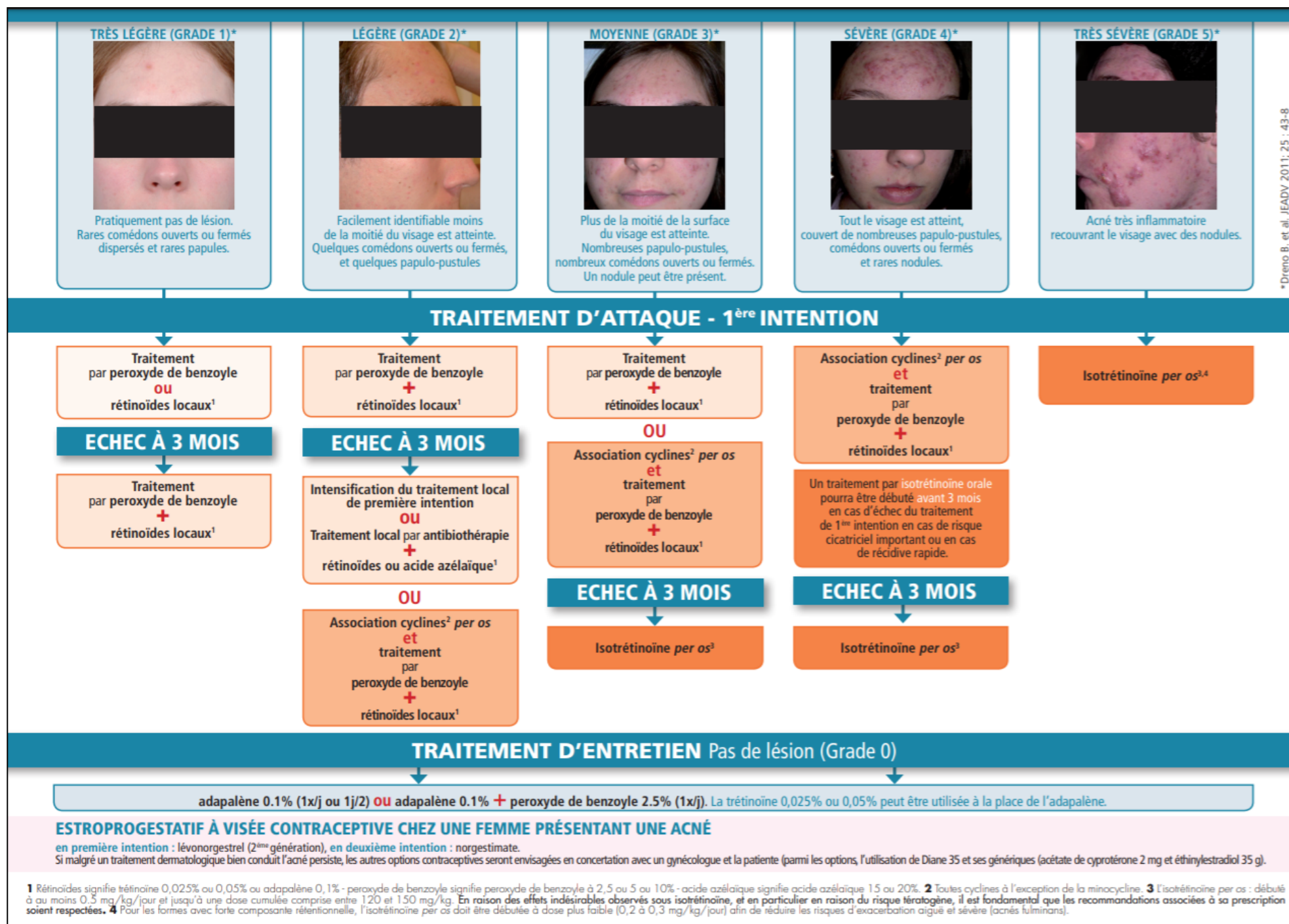


Figure 10 : Recommandations de la prise en charge de l'acné, Société Française de Dermatologie, 2015



#### IV. *Cutibacterium acnes*

*C. acnes* a été isolé pour la première fois, il y a plus de cent ans, chez un patient souffrant d'une maladie cutanée chronique (88). Cette bactérie a connu une errance taxonomique, classée parmi les *Bacillus* par Gilchrist en 1900 puis parmi les *Corynebacterium* par Ebersson en 1918 (89). En 1946, Douglas et Gunter (90) ont montré que cette espèce bactérienne était plus proche du genre *Propionibacterium* puisqu'elle fermente le lactose en acide propionique en atmosphère anaérobie (88,89).

##### 4-1. Taxonomie et phylogénie de *C. acnes*

En 1909, Orla Jensen (88) décrit le genre *Propionibacterium* appartenant à la classe des *Actinobacteria* et à l'ordre des *Propionibacteriales* (51,89,90) constitué d'espèces qui produisent de l'acide propionique lors de la fermentation.

Au sein de ce genre, les espèces sont classiquement séparées en « Propionibactéries dites classiques » et en « Propionibactéries dites cutanées » (94). Dans le groupe « Propionibactéries dites classiques » on retrouve les espèces isolées de produits laitiers, notamment *Propionibacterium freudenreichii* dont la concentration est importante dans les fromages suisses (95).

En 2016, Scholz et Kilian (94) ont établi, sur la base d'analyses génomiques (ARNr 16S et core génome), un nouvel arbre phylogénétique. Les auteurs ont proposé de reclasser les espèces de l'ancien genre *Propionibacterium* en quatre genres distincts (96) (Figure 11, page 42) :

- *Acidipropionibacterium* gen. nov. *A. jensenii*, *A. thoenii*, *A. acidipropionici*, *A. microaerophilum*, *A. damnosum* et *A. olivae*
- *Cutibacterium* gen. nov. *C. acnes*, *C. avidum*, *C. granulorum*, *C. namnetense* et *C. humerusii*
- *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *P. propionicum*
- *Propionibacterium* : *P. freudenreichii*, *P. cyclohexanicum*, *P. acidifaciens* et *P. australiense*

*C. acnes* a d'abord été divisé en trois groupes phylogénétiques : IA, IB et II (97), puis en quatre groupes : IA, IB, II et III (98), puis en cinq groupes : IA, IB, IC, II et III (99), et enfin en six groupes : IA<sub>1</sub>, IA<sub>2</sub>, IB, IC, II et III en fonction des techniques utilisées (100).

Dekio *et al.*, ont proposé en 2015 que chaque phylotype de *C. acnes* correspondent à une sous espèces. Ainsi, les phylotypes I et II correspondent à *C. acnes* subsp. *acnes* et le phylotype III à *C. acnes* subsp. *elongatum* (101).

En 2016, McDowell *et al.*, ont proposé de renommer les phylotypes I et II respectivement en *C. acnes* subsp. *acnes* et *C. acnes* subsp. *defendens* sur la base de différences phylogénétiques mais aussi sur le pourcentage d'hybridation ADN-ADN inférieur à 80 % (102).

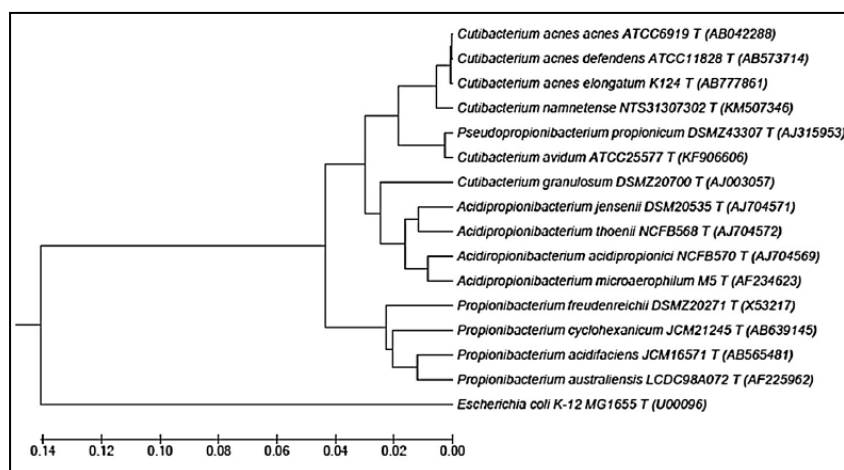
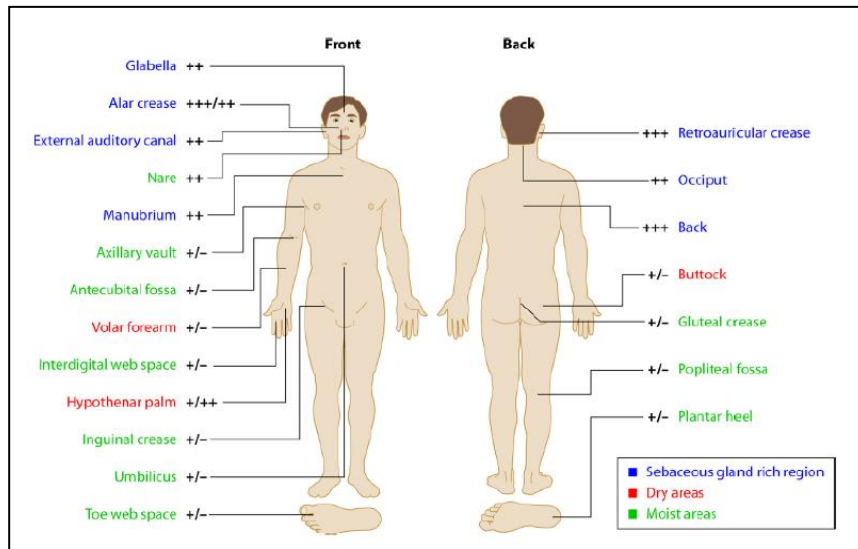


Figure 11 : Arbre phylogénétique suite à l'analyse de 16 séquences nucléotidiques de 1173pb du gène codant pour l'ARNr 16S de différents *Propionibacteriaceae* (Corvec *et al.*, 2019)

#### 4-2. Niche écologique et caractéristiques bactériologiques de *C. acnes*

##### 4-2-1. **Habitat**

*C. acnes* est une bactérie de la flore commensale cutanée. Elle colonise les follicules pileux et les glandes sébacées. Elle peut également être présente sur les muqueuses de la bouche, du nez, du tractus urogénital et du gros intestin (103) (Figure 12, page 43).



**Figure 12 : Abondance cutanée relative des espèces de *Cutibacterium* (Achermann et al., 2014)**

En 2009, Grice *et al.* , étudient la composition du microbiome cutané de dix patients par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S (104). Trois genres bactériens étaient plus fréquemment retrouvés : les proprionibactéries (23 %), les corynébactéries (22,8 %) et les staphylocoques (16,8 %). Les proprionibactéries étaient majoritaires au niveau des sites riches en glandes sébacées (visage, cuir chevelu, poitrine, dos), mais aussi au niveau de zones cutanées sèches et humides comme les fesses, l'avant-bras, l'intérieur du coude et le nombril (103) (Figure 13 page 44).

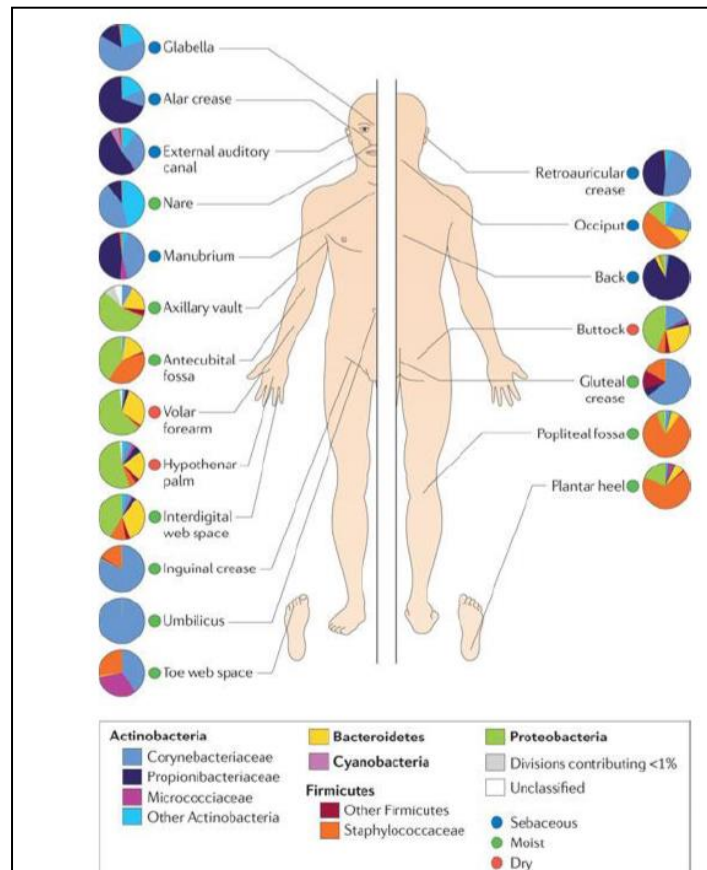


Figure 13 : Distribution des bactéries selon le site cutané (Grice *et al.*, 2011)

#### 4-2-2. Caractères morphologiques, biochimiques et cultureux

*C. acnes* est un bacille à Gram positif anaérobie préférentiel, mesurant de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 1 à 5  $\mu\text{m}$  de long. Ce bacille immobile est non sporulé. Des formes coccoïdes, bifides ou ramifiées peuvent être parfois observées (Figure 14).

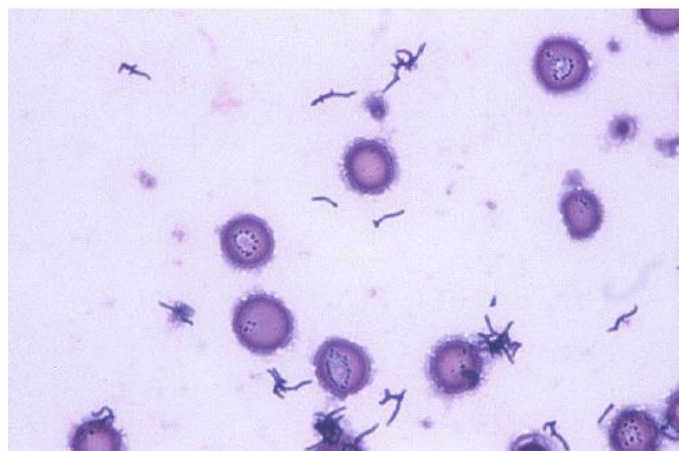


Figure 14 : *Cutibacterium acnes* (coloration de Gram)

*C. acnes* produit de l'acide lactique, de l'acide propionique et de l'acide acétique à partir du glucose. Cette bactérie est catalase positive (à la différence des autres bacilles à Gram positif anaérobies à l'exception des *Actinomyces*), et réduit les nitrates en nitrites. Dans 70 % des cas (54), *C. acnes* est indole positif permettant ainsi de le différencier de *C. avidum* et *C. granulosum* qui sont indole négatif (Tableau 2).

**Tableau 2 : Caractéristiques phénotypiques permettant de différencier les différentes espèces du genre *Cutibacterium* (Aubin et al., 2016b)**

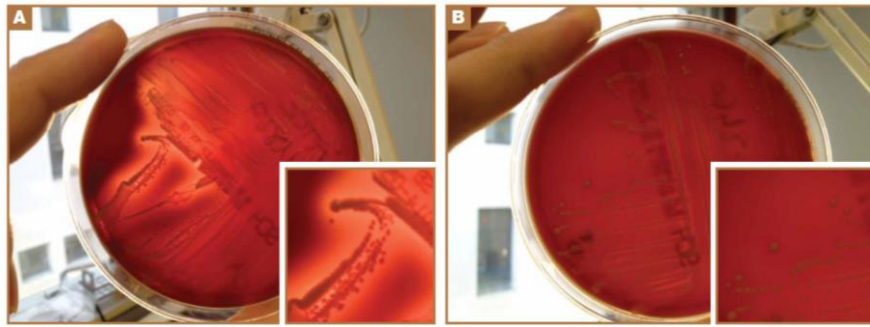
Bactéries	Acidification		Hydrolyse de l'esculine	Production d'indole	Réduction des nitrates	Hydrolyse de la gélatine	Hémolyse
	Sucrose	Maltose					
<i>C. acnes</i>	-	-	-	+	+	+	d
<i>C. avidum</i>	+	+	+	-	-	+	+
<i>C. granulosum</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. freudenreichii</i>	-	-	+	-	d	-	-
<i>A. jensenii</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>A. thoenii</i>	+	+	+	-	-	-	+
<i>A. acidipropionici</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>A. lymphophilum</i>	d	+	-	-	d	-	-

+ : 90 % ou plus de souches positives ; - : 90 % ou plus de souches négatives ; d : 11-89 % de souches positives.

La culture de *C. acnes* peut se faire sur différents milieux, qu'ils soient solides (gélose au sang, Schaedler, sang cuit, Brucella) ou liquide (BHI ou flacon d'hémoculture) en atmosphère anaérobie ou en microaérophilie (54).

Cette bactérie est un germe à croissance lente (comparée aux autres bactéries anaérobies strictes) avec un temps de division d'environ 5 heures (105). La température de croissance idéale se situe entre 30-37°C et le pH optimal est entre 6,0-7,0 (54).

Après 72h d'incubation sur gélose au sang, les colonies de *C. acnes* mesurent entre 1-2 mm de diamètre, sont brillantes, circulaires, opaques et jaunâtres. Une  $\beta$ -hémolyse sur gélose Schaedler (SCH) est observée avec les souches de *C. acnes* appartenant au phylotype I (IA<sub>1</sub>, IA<sub>2</sub>, IB) (102,106) contrairement aux isolats des phylotypes II et III (Figure 15, page 46).



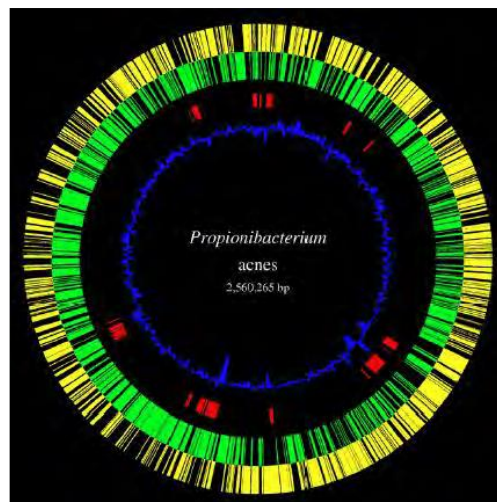
**Figure 15 : Pouvoir hémolytique de *C. acnes* sur gélose SCH en fonction de son phylotype (Corvec *et al.*, 2015)**

- (A) Souche de *C. acnes* phylotype IA<sub>1</sub>
- (B) Souche de *C. acnes* phylotype II

#### 4-3. Pouvoir pathogène

En 2004, le premier isolat de *C. acnes* (KPA 171202, souche de phylotype IB isolée sur la peau) a été séquencé (107).

Le génome de *C. acnes*, est constitué d'un seul chromosome circulaire codant pour 2333 gènes potentiels (107) (Figure 16).



**Figure 16 : Carte génétique du chromosome de *C. acnes* (Brüggemann *et al.*, 2005)**

En vert et jaune : séquences codantes, En rouge : îlots génomiques

#### **4-3-1. Facteurs de virulence**

Le séquençage de ce micro-organisme en 2004 (107), a permis de rapporter la présence de multiples facteurs de virulence chez cette bactérie (108).

Certains facteurs de virulence identifiés, sont impliqués dans l'adhérence ou l'interaction avec le tissu hôte : PPA 1983, PPA 1906, GroEL, DnaK, DnaJ et GrpE (108).

D'autres facteurs, sont des enzymes permettant la dégradation du tissu de l'hôte comme les lipases, les estérases, la hyaluronate lyase (dégradation de l'acide hyaluronique), des endoglycérinidases, des sialidases et diverses peptidases extracellulaires (109).

En 2005, Brüggemann *et al.*, (108) ont suggéré la présence de cinq gènes ayant environ 32 % d'homologie avec le facteur CAMP de *Streptococcus agalactiae*. Ces facteurs CAMPs seraient exprimés à la surface de la bactérie mais aussi sécrétés dans le milieu extérieur comme une exotoxine (110,111). Le facteur CAMP1 interagirait avec les Toll-like receptor-2 (TLR2), induisant une augmentation d'IL-8 (cytokine pro-inflammatoire). Le facteur CAMP1 serait donc impliqué dans la réponse inflammatoire (112). Les facteurs CAMPs, particulièrement le facteur CAMP2, possèdent une activité hémolytique lorsqu'ils sont associés à la shingomyélinase de l'hôte. Cette activité hémolytique aurait un effet cytotoxique sur les kératinocytes humains et les macrophages, et contribuerait ainsi à l'envahissement cellulaire (111) (Figure 17, page 48 (113)) .

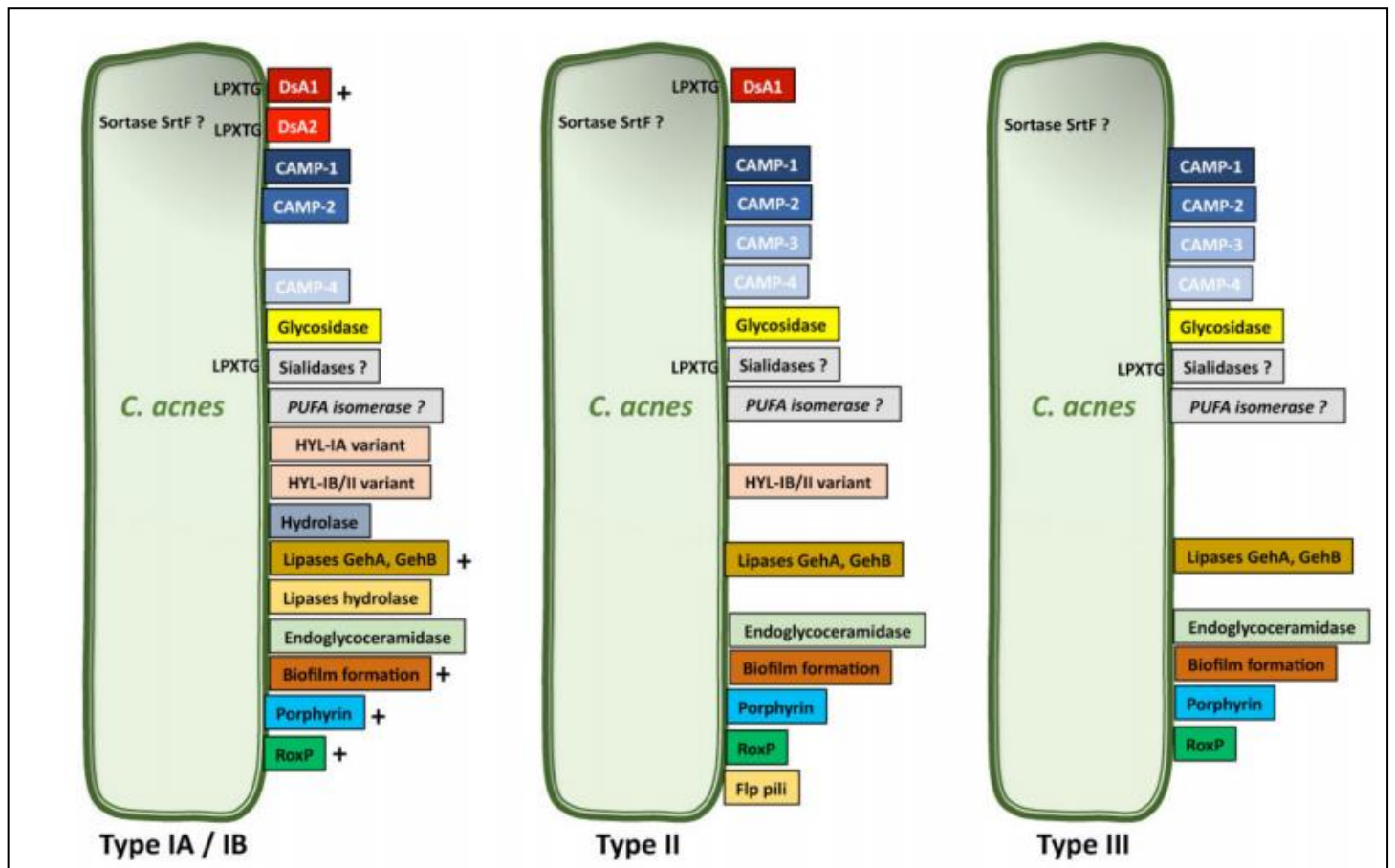


Figure 17 : Facteurs de virulence de *C. acnes* (d'après Mayslich *et al.*, 2021)

Représentation non exhaustive des protéines sécrétées et/ou ancrées dans la paroi cellulaire. HYL correspond à la hyaluronate lyase. Le variant HYL-IB/II présente un niveau d'activité élevé et le variant HYL-IA un niveau d'activité plus faible. LPXTG correspond à la séquence peptidique reconnue par la sortase. (+) correspond à une expression forte (?) correspond à une présence dans le phylotype pas encore déterminée.



#### 4-3-2. Capacité à former un biofilm

Outre les facteurs de virulence, d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse du biofilm sont retrouvés dans le génome de cette bactérie (glycoltransferase, uridine diphosphate-N-acétylglucosamine 2-épimérase et des protéines nécessaires à la biosynthèse des polysaccharides) (107,114) .

*C. acnes* est un pathogène opportuniste. Il est notamment responsable d'infections chroniques ostéo-articulaires suite à la pose de prothèses grâce à sa capacité à former du biofilm (115). Lors d'une dépose de prothèse de hanche infectée, Tunney *et al.*, ont montré *ex-vivo* par microscopie confocale, la présence d'agrégats de cellules de *C. acnes* englués en biofilm et attachés à la prothèse (116).

Cette bactérie est capable de former du biofilm aussi bien *in vitro* sur différents types de surfaces (plaques 96 puits (15,117) (Figure 18), billes de verre (118,119) (Figure 19), titane, acier ou silicone (91,120,121) (Figure 20, page 50)) qu'*in vivo* (116).



Figure 18 : Microscopie électronique à balayage d'un biofilm d'isolat de *C. acnes* (souche AD49, phylotype II) formé sur du plastique (Holmberg *et al.*, 2009)

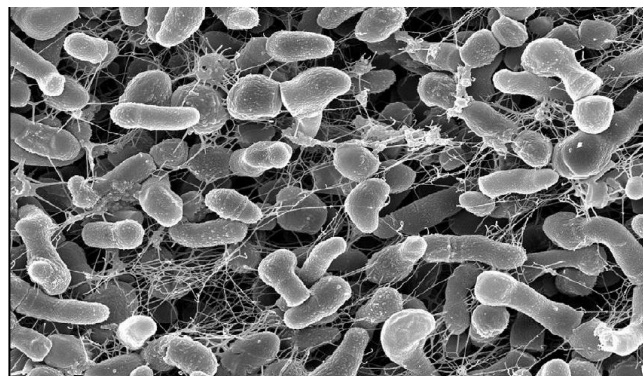
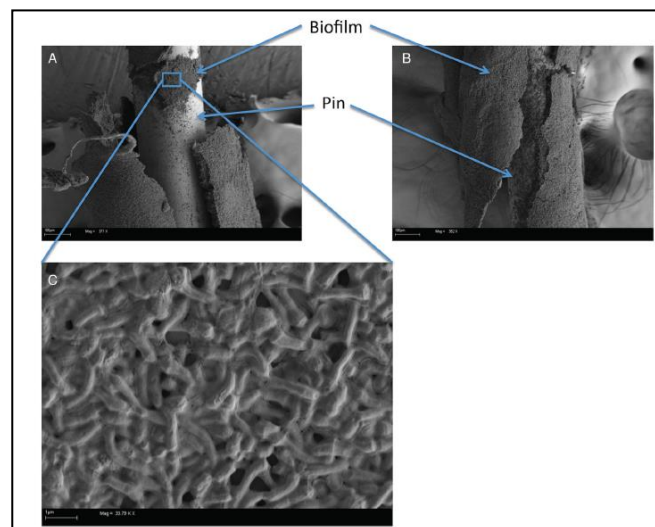


Figure 19 : Microscopie électronique du biofilm formé par la souche de *C. acnes* KPA171202, phylotype IB sur une bille de verre (Jahns *et al.*, 2016).



**Figure 20 : Biofilm formé par la souche de *C. acnes* ATCC11827 (phylotype IA<sub>1</sub>), par microscopie électronique, sur une tige d'acier inoxydable (Achermann *et al.*, 2014).**

*In vitro*, une souche de *C. acnes* forme un biofilm précoce puis mature entre 18 et 96 heures en fonction de la technique utilisée. Différents facteurs peuvent influencer la capacité à produire du biofilm de *C. acnes* : le milieu de culture utilisé, l'inoculum de départ (117,122,123), la présence de plasma (117), la rugosité de la surface du biomatériaux (122).

Dans une étude patients acnéiques *versus* patients sains publiée en 2012, Jahns *et al.*, se sont intéressés à la capacité de *C. acnes* à former du biofilm (124). Par des techniques d'immunofluorescence, les auteurs ont montré que *C. acnes* pouvait former des macrocolonies composées d'au moins 1000 cellules bactériennes, pouvant, selon les critères de Parsek et Singh (121), être considérées comme du biofilm. Les auteurs ont montré que chez 14 des 38 patients acnéiques, soit 37 % des patients acnéiques de l'étude, *C. acnes* est présent dans le follicule pilo-sébacé sous forme de macrocolonies/biofilm. Alors que seulement 5 des 38 patients sains, soit 13 % des patients sains présentaient du *C. acnes* sous forme de macrocolonies (Figure 21, page 51).

Ainsi, les auteurs suggèrent que cette bactérie peut former du biofilm au sein des follicules pilosébacés, lui permettant de se protéger vis-à-vis du système immunitaire mais aussi des antibiotiques. De plus, les auteurs suggèrent que la production de biofilm est plus importante chez les patients acnéiques que chez les patients sains.

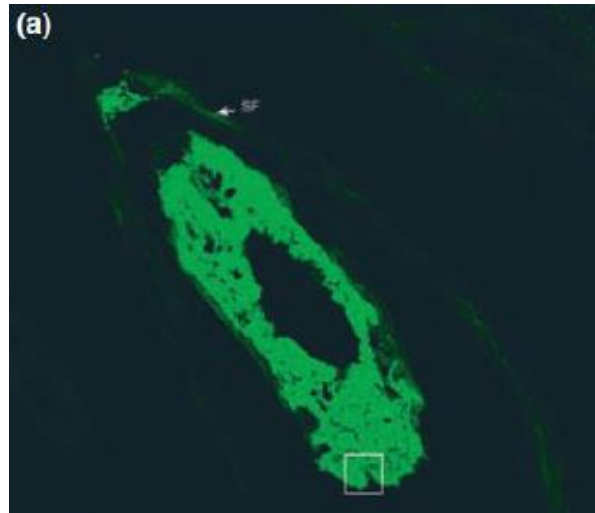


Figure 21 : *C. acnes* sous forme de macrocolonie (Jahns *et al.*, 2012)

#### 4-4. Rôle de *C. acnes* dans l'acné

##### 4-4-1. ***C. acnes* et inflammation**

La colonisation du follicule pilo-sébacé par *C. acnes* entraîne une libération de différents enzymes, mais aussi une stimulation de la réponse immunitaire innée *via* les TLRs et le récepteur CD36 (125). Toutes ces interactions participent à l'induction de l'inflammation au niveau du follicule pilo-sébacé par *C. acnes* (Figure 24, page 56).

- Rôle des enzymes

*C. acnes* sécrètent différentes enzymes tels que des lipases, des hyaluronidases et des protéases (109).

Les lipases, dont celle codée par le gène *gehA*, hydrolysent les triglycérides (composant majoritaire du sébum) en glycérol et en acides gras (113). Ces derniers ont une activité pro-inflammatoire mais sont aussi de puissants attractants pour les polynucléaires neutrophiles (PNN).

Les hyaluronidases hydrolysent l'acide hyaluronique de la matrice extracellulaire, et les protéases dégradent la kératine. Ces deux enzymes favorisent la dégradation de la matrice extracellulaire et le détachement des kératinocytes, entraînant ainsi la libération de médiateurs inflammatoires (113).

- Rôle de l'immunité innée

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires de l'immunité innée. Les TLRs reconnaissent les *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs), qui sont des motifs moléculaires associés à des pathogènes tels que les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes ou les acides lipoteichoïques des bactéries (126).

L'activation des récepteurs TLRs entraînent une cascade de signalisation intracellulaire, aboutissant à l'activation de deux voies de signalisation, la voie du Nuclear Factor-KappaB (NFκB) et celle des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK). Ces deux voies concourent à la synthèse de gènes pro-inflammatoires, codant pour des cytokines et des métalloprotéinases matricielles (127,128) (Figure 22).

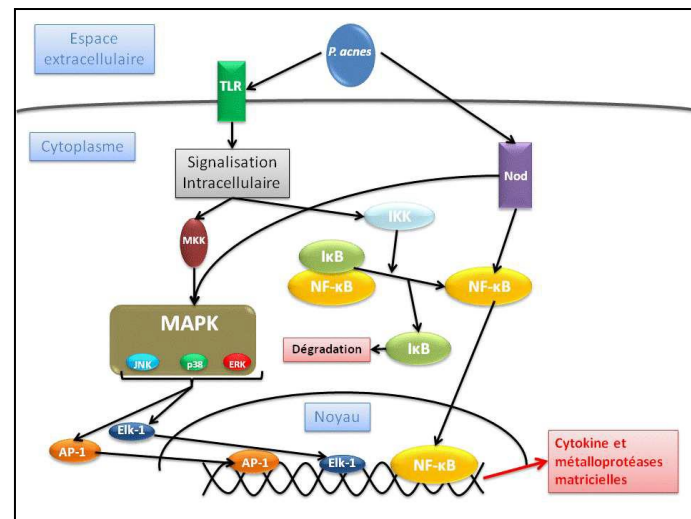


Figure 22 : *C. acnes* et immunité innée (Renaud, 2014)

*C. acnes* est reconnu via :

- Les TLR2 au niveau des sébocytes (125) ;
- Les TLR2 et TLR4 au niveau des kératinocytes (129) ;
- Le TLR2 au niveau des monocytes (130).

Les cytokines produites suite à la reconnaissance de *C. acnes* par les TLRs, sont principalement IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, TNFα (131), IL-17 (132). Ces cytokines sont des

médiateurs solubles de l'inflammation au niveau du follicule pilo-sébacé et favorisent le recrutement des PNN au niveau des lésions de l'acné.

Le récepteur CD36, qui appartient à la famille des récepteurs Scavenger, est exprimé à la surface des monocytes, des macrophages, et de certains endothéliums. Ce récepteur reconnaît différents motifs présents sur le pathogène permettant leur adhérence puis leur internalisation. De plus, ce récepteur participe au processus inflammatoire par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (133).

- Rôle des peptides anti-microbiens :  $\beta$ -défensine-2 (hBD-2), LL-37

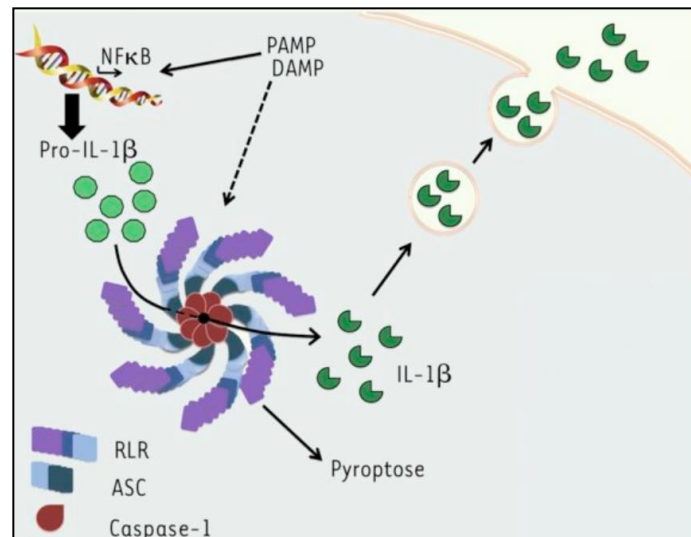
Les peptides anti-microbiens sont synthétisés au niveau des kératinocytes suite à l'activation des TLR-2 et TLR-4 (134). Ces peptides stimulent à leur tour les TLRs, permettant ainsi une amplification de la réaction inflammatoire (135). Ils ont, de plus, des effets chimio-attractants sur les PNN (136,137).

- Rôle des métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Les métalloprotéases matricielles MMP-1, -3, -9, appartiennent au groupe des endopeptidases (gélatinases, collagénase, stromélysines, matrilysines). Elles sont produites au niveau des sébocytes et des kératinocytes (129) suite à l'activation du système immunitaire innée. Les MMPs favorisent la rupture de la paroi du follicule pilo-sébacé, la diffusion de l'inflammation vers la profondeur ainsi que la formation de cicatrices (137,138).

- Rôle de l'inflammasome

L'inflammasome est un complexe multiprotéique présent au niveau de certains leucocytes. Il est activé par de nombreuses bactéries, en réponse à des signaux de danger. Ce complexe se forme par oligomérisation d'un récepteur (NLR, ALR ou RLR), d'un adaptateur (ASC) et de la caspase-1, l'effecteur de ce complexe (139). L'inflammasome induit le clivage protéolytique de différentes caspases entraînant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (140) (Figure 23, page 54).



**Figure 23 : Schéma général du fonctionnement de NLRP3 (Jamilloux *et al.*, 2013)**

Qin *et al.*, (141) ont montré que *C. acnes* pouvait activer l'inflammasome formé du complexe Nod-Like Receptor Protein 3 (NLRP-3)/ ACS (protéine activatrice)/ caspase-1 au niveau des cellules monocytaires. La liaison de *C. acnes* sur l'inflammasome libère la caspase-1 active. Cette caspase va alors induire le clivage de Pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  active (141,142).

IL-1 $\beta$  est une cytokine majeure de la réponse inflammatoire, elle est notamment impliquée dans (139) :

- L'induction de la fièvre au niveau cérébral ;
- La stimulation de la moelle osseuse à l'origine de l'hyperleucocytose et de la thrombocytose ;
- L'induction et le recrutement des PNN et des cellules inflammatoires au site de l'infection ;
- L'induction de sa propre expression et de l'expression de gènes codant pour d'autres cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$  ou IL-6) provoquant une véritable cascade pro-inflammatoire.

- Rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

En réponse à l'activation par *C. acnes* des récepteurs CD36, les kératinocytes peuvent produire des quantités massives de ROS. Parmi les ROS produits, on retrouve l'anion superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, l'oxyde nitrique, le peroxynitrite. Le rôle de ces ROS est d'éliminer la bactérie. Cependant, comme il s'agit d'espèces hautement réactives, la libération des ROS entraîne aussi une lyse kératinocytaire.

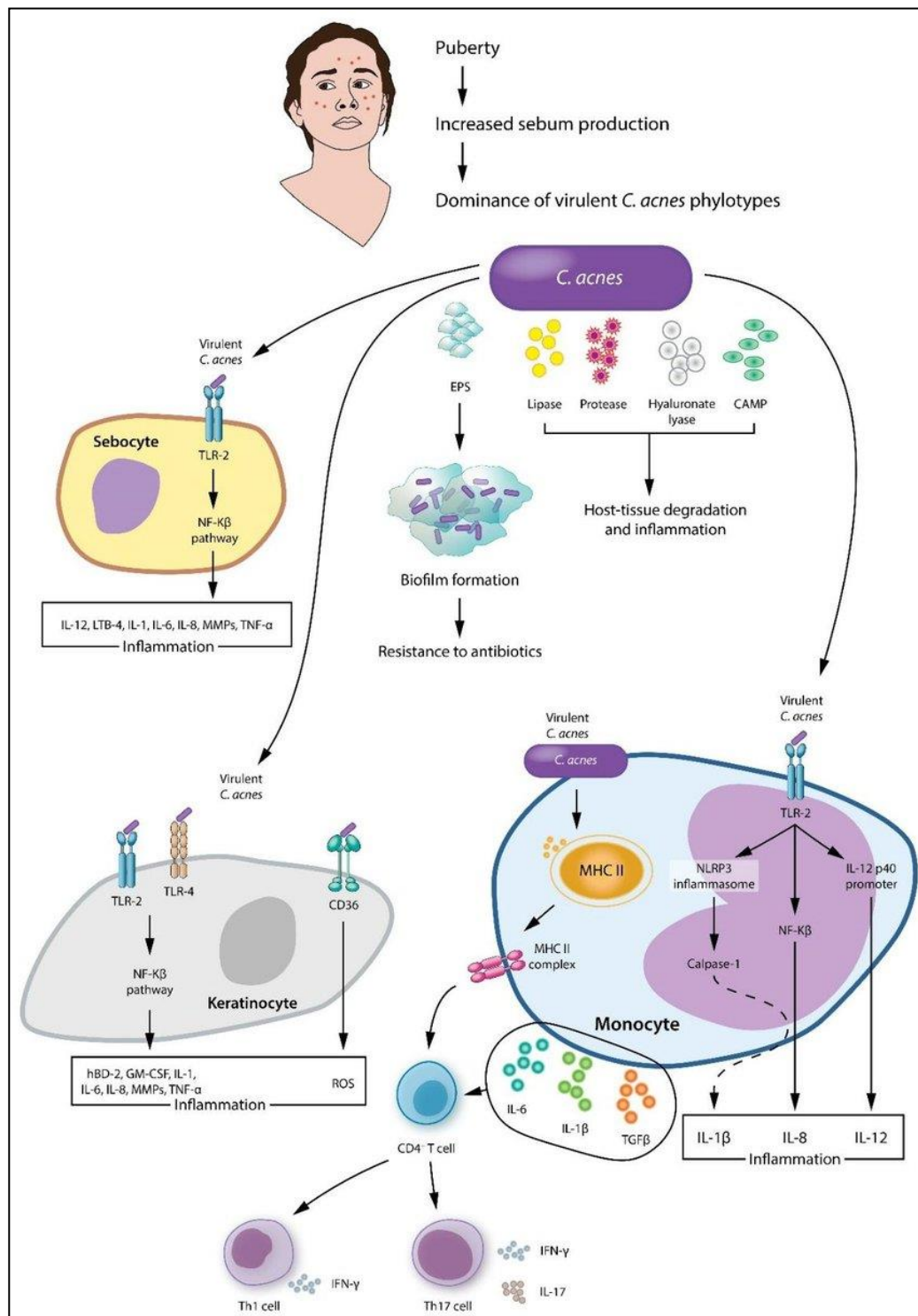


Figure 24 : Rôle de *C. acnes* dans l'inflammation (Lee YB *et al.*, 2019)



#### 4-4-2. *C. acnes* et comédogenèse

- Rôle de la cytokine IL-1 $\alpha$

L'IL-1 $\alpha$  est une cytokine produite suite à l'interaction entre des motifs PAMPs et le TLR-2 au niveau des kératinocytes (143–145). La quantité d'IL-1 $\alpha$  produite est plus importante lorsque les kératinocytes sont en présence de *C. acnes* par rapport à des kératinocytes non stimulés (144,145).

En 2013, Selway *et al.* ont étudié des follicules pilosébacés microdisséqués en présence d'IL-1 $\alpha$ . Les auteurs ont montré que l'exposition *in vitro* des follicules pilosébacés à l'IL-1 $\alpha$  favorise la prolifération des kératinocytes, participant ainsi à la comédogenèse (143).

- Rôle des kératinocytes

Akaza *et al.*, (145) ont étudié, *in vitro*, l'effet de *C. acnes* sur le taux d'expression d'ARNm au niveau des kératinocytes. Leurs résultats ont montré que *C. acnes* n'était pas seulement impliqué dans l'induction de l'inflammation mais jouerait aussi un rôle dans la différenciation des kératinocytes. Ainsi, *C. acnes* stimulerait la prolifération et l'expression de protéines kératinocytaires telles que les intégrines (146), et la filagrine (147) induisant ainsi la formation de microcomédons.

Les intégrines sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités associées  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces protéines sont des récepteurs transmembranaires indispensables aux liaisons entre les cellules et la matrice extracellulaire. De plus, ces intégrines sont nécessaires à la locomotion cellulaire, la transduction d'un signal et la liaison avec le cytosquelette. Enfin, ces protéines interviennent aussi dans la régulation de la prolifération et de la migration kératinocytaire (148).

*C. acnes* augmenterait l'expression de certaines intégrines transmembranaires, notamment l'intégrine  $\beta$ 1, qui contrôle la migration, la prolifération et la différenciation des kératinocytes. Ainsi, *C. acnes* en modulant l'expression de ces intégrines, induirait la formation de micro comédon en modulant la prolifération des kératinocytes.

La filagrine est une protéine synthétisée sous la forme d'un précurseur la profilagrine au niveau de la couche granuleuse. La profilagrine va être phosphorylée et stockée dans le

cytoplasme des kératinocytes granuleux sous forme de granules de kératohyaline. Lors du processus de cornification, la profilagrine est dé-phosphorylée puis protéolysée en sous unités monomériques de filagrine. La filagrine s'associe ensuite en filaments intermédiaires de kératines formant ainsi la matrice cytoplasmique des cornéocytes indispensable pour la protection de la peau. Chez un patient sain, la filagrine est localisée dans la couche cornée. Une récente étude (147) a montré que *C. acnes* augmente l'expression de la filagrine au niveau des couches basales et intermédiaires de l'épiderme, suggérant ainsi que cette bactérie modulerait la phase terminale de différenciation des kératinocytes.

- Rôle de l'IL-8

L'IL-8 est un médiateur de l'inflammation, jouant un rôle de chemoattractant vis-à-vis des PNN. Les PNN s'accumulent dans les follicules (149) et libèrent leurs enzymes lysosomales entraînant une rupture du follicule (150).

L'IL-8 favorise aussi la prolifération des kératinocytes. En effet, des niveaux élevés d'IL-8 contribueraient à la prolifération excessive des kératinocytes canaux en favorisant la comédogenèse.

- Rôle de l'IGF-1

L'IGF-1 permet l'induction de la prolifération des kératinocytes *in vivo* et *in vitro*.

Isard *et al.*, (151) ont montré que l'IGF-1 était surexprimé dans l'épiderme de patients acnéiques par rapport aux patients sains. Ainsi, *C. acnes* augmenterait l'expression de l'IGF-1. L'IGF-1 induirait alors une prolifération (58–62), une différenciation et une inhibition de l'apoptose des kératinocytes, favorisant la comédogenèse.

#### **4-4-3. *C. acnes* et hyperséborrhée**

L'hyperséborrhée est l'un des trois facteurs clefs de l'acné. Cette production accrue de sébum, ainsi que la modification de sa composition, essentiellement sous le contrôle des androgènes, favorise la prolifération de *C. acnes* au sein de l'unité pilo-sébacée en étant sa principale source nutritionnelle (152).

- Rôle du CRH

En 2009, Isard *et al.*, (65) ont montré que *C. acnes* stimulait la production de CRH au niveau des kératinocytes. Cette hormone est connue pour favoriser la lipogenèse en augmentant l'expression de la 3 $\beta$ -HSD (enzyme responsable de la synthèse des androgènes).

- Rôle de la Diacylglycérol AcylTransférase (DGAT)

La DGAT est une acyltransferase qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse des triglycérides (composant majoritaire de sébum). En 2009, Iinuma *et al.*, (153) ont montré, sur des sébocytes de hamster, que *C. acnes* stimulait l'activité de la DGAT. Ainsi, *C. acnes* favoriserait la lipogenèse en augmentant la synthèse des triglycérides.

- Rôle de l'IGF-1

Comme vu précédemment, *C. acnes* augmenterait la sécrétion de l'IGF-1 (151). En 2008, Vora *et al.*, ont observé une corrélation entre le taux de l'IGF-1 et la quantité de sébum (154).

Il semblerait donc que l'augmentation de l'expression de l'IGF-1 soit responsable d'une augmentation de la production de sébum.

#### **4-4-4. *C. acnes*, biofilm et acné**

La capacité de *C. acnes* à former du biofilm est largement acquise dans les infections ostéo-articulaire.

Outre les facteurs de virulence, plusieurs gènes présents sur le génome de *C. acnes* (codant pour la glycosyltransférase, l'uridine diphosphate-Nacetylglucosamine 2-épimérase et la biosynthèse des polysaccharidesprotéines) sont également potentiellement impliqués dans la formation du biofilm.

En 2007, Burkart *et al.*, (155) ont suggéré que *C. acnes* formerait une sorte de glue au niveau du follicule pilo-sébacé, augmentant son adhérence aux kératinocytes et participant ainsi à la formation du comédon.

En 2012, une étude cas-témoins réalisée sur des biopsies de peau du visage a montré, pour la première fois, que *C. acnes* pouvait se développer sous forme de macrocolonies

produisant de grands biofilms en profondeur dans les follicules pilo-sébacés. Cette étude a de plus mis en évidence que la présence de biofilms de *C. acnes* était significativement plus élevée chez les patients acnéiques (37 %) que chez des patients sains (13 %) (124).

Cette présence de biofilm dans les lésions d'acné expliquerait ainsi le retard de pénétration et la résistance aux antibiotiques acquise dans cette pathologie.

#### **4-4-5. Microbiote cutané, acné et *C. acnes***

Avec l'essor des méthodes génomiques, le microbiote cutané a été de plus en plus étudié. Il est composé d'un ensemble de micro-organismes (156) (bactéries, champignons, levures, virus, archées et acariens principalement le *Demodex*) résidant dans et sur la peau. Les bactéries cutanées appartiennent à quatre principaux phyla : *Actinobacteria* (51,8 %), *Firmicutes* (24,4 %), *Proteobacteria* (16,5 %), *Bacteroidetes* (6,3 %) (104). La majorité des bactéries identifiées appartiennent aux genres *Corynebacterium* (22,8 % ; *Actinobacteria*), *Propionibacterium* (23,0 % ; *Actinobacteria*) et *Staphylococcus* (16,8 % ; *Firmicutes*) (104). L'acquisition du microbiote cutané se fait au stade précoce de la naissance. *In utéro*, la peau du fœtus est stérile. Selon le mode d'accouchement (césarienne ou par voie basse), le nouveau-né se colonise, avec les bactéries des flores cutanées ou vaginales de la maman (157).

Le microbiote cutané est un acteur essentiel de la barrière cutanée, assurant une défense efficace contre les pathogènes mais permettant aussi le maintien de l'intégrité épidermique. De récentes publications ont souligné le rôle fondamental de deux bactéries : *S. epidermidis* et de *C. acnes* dans le maintien de l'homéostasie cutané (Figure 25, page 61) (158,159).

*S. epidermidis* est un cocci à Gram positif, appartenant à l'embranchement des *Firmicutes*, et au genre *Staphylococcus*. Cette bactérie est présente notamment au niveau des zones humides cutanées (voutes plantaire, plis poplités...).

Ces deux bactéries ont une relation symbiotique avec le système cutané et participent à l'inhibition de la croissance de bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) :

- En favorisant une compétition pour les nutriments due à l'occupation de ces deux bactéries dans la niche écologique ;
- En désensibilisant les TLRs par une exposition continue de ces bactéries, permettant ainsi une diminution du processus pro-inflammatoire (103) ;
- En induisant la synthèse de peptides antimicrobiens (AMPs) tels que les bêta défensines humaines, les cathélicidines par les cellules immunitaires (monocytes, macrophages, cellules dendritiques) mais aussi par les cellules de l'hôte (kératinocytes) (160).

Enfin, ces bactéries sécrètent des bactériocines, des métalloprotéases, des endopeptidase sérine protéases permettant d'inhiber l'adhérence de souches pathogènes de *S. epidermidis* et de *S. aureus* capables de former du biofilm (161).

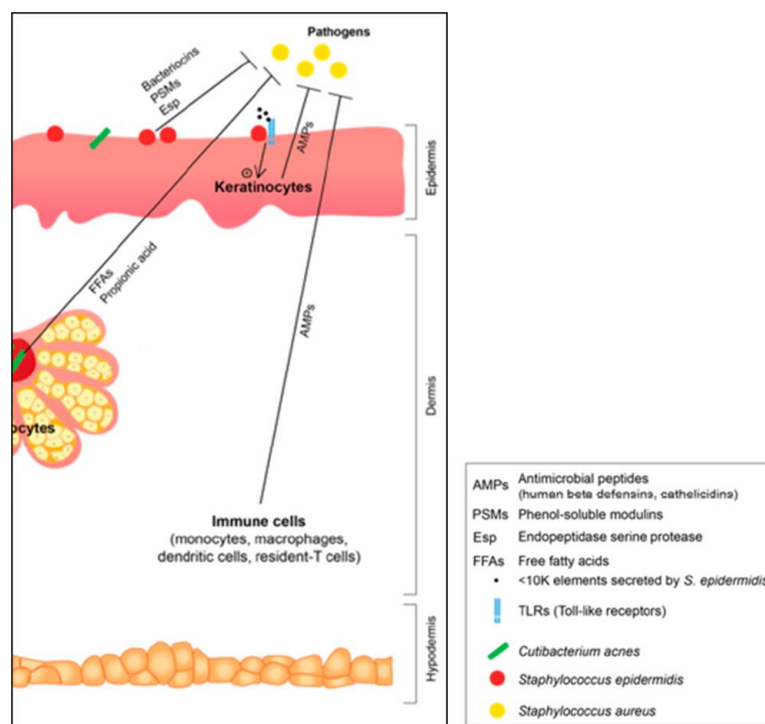
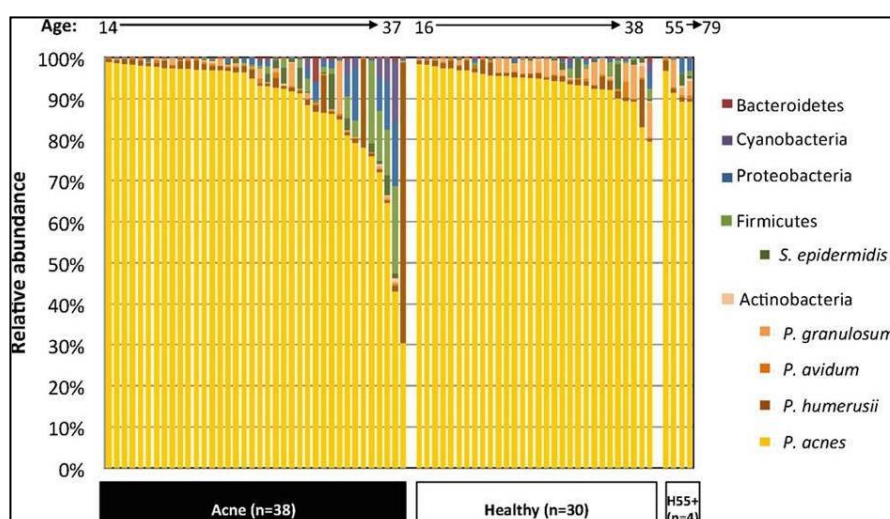


Figure 25 : Rôles de *S. epidermidis* et *C. acnes* dans les interactions entre les bactéries et la peau sain (Fournière *et al.*, 2020)

Lorsque la barrière cutanée est perturbée (augmentation du pH de la peau, perte d'eau, desquamation de la peau...), un glissement entre le commensalisme et le pouvoir pathogène est observé. Ainsi, dans de nombreuses pathologies dermatologiques, notamment l'acné, un déséquilibre du microbiote cutané ou dysbiose est observé avec la présence de souches « virulentes » de *C. acnes* et de *S. epidermidis* sous forme de biofilm (162).

Dans une étude de 2016, Barnard *et al.*, ont comparé l'abondance relative des espèces bactériennes retrouvées dans les follicules pileux de patients sains *versus* patients acnéiques (163). Les auteurs ont remarqué que *C. acnes* était la bactérie prédominante chez tous les individus au niveau cutané. En revanche, ils n'ont pas retrouvé de réelle différence, en termes d'abondance relative des espèces bactériennes, entre les individus sains et les patients acnéiques (Figure 26).



**Figure 26 : Analyses de l'abondance relative des espèces bactériennes retrouvées dans les follicules pileux de patients acnéiques *versus* patients sains (Barnard *et al.*, 2016b)**

Suite à ces résultats, Dagnelie *et al.*, se sont intéressés aux phylotypes de *C. acnes* présents, au niveau du visage et du dos, de patients acnéiques et de patients sains (164). Dans cette étude, 36 patients ont été inclus, 24 patients acnéiques et 12 patients sains. Pour chaque patient deux prélèvements cutanés (visage et dos) ont été réalisés. Les auteurs ont remarqué une perte de la diversité des phylotypes de *C. acnes* chez les patients acnéiques par rapport au groupe sain, au niveau du visage mais aussi du dos. De plus, les auteurs ont

remarqué une sur-représentation des souches appartenant au phylotype IA<sub>1</sub> chez les patients acnéiques par rapport aux patients sains (Figure 27).

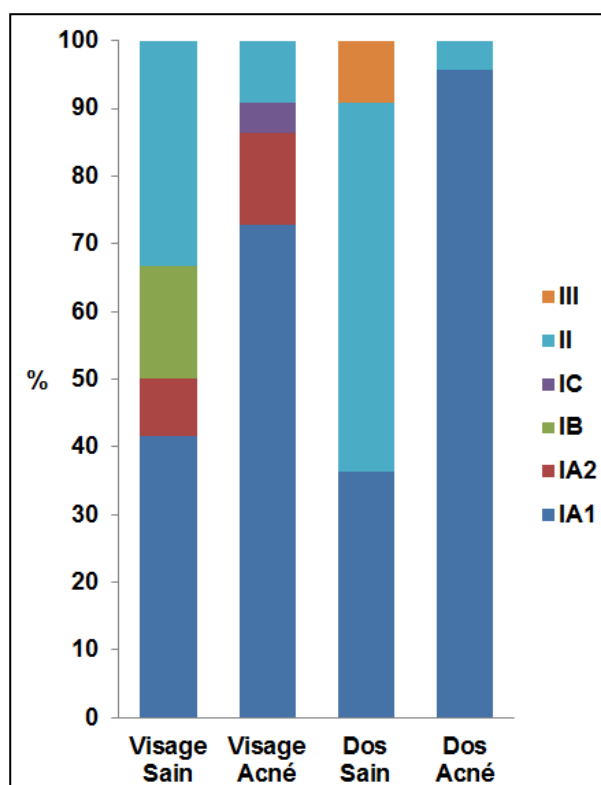


Figure 27 : Phylotypes de *C. acnes* chez patients sains versus patients acnéiques (Dagnelie *et al.*, 2018)

L'acné ne serait donc pas liée à une différence d'abondance d'espèces bactériennes (augmentation de la quantité de *C. acnes*) mais plutôt à une perte de la diversité des phylotypes de *C. acnes* avec une prédominance du phylotype IA<sub>1</sub> (modification de la répartition des phylotypes). Les souches de *C. acnes* appartenant au phylotype IA<sub>1</sub> produisent des niveaux plus élevés de facteurs de virulence (triacylglycérol lipase (165), porphyrines (166), hyaluronate lyase (167) et le facteur CAMP (52)) que les souches appartenant aux autres phylotypes.

Cependant, comme nous l'avons souligné plus haut, *S. epidermidis* semble avoir également un rôle crucial dans le maintien du microbiote cutané (168).

Une étude récente (169) s'est intéressée à l'impact du profil de colonisation de *C. acnes* et de *S. epidermidis* sur la réponse inflammatoire cutanée. Les auteurs ont utilisé des modèles d'explants cutanés humains co-cultivés avec des ratios bactériens différents de *S. epidermidis* et de *C. acnes*. Ils ont ensuite étudié différents marqueurs de l'inflammation cutanée. Cette étude a montré qu'au sein du microbiote cutané, un déséquilibre entre ces deux bactéries commensales induisait une activation de l'immunité innée. De plus, les auteurs ont noté que *S. epidermidis* semble avoir un rôle plus important que *C. acnes* sur l'induction des marqueurs de l'immunité innée, notamment sur la sécrétion d'IL-6.

Ces résultats amènent à rediscuter du rôle de *S. epidermidis* dans l'acné. La physiopathologie de l'acné ainsi que le rôle de chaque acteur dans cette pathologie ne semblent pas encore totalement élucidés.

#### 4-5. *C. acnes* et résistance au traitement antibiotique

L'intérêt d'utiliser des antibiotiques est de diminuer le nombre de *C. acnes* au niveau du follicule pilo sébacé afin de diminuer l'inflammation, la lipogenèse et la comédogenèse. Les antibiotiques recommandés par la Société Française de Dermatologie sont l'érythromycine, la clindamycine, la doxycycline et la lymécycline. Cependant, beaucoup de patients ne répondent pas ou rechutent rapidement en raison de l'antibiorésistance ou de l'impact du biofilm (170,171).

##### **4-5-1. Résistance aux macrolides et aux lincosamides : érythromycine et clindamycine**

Quatre groupes de *C. acnes* ont été définis selon le mécanisme de résistance aux macrolides (172) :

- Les groupes I, III, IV sont associés à des mutations ponctuelles au niveau du domaine V de l'ARN 23S en position 2057, 2058 et 2059 (173) ;
- Le groupe II est associé à l'acquisition du gène *erm(X)* pour erytromycin ribosomal methylation, codant pour une enzyme ERM qui induit une diméthylation de l'ARNr 23S (174).



Le groupe I est le plus fréquent, et le groupe II est le plus rare. Ces mécanismes de résistance aboutissent à une modification de la cible, empêchant l'interaction entre le macrolide et le ribosome bactérien.

En 2020, Aoki *et al.*, (175) ont isolé huit souches de *C. acnes* hautement résistantes aux macrolides et à la clindamycine n'ayant pas de mutation de l'ARN 23S, ni d'acquisition du gène *erm*. Le séquençage du génome entier a révélé la présence d'un plasmide pTZC1 de 31440 pB portant un gène de résistance aux macrolides – clindamycine *erm*(50) et un gène de résistance aux tétracyclines *tet*(W). Des expériences de transconjugaison ont démontré que ce plasmide pTZC1 était transférable horizontalement parmi les souches de *C. acnes* et conférait une résistance de haut niveau aux macrolides, à la clindamycine et aux tétracyclines.

#### **4-5-2. Résistance aux tétracyclines : doxycycline et lymécycline**

Deux mécanismes peuvent être à l'origine de la résistance de *C. acnes* aux tétracyclines :

- Une mutation ponctuelle de la cible en position 1058 de l'ARNr 16S de la sous unité 30S du ribosome bactérien ;
- L'acquisition du gène *tet*(W), induisant une protection du ribosome par encombrement stérique (175).

Les résistances aux cyclines sont le plus souvent liées à une mutation G1058C dans le gène codant pour l'ARN 16S de *C. acnes* (176,177). Un traitement de l'acné par des doses sub-optimales de doxycycline a été proposé, afin d'obtenir l'action anti-inflammatoire sans activité antibactérienne pour limiter l'acquisition de résistance (178,179) .

#### **4-5-3. Epidémiologie des résistances de *C. acnes* aux antibiotiques**

Selon certains auteurs, le traitement topique par antibiotique favoriserait l'émergence de résistance à l'érythromycine et à la clindamycine chez *C. acnes* (180,181).

En 2003, une étude européenne a été menée chez 622 patients acnéiques afin d'évaluer les taux de résistance des souches de *C. acnes* isolées (182). Le taux de résistance était particulièrement élevé dans certains pays notamment l'Espagne avec un taux de 91 % de

résistance combinée à l'érythromycine et à la clindamycine. Les résistances aux cyclines étaient plus rares, avec une prévalence la plus élevée au Royaume Uni avec 26,4 % de souches résistantes.

Dans une étude française, menée en 2010 sur 273 patients acnéiques, les résistances à l'érythromycine et à la doxycycline des souches de *C. acnes* étaient respectivement de 75,1 % et de 9,5 % (183) (Tableau 3 , page 67).

- *C. acnes* est un bacille à Gram positif appartenant à la flore commensale cutanée, ayant de nombreux facteurs de virulence et capable de former du biofilm.
- *C. acnes* et *S. epidermidis* jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homeostasie cutané.
- Dans l'acné, on observe une dysbiose avec une sur-représentation des phylotypes IA<sub>1</sub> et des souches « virulentes » de *C. acnes*.
- *C. acnes* participe à l'inflammation, à la comédogénèse et à l'hyperséborrhée.
- De nombreuses souches de *C. acnes* sont résistantes aux macrolides et dans une moindre mesure aux tétracyclines.

**Tableau 3 : Différents taux de résistance de *C. acnes* aux antibiotiques chez des patients acnéiques dans différents pays (Platsidaki et al., 2018 (185))**

Etude	Pays, Date	Nombre de patients inclus, n	Résistance globale aux ATB, n (%)	Résistance à la Clindamycine, n (%)	Résistance à l'Erythromycine, n (%)	Résistance à la Doxycycline, n (%)
Moon (186)	Korea, 2011	100 (30 souches de <i>P. acnes</i> isolées)	11 (36,7)	9 (30)	8 (26,7)	2 (6,7)
Coates (181)	UK, 1991-2000	4 274	34,5 % en 1991 55,5 % en 2000	1997 : 48 %	1997 : 57,6 %	NR
	1997	72	72 (100)	65 (90,3)	68 (94,4)	NR
Mendoza (187)	Colombia, 2005,2006	100	40 %	15 %	35 %	9 %
Gonzalez (188)	Nothorn Mexico, 2010	49	37 (75,5)	36 %	46 %	20 %
Luk (189)	Hong Kong, 2009	111 ( <i>P. acnes</i> isolée de 86 patients)	47 (54,7)	53.5 %	18 (20,9)	14 (16,3)
Abdel-Fattah(190)	Egypt, 2011-2012	115 ( <i>P. acnes</i> isolée de 98 patients)	NR	65 (66,3)	48 (49)	6 (6,1)
Ross (182)	1999-2001	672				
	UK		NR	50 %	50 %	NR
	Greece		NR	75 %	75 %	NR
	Hungary		51 %	45 %	45 %	NR
	Italy		NR	58 %	58 %	NR
	Spain		94 %	91 %	91 %	NR
	Sweden		NR	45 %	45 %	NR
Dumont (183)	France, 2010	273	NR	NR	205 (75,1 %)	26 (9,5 %)

NR : non renseigné

## Partie II

### I. Objectifs

Dans un premier temps, ce travail a consisté à la mise au point, de la technique du Biofilm Ring Test® (BRT), adaptée à *C. acnes*. Cette technique a permis d'identifier en fonction des phylotypes de *C. acnes*, des différences de capacité de production, lors des premières phases de formation du biofilm.

Dans un second temps, l'impact de différentes substances actives (antibiotiques et anti-biofilm) a été étudié, selon deux types d'épreuves (préventive ou curative) afin de réduire l'antibiorésistance de *C. acnes* dans les contextes de dermatologie (191). Tous les résultats obtenus par le Biofilm Ring Test® ont été comparés à la méthode standard du Crystal Violet (CV) (21,22).

### II. Matériel et Méthodes

#### 2-1. Origine des souches de *C. acnes* utilisées

Huit souches de *C. acnes* ont été sélectionnées pour cette étude, dont deux souches de référence, ATCC 6919 et ATCC 11827 et six souches cliniques isolées de patients du CHU de Nantes (Tableau 4). Ces souches issues de la collection du service de Bactériologie et des contrôles microbiologiques proviennent d'une étude clinique antérieure (164).

**Tableau 4 : Liste des souches de référence et cliniques de *C. acnes* sélectionnées pour l'étude**

N° de collection/ Souche	Phylotype	Complexe Clonal	Type SLST
ATCC 6919	IA <sub>1</sub>	CC18	A1
ATCC 11827	IA <sub>1</sub>	CC18	A1
A47	IA <sub>1</sub>	CC18	A1
A56	IA <sub>1</sub>	CC28	D1
A85	IA <sub>2</sub>	CC2	F1
A104	II	CC53	K1
A132	IB	CC36	H1
A48	III	CC43	L7

## 2-2. Méthodes d'étude *in vitro* du biofilm de *C. acnes*

### 2-2-1. Méthode de coloration au Crystal Violet

#### Principe

La technique du CV a longtemps été utilisée comme méthode de référence pour l'étude de la production du biofilm bactérien depuis sa première description par Christensen *et al.*, en 1985 (21). Cette méthode a été modifiée en 2011 (22) pour augmenter sa précision et permettre la quantification de la biomasse totale par re-solubilisation du colorant.

Cette technique repose sur la coloration de la biomasse totale ayant adhéré à la surface du puits, à un temps donné. Le CV est un colorant basique qui se lie aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaire. La biomasse ainsi colorée contient aussi bien les bactéries vivantes que mortes, ainsi que l'exopolysaccharide produit (Figure 28).

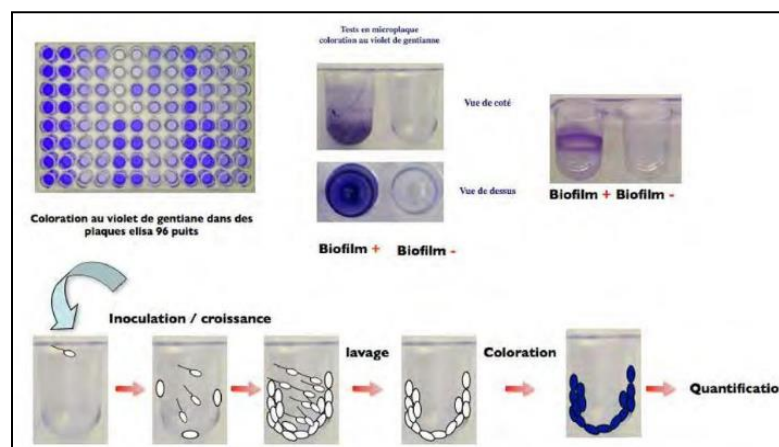


Figure 28 : Principe de la mesure de la biomasse par la technique du Crystal Violet (Auger, 2011 (144))

#### Protocole

Chaque souche bactérienne a été isolée sur gélose SCH (Schaedler, au sang de mouton supplémentée en vitamine K1, Becton Dickinson) à partir de la congélation. Après 48h d'incubation à l'étuve à 37°C en anaérobiose, des suspensions bactériennes calibrées à 0,5 McFarland ont été préparées dans du milieu liquide BHI (Brain Heart Infusion, Becton Dickinson). 200 µL de ces suspensions bactériennes ont été ajoutés dans chacun des puits de la microplaque 96 puits. La plaque ainsiensemencée a été incubée 48h en anaérobiose à

37°C. A la suite de cette incubation, la DO (densité optique) a été lue à 620 nm pour chaque souche. Les suspensions bactériennes ont été ensuite éliminées par pipetage, et du méthanol 100 % a été ajouté (250 µL/puits) pendant 15 minutes (192). Après cette incubation, le méthanol a été rejeté et le CV a été ajouté dans chaque puits (250 µL/puits). Après une heure d'incubation, le CV a été enlevé puis un rinçage à l'eau a été réalisé afin d'enlever le surplus de CV qui avait adhéré aux parois des puits et non pas à la biomasse produite par les bactéries. De l'éthanol absolu a ensuite été utilisé afin de dissoudre le CV accroché à la biomasse (250 µL/puits). Après homogénéisation des puits de la plaque, la DO a été lue à 620 nm pour chaque puit. Un témoin négatif (« blanc ») contenant uniquement du BHI a été utilisé. Toutes les valeurs de DO des échantillons ont été mesurées par spectrométrie par rapport à la DO du contrôle négatif. Plus la DO était grande, plus la production de biofilm était élevée.

Pour chaque condition expérimentale, toutes les souches devaient être testées trois fois lors d'expériences indépendantes.

### **Expression des résultats**

La quantification du biofilm a été calculée selon la formule suivante :

$$SBF = (S_F - B_F) / (S_I - B_I)$$

Avec :

- SBF : Indice de formation de biofilm spécifique (Specific Biofilm Formation)
- $S_F$  : DO à 620 nm de la souche testée après coloration au CV
- $B_F$  : DO à 620 nm du blanc après coloration au CV
- $S_I$  : DO à 620 nm de la souche testée avant coloration au CV
- $B_I$  : DO à 620 nm du blanc avant coloration au CV

Les souches ont été classées arbitrairement en trois catégories :

- Faibles producteurs de biofilm :  $SBF < 1$
- Moyennement producteurs de biofilm :  $1 \leq SBF \leq 1,8$
- Forts producteurs de biofilm :  $SBF > 1,8$

## **2-2-2. Méthode du BioFilm Ring Test®**

### **Principe**

Cette technique permet de déterminer, la capacité de certaines bactéries à adhérer à des billes magnétiques en microplaque 96 puits, mais également à évaluer la cinétique de formation de ce biofilm de façon simple et rapide, sans lavage ni coloration. Le principe repose sur la co-incubation d'une suspension bactérienne calibrée avec des microbilles magnétiques, dont la mobilité est freinée par la formation de biofilm. Un indice de formation du biofilm « BFI », reflet de la mobilité des microbilles après aimantation, permet de suivre la formation du biofilm au cours du temps. Plus les microbilles sont immobilisées par le biofilm en formation, plus ce BFI diminue (28) (Figure 29, page 72). Un faible BFI correspond donc à une immobilisation des billes (présence de biofilm), alors qu'une valeur élevée de BFI correspond à une forte mobilité des billes magnétiques (absence de formation de biofilm).

La technique du BRT a été validée par le fournisseur uniquement avec le milieu de culture BHI.

Par rapport à la technique du CV, cette technique ne présente pas d'étape de lavage ni de coloration, ce qui limite les variations de résultats liées à l'opérateur et simplifie la technique. A la différence de la technique du CV qui étudie la biomasse totale formée, le BRT permet d'évaluer plus précocement la formation de biofilm, dès l'étape d'adhérence des bactéries à la surface de la microplaque.

### **Protocole**

Les souches bactériennes étaient isolées sur gélose SCH à partir de leur congélation pendant 48h, puis ré-isolées sur gélose BHI. Après 48h d'incubation à l'étuve à 37°C en anaérobiose, des suspensions bactériennes calibrées étaient réalisées en milieu BHI avec des billes magnétiques (TONER) à 1 % dans une microplaque 96 puits.

Après 3h et 6h d'incubation de la microplaque 96 puits en anaérobiose, les puits étaient recouverts d'un liquide de contraste. La plaque était placée pendant une minute sur un support magnétique puis était scannée par le lecteur de plaque pour obtenir une image de

chaque puits. L'analyse de l'image par le logiciel BioFilm Control® donne l'indice de formation du biofilm (BFI).

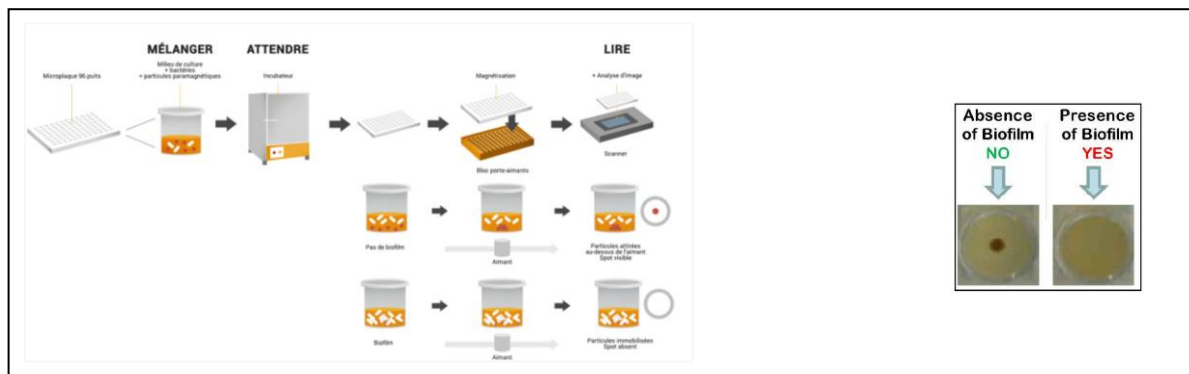


Figure 29 : Principe de la méthode du BioFilm Ring Test® (d'après BioFilm Control®)

Pour chaque condition expérimentale, toutes les souches devaient être testées trois fois par des expériences indépendantes.

### Expression des résultats

#### - Sans ajout de substances actives

La quantification de la production de biofilm des huit souches de *C. acnes*, sans ajout de substances actives, a été faite selon la formule suivante :

$$\% \text{ BFI} = 100 - [(BFI_{SF} \times 100) / BFI_{BF}]$$

Avec :

- % BFI : Pourcentage de biofilm formé après 3h ou 6h d'incubation
- BFI<sub>SF</sub> : BFI de la souche testée après 3h ou 6h d'incubation
- BFI<sub>BF</sub> : BFI du blanc après 3h ou 6h d'incubation

Ainsi, les souches ont été classées arbitrairement en trois catégories :

- Faibles producteurs de biofilm : % BFI < 50 %
- Moyennement producteurs de biofilm : 50 % ≤ % BFI ≤ 90 %
- Forts producteurs de biofilm : % BFI > 90 %



- Après ajout de substances actives

La quantification de la production de biofilm des huit souches de *C. acnes*, après ajout de substances actives, a été faite selon la formule suivante :

$$\Delta \text{BFI} = (\text{BFI}_{\text{BF}} - \text{BFI}_{\text{SF}})$$

Avec :

- $\text{BFI}_{\text{BF}}$  : BFI du blanc après 3h ou 6h d'incubation
- $\text{BFI}_{\text{SF}}$  : BFI de la souche testée après 3h ou 6h d'incubation

Ainsi, les souches ont été classées arbitrairement en trois catégories :

- Faibles producteurs de biofilm :  $\Delta \text{BFI} < 6$
- Moyennement producteurs de biofilm :  $6 \leq \Delta \text{BFI} \leq 10$
- Forts producteurs de biofilm :  $\Delta \text{BFI} > 10$

### **2-2-3. Variation des conditions expérimentales**

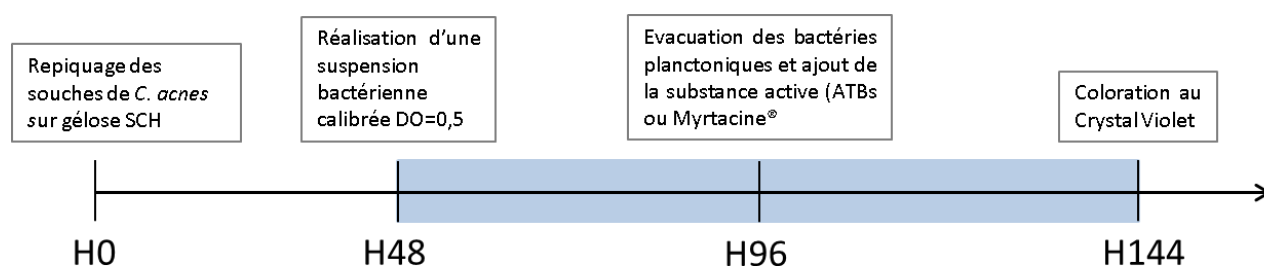
La formation de biofilm a été évaluée selon différentes conditions expérimentales :

- Ajout de différentes concentrations d'antibiotiques (érythromycine, clindamycine, doxycycline). Des gammes de concentrations croissantes de chaque antibiotique ont été réalisées de 0,25 à 32 mg/L.
- Ajout de différentes concentrations d'une substance anti-biofilm : la Myrtacine®. Une gamme de concentrations croissantes a été réalisée allant de 0,0001 % à 0,03 % (84).

En effet, nous avons pu bénéficier gracieusement de la poudre de Myrtacine® par les laboratoires Pierre Fabre, grâce à une collaboration étroite avec l'équipe de Dermatologie du Pr B. Dréno.

Deux types épreuves ont été effectuées avec la méthode du CV, afin d'évaluer l'impact de ces substances actives sur le biofilm :

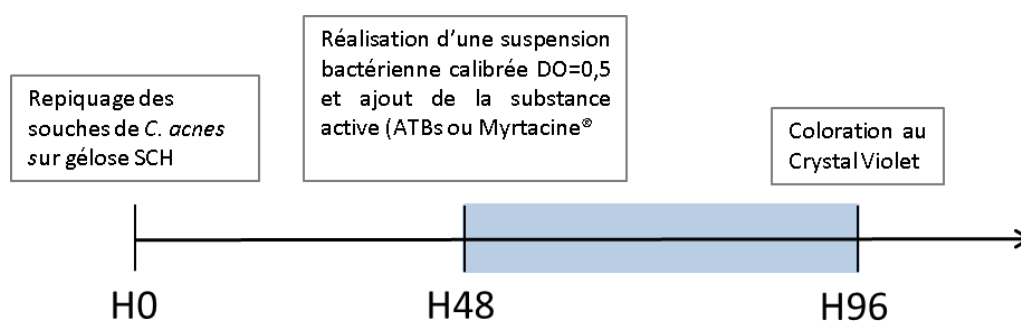
- Epreuve curative : ajout des substances actives (antibiotiques ou Myrtacine®) après 48h de formation du biofilm (Figure 30).



**Figure 30 : Schéma du protocole d'une épreuve curative**

Zone en bleue : temps de formation du biofilm

- Epreuve préventive : ajout des substances actives (doxycycline ou Myrtacine®) avant la croissance du biofilm (Figure 31).



**Figure 31 : Schéma du protocole d'une épreuve préventive**

Zone en bleue : temps de formation du biofilm

### III. Résultats

#### 3-1. Mise au point de la technique du BioFilm Ring Test®

Lors de ce travail de thèse, nous avons pu avoir accès à une technique innovante, déjà utilisée dans le service de Bactériologie et des contrôles microbiologiques du CHU de Nantes pour d'autres bactéries : le BRT.

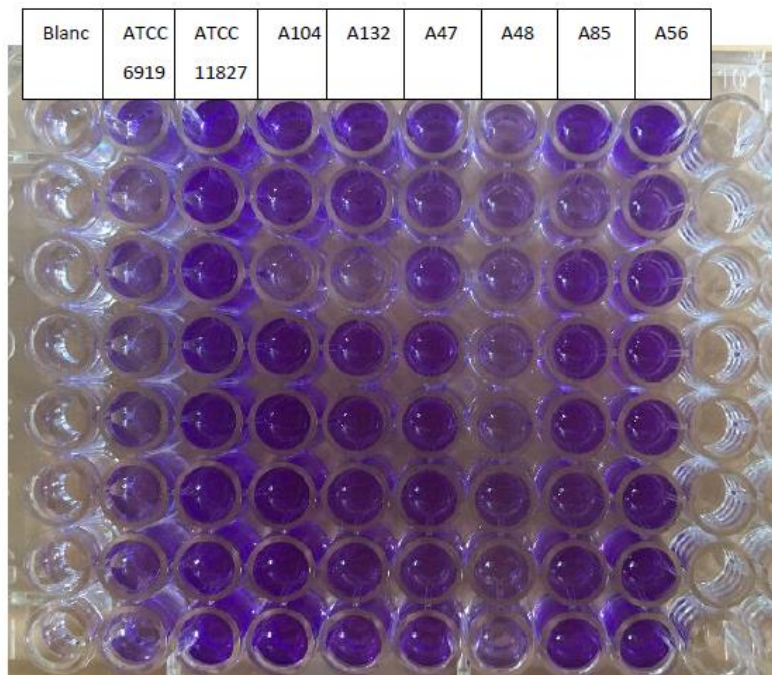
Les étapes de mise au point de la technique du BRT ont été réalisées en partie par Marie Ange Dagnelie (thésarde dans U1232 équipe 2). Après plusieurs manipulations nous avons noté que le système BRT saturait dès 8h d'incubation des microplaques 96 puits (résultat identique à 24h ou 48h). A ce temps d'incubation, nous avons observé une immobilisation des billes magnétiques du système, quelle que soit la souche de *C. acnes* testée. Ainsi, nous avons décidé d'incuber, pour le reste de notre étude, nos microplaques pendant 3h et 6h.

#### 3-2. Détection de la capacité à produire un biofilm par les huit souches de *C. acnes*

Dans cette partie, nous avons souhaité évaluer les différences de capacité de production du biofilm *in vitro* de différentes souches de *C. acnes*.

##### **3-2-1. Méthode de coloration au Crystal Violet**

L'ensemble de nos souches de *C. acnes* ont été étudiées, dans un premier temps, par la méthode du CV pour évaluer les différences de capacité à former un biofilm mature. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Pour chaque expérience, chaque souche a été testée huit fois (8 puits) (Figure 32, page 76).



**Figure 32 : Photographie d'une plaque 96 puits après redissolution au Crystal Violet**

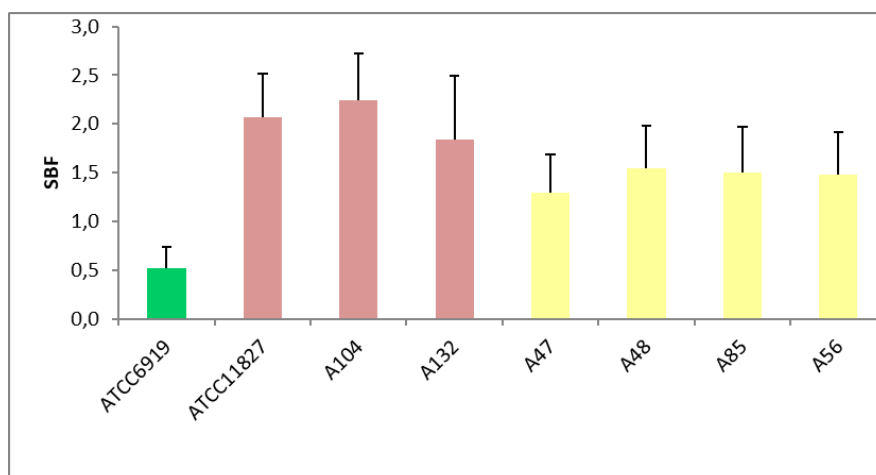
Plus la coloration en violet est intense plus la biomasse de biofilm produite est élevée

Dans les conditions choisies, trois de nos souches étaient retrouvées fortement productrices de biofilm (ATCC 11827, A104, A132), appartenant respectivement à des groupes phylogénétiques différents (IA<sub>1</sub>, II et IB) (Tableau 5 et Figure 33, page 77).

**Tableau 5 : Indice de formation du biofilm calculé (SBF) pour l'ensemble des souches testées avec la technique du Crystal Violet**

En vert : Souche faiblement productrice de biofilm ; En jaune : Souches moyennement productrices de biofilm ; En rouge : Souches fortement productrices de biofilm

	Phylotype	Moyenne SBF	Ecart-type
<b>SBF (ATCC6919)</b>	IA <sub>1</sub>	0,52	0,22
<b>SBF (ATCC11827)</b>	IA <sub>1</sub>	2,07	0,45
<b>SBF (A47)</b>	IA <sub>1</sub>	1,30	0,39
<b>SBF (A56)</b>	IA <sub>1</sub>	1,48	0,44
<b>SBF (A85)</b>	IA <sub>2</sub>	1,51	0,46
<b>SBF (A104)</b>	II	2,24	0,49
<b>SBF (A132)</b>	IB	1,84	0,66
<b>SBF (A48)</b>	III	1,55	0,43



**Figure 33 : Indice de formation du biofilm (SBF) calculé pour l'ensemble des souches testées avec la technique du Crystal Violet**

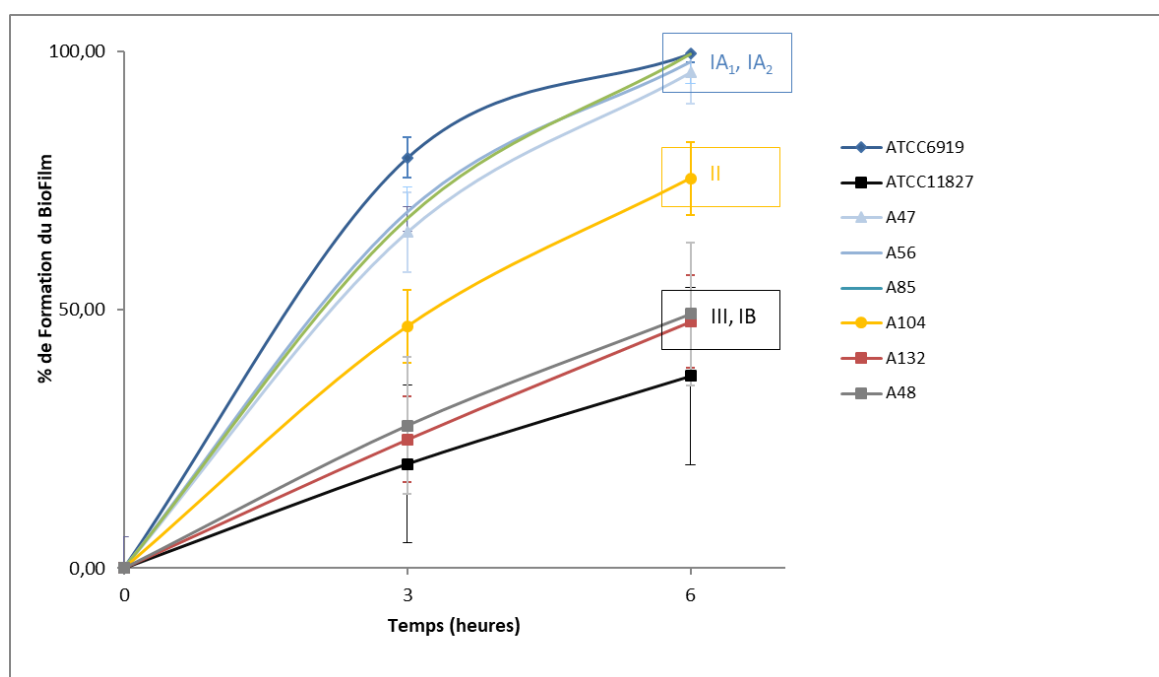
### **3-2-2. Méthode du BioFilm Ring Test®**

L'ensemble de nos souches de *C. acnes* a été étudié en utilisant la technique du BRT pour évaluer les différences de capacité à former du biofilm dès les premières phases d'adhérence. Les résultats présentés sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Pour chaque expérience, chaque souche a été testée huit fois (8 puits). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence trois groupes. Le premier groupe comporte les souches des phylotypes IA<sub>1</sub> et IA<sub>2</sub> qui semblent être de forts producteurs de biofilm. Le deuxième groupe comprend un seul isolat : la souche A104 (phylotype II) moyennement productrice de biofilm. Enfin, le dernier groupe (souches appartenant aux phylotypes III et IB) est constitué de souches faiblement productrices de biofilm. A noter que la souche ATCC 11827 a été exclue de nos trois groupes car elle présente un profil particulier (Tableau 6 et Figure 34, page 78).

**Tableau 6 : Pourcentage de formation du biofilm (% BFI) calculé pour l'ensemble des souches testées à T3h et à T6h avec la technique du BioFilm Ring Test®**

En vert : Souches faiblement productrices de biofilm ; En jaune : Souches moyennement productrices de biofilm ; En rouge : Souches fortement productrices de biofilm

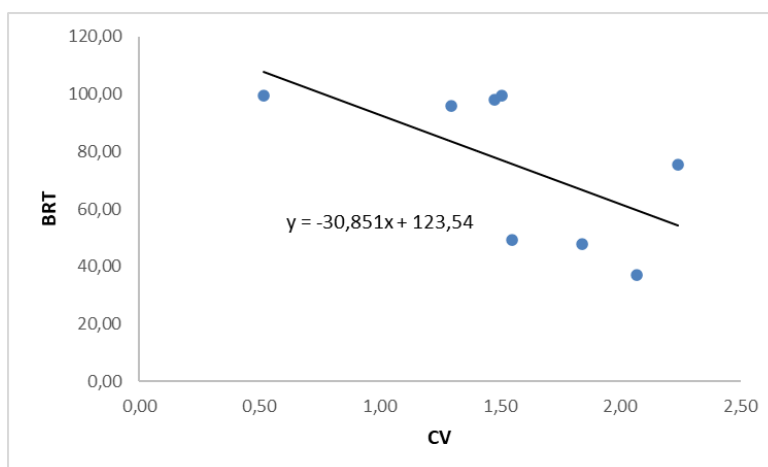
Souche	Phylotype	% BFI à T3h		% BFI à T6h	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
ATCC6919	IA <sub>1</sub>	79,41	3,91	99,62	1,70
ATCC11827	IA <sub>1</sub>	20,19	15,17	37,21	17,16
A47	IA <sub>1</sub>	65,02	7,80	95,93	5,94
A56	IA <sub>1</sub>	68,98	4,88	98,06	4,27
A85	IA <sub>2</sub>	67,61	6,01	99,46	2,38
A104	II	46,77	7,00	75,42	7,09
A132	IB	24,92	8,29	47,75	8,88
A48	III	27,63	13,20	49,23	13,84



**Figure 34 : Pourcentage de formation du biofilm calculé pour l'ensemble des souches testées à T3h et à T6h avec la technique du BioFilm Ring Test®**

### 3-2-3. Corrélation entre les deux méthodes

La droite de régression entre les deux méthodes n'est pas bonne ( $y = -30,851x + 123,54$ ) (Figure 35). En effet, les quatre souches les plus productrices de biofilm par la méthode du BRT apparaissent comme faiblement ou moyennement productrices de biofilm par la méthode du CV.



**Figure 35 : Corrélation entre les méthodes du Crystal Violet (CV) et du BioFilm Ring Test® (BRT)**

### 3-3. Influence de l'ajout de différentes substances actives sur les premières phases de formation du biofilm : technique du BioFilm Ring Test®

Dans cette partie, nous avons souhaité évaluer l'impact de différentes substances actives (antibiotiques et anti-biofilm) sur les premières phases de formation du biofilm avec la technique du BRT.

#### 3-3-1. Influence de l'ajout d'antibiotiques

L'impact de l'ajout d'antibiotiques sur les premières phases de formation du biofilm a été étudié pour l'ensemble de nos souches de *C. acnes*. Des gammes de concentrations croissantes d'antibiotiques (érythromycine, clindamycine, doxycycline) ont été réalisées allant de 0,25 à 32 mg/L. Pour chaque expérience, une souche a été testée avec chaque concentration de la gamme d'antibiotique et l'expérience a été renouvelée trois fois.

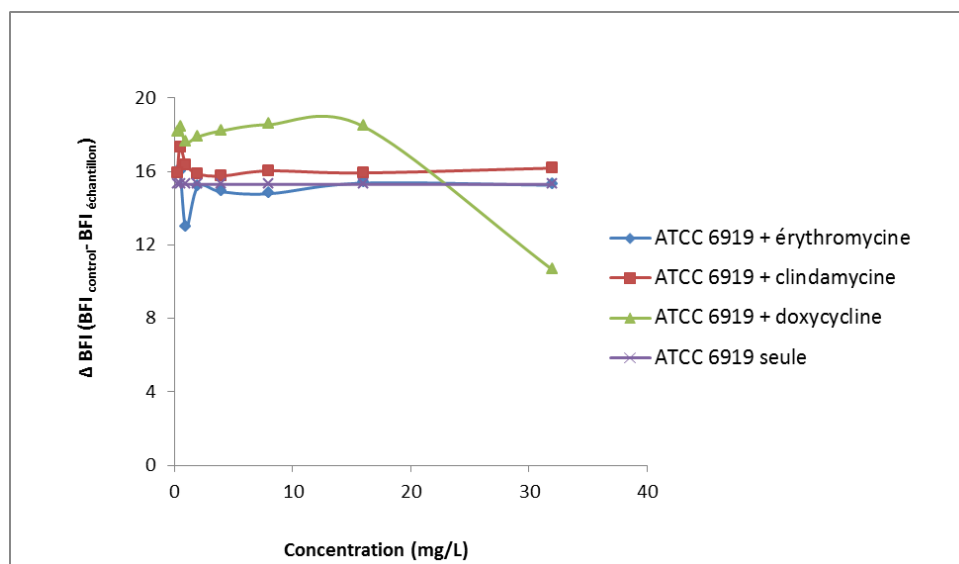
Une légère efficacité des macrolides à T3h sur la production du biofilm a été observée (Tableau 7, page 80). De façon intéressante, nous avons noté une surproduction du biofilm

pour la majorité des souches de *C. acnes* (à l'exception des souches A56, A85, A104 à T3h) en présence de doxycycline (Figure 36).

**Tableau 7 : Impact de l'ajout d'antibiotiques sur les premières étapes de formation du biofilm avec la technique du BioFilm Ring Test®**

En vert : Diminution de la production de biofilm après ajout d'antibiotique ; En jaune : pas de différence sur la production du biofilm après ajout de l'antibiotique ; En rouge : surproduction de biofilm après ajout de l'antibiotique. ATB : antibiotique

	Δ BFI sans ATB		Δ BFI érythromycine		Δ BFI clindamycine		Δ BFI doxycycline	
	T3h	T6h	T3h	T6h	T3h	T6h	T3h	T6h
<b>ATCC6919</b>	12,48	15,31						
<b>ATCC11827</b>	3,12	6,3						
<b>A47</b>	10,21	14,71						
<b>A56</b>	10,85	15,06		↘ ou =				
<b>A85</b>	10,63	15,28		↘ ou =				
<b>A104</b>	7,36	11,68	↘ ou =				↘ ou =	
<b>A132</b>	3,93	7,38						
<b>A48</b>	4,33	7,49						



**Figure 36 : Impact de l'ajout d'antibiotique sur les premières étapes de formation du biofilm de *C. acnes* : exemple de la souche ATCC 6919 à T6h avec la technique du BioFilm Ring Test®**

En bleu : Δ BFI obtenu après ajout de différentes concentrations d'érythromycine. En rouge : Δ BFI obtenu après ajout de différentes concentrations de clindamycine. En vert : Δ BFI obtenu après ajout de différentes concentrations de doxycycline. En violet : Δ BFI obtenu sans ajout d'antibiotique.



### 3-3-2. Influence de l'ajout d'une substance anti-biofilm : la Myrtacine®

L'impact de l'ajout de la Myrtacine® sur les premières phases de formation du biofilm a été étudié. Une première série d'expérience (BHI *versus* BHI + Myrtacine®) a été réalisée (Figure 37). Nous avons noté un effet paradoxal de la Myrtacine®. En effet, l'ajout de Myrtacine® dans le milieu BHI sans bactérie induisait une diminution du BFI par rapport à un milieu BHI sans Myrtacine®. Ainsi, la Myrtacine® seule semblait induire une production paradoxale de biofilm. Au regard de la potentielle interaction entre la Myrtacine® et les billes magnétiques du BRT chargées négativement, nous avons décidé de ne pas poursuivre les expériences initialement prévues avec nos différentes souches de *C. acnes*.

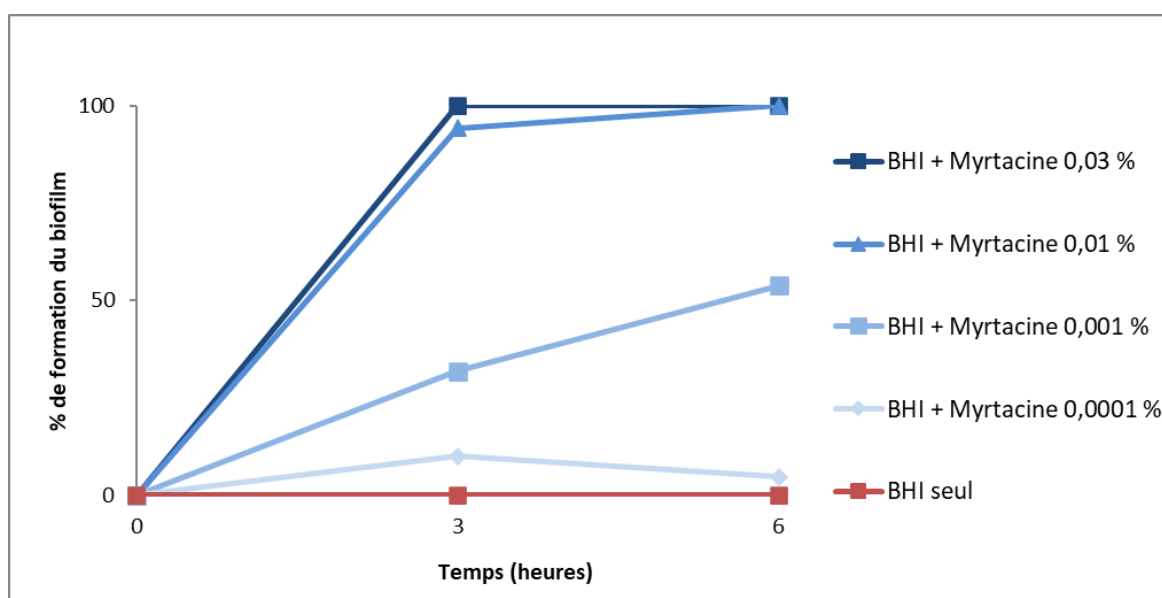


Figure 37 : Effet paradoxal de la Myrtacine® sur les billes magnétiques du BioFilm Ring Test®

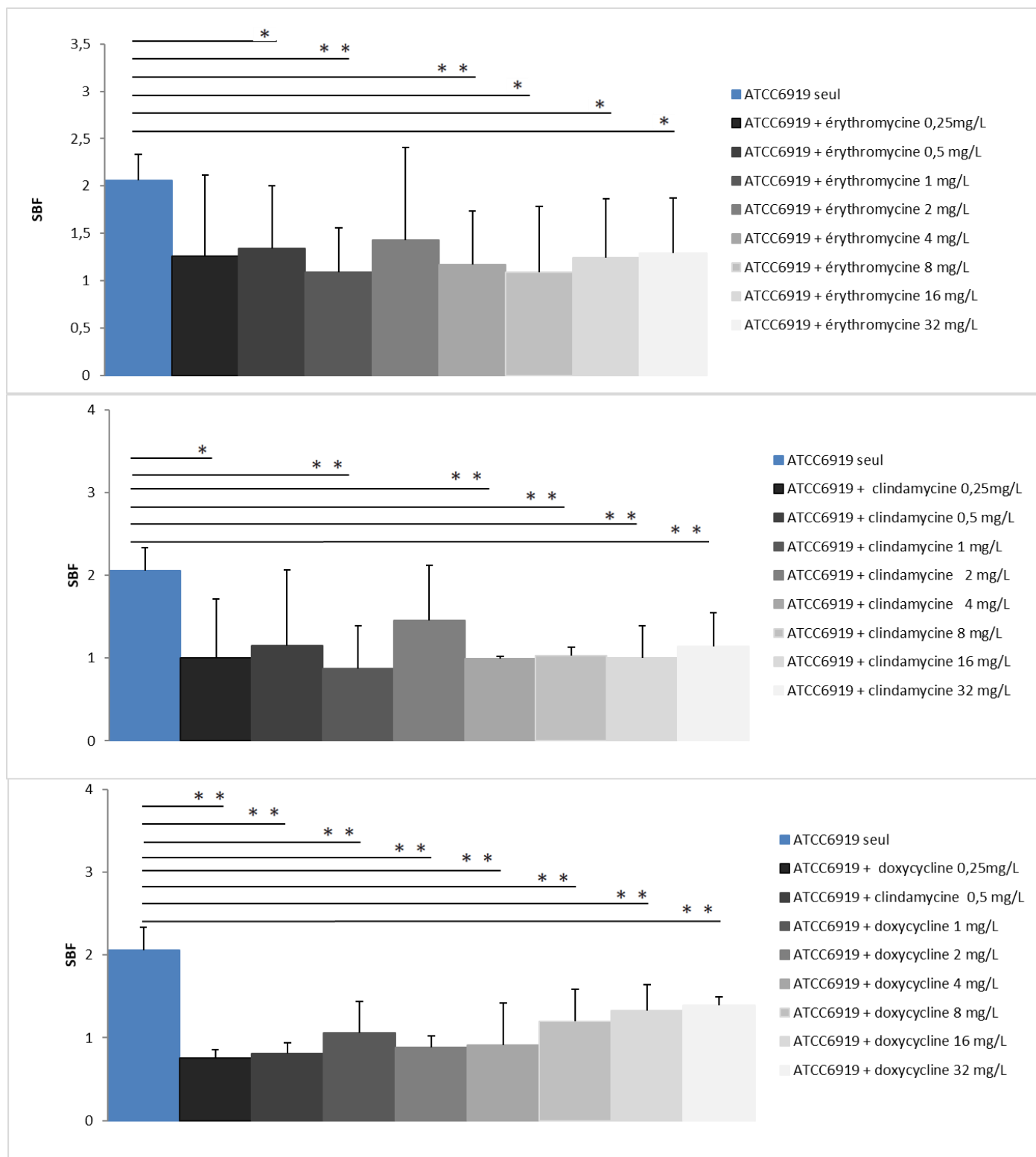
3-4. Influence de l'ajout, sur un biofilm mature, de différentes substances actives selon deux protocoles : technique du Crystal Violet

**3-4-1. Influence de l'ajout de substances actives sur la production de biofilm par huit souches de *C. acnes* : épreuve curative**

Dans cette partie, nous avons souhaité évaluer l'influence de différentes substances actives (antibiotiques et anti-biofilm) sur la capacité de production du biofilm *in vitro* de différentes souches de *C. acnes* lors d'une épreuve curative.

**Influence de l'ajout d'antibiotiques**

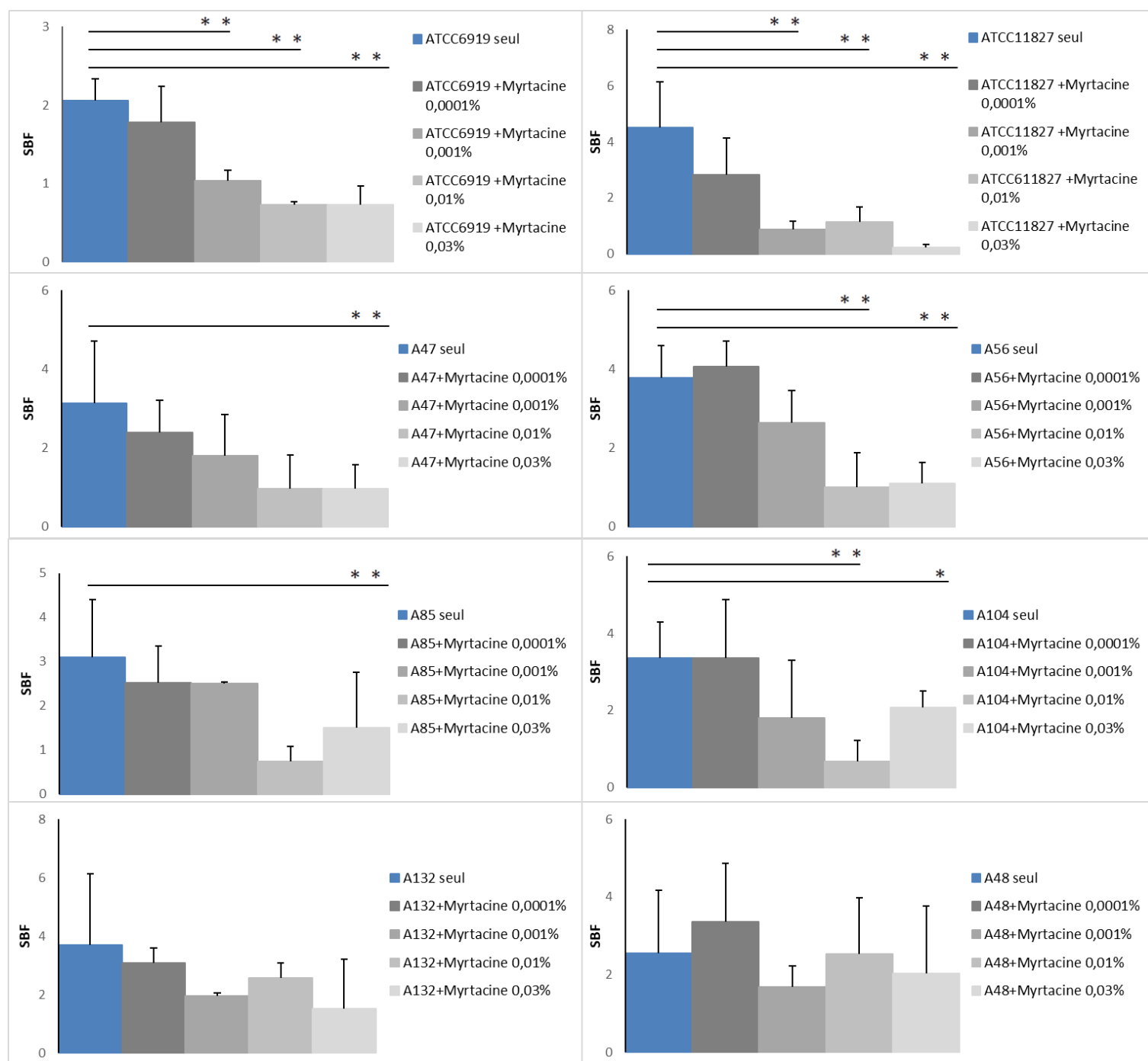
L'impact de l'ajout d'antibiotiques, dans une épreuve curative, sur un biofilm mature déjà formé, a été étudié pour l'ensemble de nos souches de *C. acnes*. Des gammes de concentrations croissantes d'antibiotiques (érythromycine, clindamycine, doxycycline) ont été réalisées allant de 0,25 à 32 mg/L. Pour chaque expérience, une souche a été testée avec chaque concentration de la gamme d'antibiotique et l'expérience a été renouvelée trois fois. Nous avons remarqué que l'ajout de ces antibiotiques induisait une diminution de la production du biofilm mature chez tous les phylotypes de *C. acnes* (Figure 38, page 83).



### **Influence de l'ajout de substance anti-biofilm : la Myrtacine®**

L'impact de l'ajout de la Myrtacine®, lors d'une épreuve curative, sur un biofilm mature déjà formé, a été étudié pour l'ensemble des souches de *C. acnes*. Une gamme de concentrations croissantes de cette molécule a été réalisée allant de 0,0001 % à 0,03 %. Pour chaque expérience, une souche a été testée, avec chaque concentration de la gamme de Myrtacine® et l'expérience a été renouvelée trois fois.

Nous avons remarqué que l'addition de cette substance induisait une diminution significative de la biomasse totale de biofilm dès l'ajout d'une concentration de 0,001 % de Myrtacine® pour toutes souches de *C. acnes* (excepté les souches A132 et A48) (Figure 39, page 85).



**Figure 39 : Impact de l'ajout de la Myrtacine® sur les différentes souches de *C. acnes* : épreuve curative**

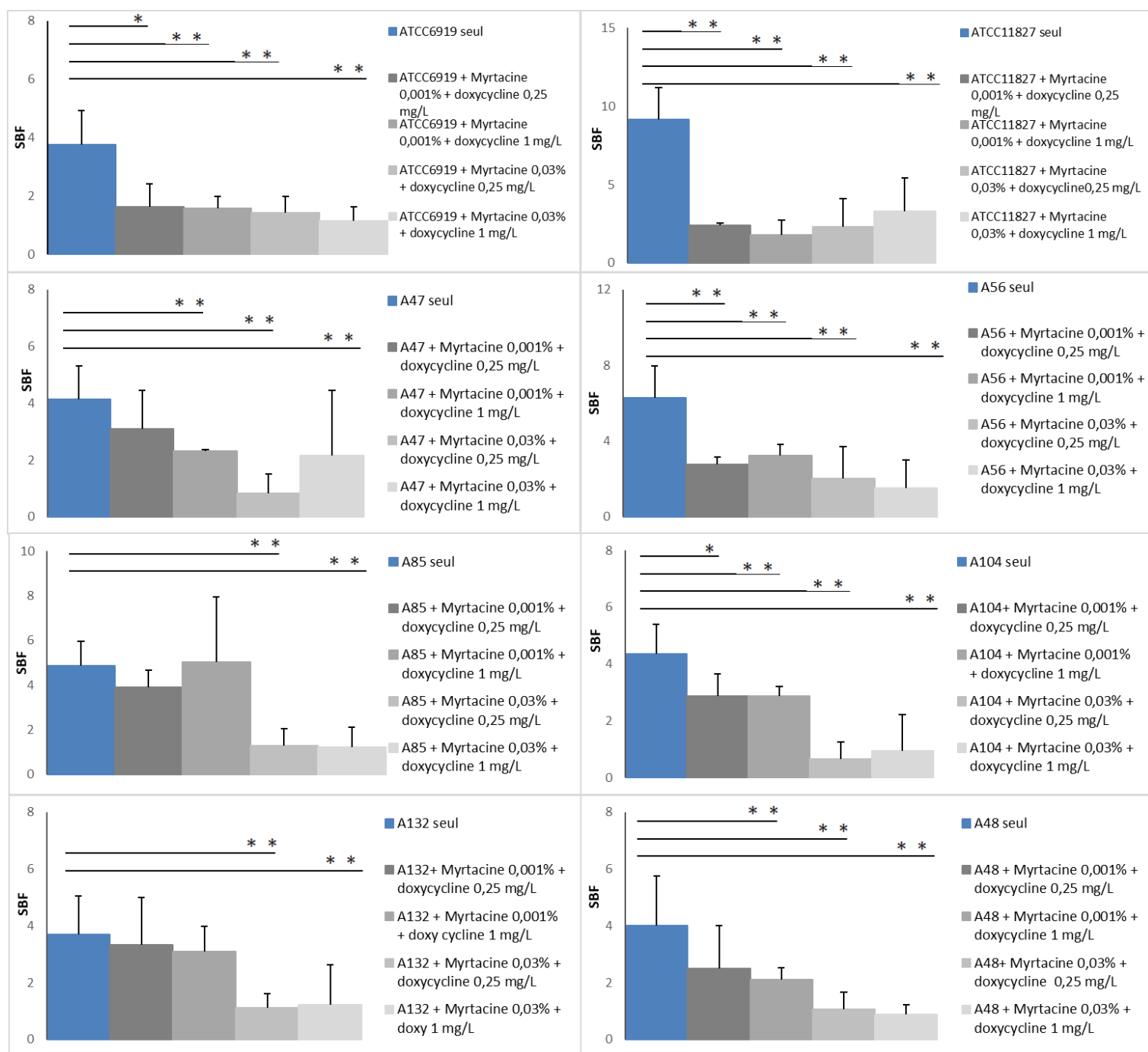
\*  $p < 0.05$  ; \* \*  $p < 0.01$

**Influence de l'ajout d'une association d'une substance anti-biofilm (Myrtacine®) et d'un antibiotique (doxycycline)**

L'impact de l'ajout de l'association Myrtacine® et doxycycline, dans une épreuve curative, sur un biofilm mature déjà formé, a été étudié pour l'ensemble de nos souches de *C. acnes*. Deux concentrations de Myrtacine® ont été réalisées : 0,001 % et 0,03 %, ainsi que deux concentrations de doxycycline 0,25 mg/L et 1 mg/L. La production totale de biofilm de chaque souche de *C. acnes* a été évaluée avec chacune des conditions suivantes :

- Myrtacine® 0,001 % et doxycycline 0,25 mg/L
- Myrtacine® 0,001 % et doxycycline 0,25 mg/L
- Myrtacine® 0,03 % et doxycycline 0,25 mg/L
- Myrtacine® 0,03 % et doxycycline 1 mg/L

Une certaine efficacité de l'association Myrtacine®/ doxycycline sur le biofilm mature des souches de *C. acnes* a été observée. De plus, l'efficacité de cette association semblait plus importante lorsqu'une concentration de 0,03 % de Myrtacine® était utilisée (Figure 40, page 87).



**Figure 40 : Impact de l'ajout de l'association Myrtacine® / doxycycline à différentes concentrations sur des souches de *C. acnes* : épreuve curative**

\*  $p < 0.05$  ; \* \*  $p < 0.01$

### **3-4-2. Influence de l'ajout de substances actives sur la production de biofilm par huit souches de *C. acnes* : épreuve préventive**

Dans cette partie, nous avons souhaité évaluer l'influence de différentes substances actives (antibiotique et anti-biofilm) sur la capacité de production du biofilm *in vitro* de différentes souches de *C. acnes* lors d'une épreuve préventive.

#### **Influence de l'ajout de la doxycycline**

L'impact de l'ajout de la doxycycline, en préventif, sur un biofilm non formé, a été étudié pour l'ensemble des souches de *C. acnes* par la technique du CV. Une gamme de concentrations croissantes a été réalisée allant de 0,25 à 2 mg/L. Pour chaque expérience, une souche a été testée avec chaque concentration de la gamme de doxycycline et l'expérience a été renouvelée trois fois.

Nous avons remarqué que l'addition de cette substance à une concentration de 2 mg/L induisait une diminution de la formation de la biomasse totale du biofilm pour l'ensemble des souches de *C. acnes* (excepté la souche A104) (Figure 41, page 89).



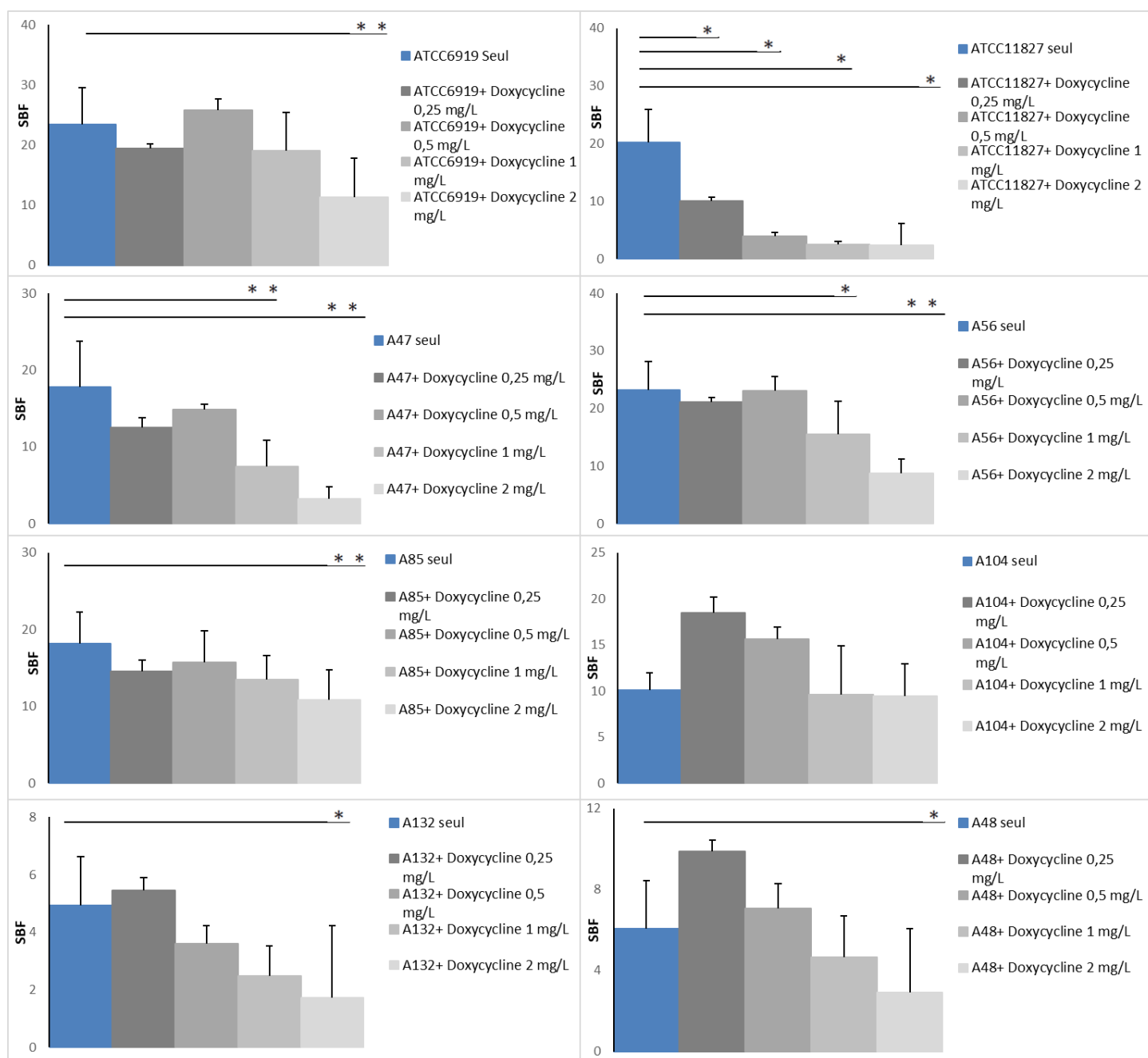


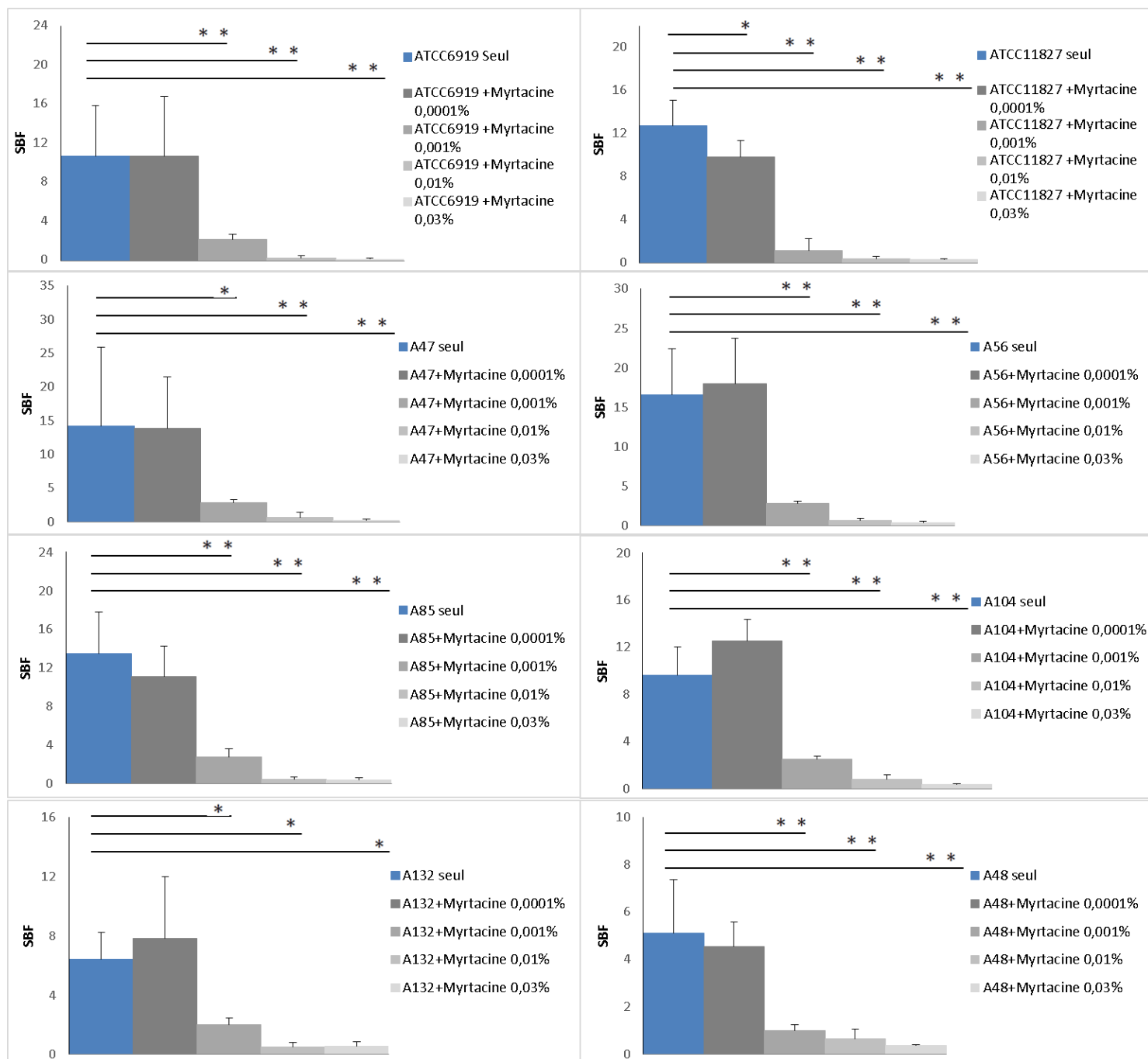
Figure 41 : Impact de l'ajout de la doxycycline sur les différentes souches de *C. acnes* : épreuve préventive

\*  $p < 0.05$  ; \* \*  $p < 0.01$

### **Influence de l'ajout de substance anti – biofilm : la Myrtacine ®**

L'impact de l'ajout de la Myrtacine®, en préventif, sur un biofilm non formé a été étudié pour l'ensemble des souches de *C. acnes* par la technique du CV. Une gamme de concentrations croissantes de cette molécule a été réalisée allant de 0,0001 % à 0,03 %. Pour chaque expérience une souche a été testée avec chaque concentration de la gamme de Myrtacine® et l'expérience a été renouvelée trois fois.

Nous avons remarqué que l'addition de cette substance induisait une diminution très significative de la formation de la biomasse totale du biofilm dès l'ajout d'une concentration de 0,001 % de Myrtacine® pour toutes les souches de *C. acnes* (Figure 42, page 91).



#### IV. Discussion

Les biofilms bactériens sont des structures hétérogènes constituées d'agrégats de populations bactériennes englobés dans une matrice. Ils constituent un réservoir de bactéries pouvant coloniser d'autres surfaces. Le rôle pathogène des biofilms est maintenant bien établi dans le développement et l'exacerbation d'infections chroniques (37–41) mais aussi dans la pathologie cutanée inflammatoire chronique qu'est l'acné. La structure complexe du biofilm permet de protéger les bactéries qu'il contient, de l'action du système immunitaire mais aussi des antibiotiques. Ainsi, il est très difficile en thérapeutique d'éradiquer un biofilm bactérien déjà installé. Il semble donc nécessaire de travailler sur ces structures complexes afin de mieux les comprendre et de pouvoir lutter contre la tolérance acquise aux antibiotiques. Plusieurs techniques existent au laboratoire pour étudier les biofilms. Dans ce travail de thèse, nous avons décidé d'étudier le biofilm de différentes souches de *C. acnes* grâce aux techniques du CV et du BRT.

Le CV est une des techniques les plus utilisées par les auteurs pour évaluer les biofilms. Cette technique permet d'étudier la biomasse totale du biofilm contenant des bactéries vivantes, mortes et l'exopolysaccharide produit (21). Cette technique, bien que très utilisée, est fastidieuse et génère de nombreux déchets toxiques. Au départ, nos résultats étaient peu reproductibles dus au décrochement du biofilm de la plaque, suite aux lavages successifs du CV. Ce décrochement était visible à l'œil nu à l'issue des différents lavages. Une étape de fixation du biofilm par du méthanol 100 % a été ajoutée dans notre protocole (192) permettant ainsi de réduire le décrochement du biofilm de la plaque 96 puits.

Une autre méthode, le BRT, a été utilisée. Cette technique permet d'évaluer plus précocement la formation de biofilm, dès l'étape d'adhérence des bactéries à la surface de la plaque. Cette technique utilise des billes magnétiques chargées négativement. Elle génère moins de déchets toxiques, et ne nécessite pas d'étape de lavage, ni de coloration permettant ainsi de limiter les variations de résultats liées à l'opérateur (28).

Nous avons pu déterminer avec la technique du BRT, trois groupes différents au sein de notre sélection de souches de *C. acnes*. Les souches appartenant aux phylotypes IA<sub>1</sub> et IA<sub>2</sub> (phylotypes majoritairement retrouvés au niveau cutané et notamment dans l'acné pour le

phylotype IA<sub>1</sub>) semblent être très fortement productrices de biofilm. Les souches appartenant aux phylotypes II, IB et III semblent produire moins de biofilm dans les premières étapes d'adhérence. A noter que les données d'adhérence obtenues avec cette technique (phase précoce du biofilm) sont perturbantes car les phylotypes IB et II sont très souvent décrits dans les infections sur matériel (193,194). De même, il est intéressant de noter que la souche ATCC 11827, appartenant au phylotype IA<sub>1</sub>, et au complexe clonal CC18 semble être la moins productrice de biofilm en termes d'adhérence précoce par la technique du BRT. Cette souche a été étudiée dans les infections ostéo-articulaires et semble avoir un comportement particulier, notamment vis-à-vis des cellules osseuses. En effet, la souche ATCC 11827 est la seule appartenant au CC18 à ne pas être internalisée par les ostéoblastes et les ostéoclastes (195). Ces différences de capacité à produire du biofilm en fonction de la phylogénie, obtenus avec la technique du BRT, sont cohérents avec les résultats publiés par Kuehnast *et al.*, en 2018 (196). Cependant, les auteurs avaient utilisé le CV pour d'étudier le biofilm.

Dans ce travail de thèse, ces trois groupes n'ont pas été retrouvés avec la technique du CV. En effet, les quatre souches les plus productrices de biofilm par la méthode du BRT apparaissaient comme faiblement ou moyennement productrices de biofilm par la méthode du CV. La corrélation entre les deux techniques n'est pas bonne. Ceci peut être expliqué car ces deux techniques évaluent le biofilm à deux étapes différentes : la méthode du CV mesure la biomasse totale d'un biofilm déjà installé (biofilm mature à 48h), alors que le BRT mesure les premières phases de formation du biofilm (biofilm précoce à 6h).

Dans une étude publiée en 2013, Crémet *et al.*, (197) ont étudié le biofilm produit par différentes souches de *Escherichia coli* par trois méthodes différentes (le CV, le BRT et la résazurine). Les auteurs ont souligné une faible reproductibilité des résultats obtenus par les différentes méthodes, et suggèrent l'influence des conditions environnementales ainsi que des milieux de culture utilisés. Ces résultats peuvent ainsi expliquer nos résultats discordants avec l'étude de Kuehnast *et al.*, (196).

L'impact des substances actives (antibiotiques et Myrtacine®) sur la capacité de nos souches à produire du biofilm a ensuite été étudié avec la méthode du CV et la technique du BRT, selon deux protocoles distincts (épreuve curative et préventive).

Dans un premier temps, une épreuve curative étudiant l'impact des antibiotiques sur la biomasse totale (CV) a été conduite. Une certaine efficacité de tous les antibiotiques (érythromycine, clindamycine, doxycycline) a été observée pour l'ensemble des souches de *C. acnes*. Cependant, une faible différence en termes de diminution de la biomasse totale a été observée, en fonction de la concentration en antibiotiques.

Suite à ces résultats encourageants, la même épreuve a été effectuée avec la technique du BRT évaluant les premières étapes de formation du biofilm. Une légère diminution du biofilm avec les macrolides à T3h a été notée. De manière surprenante, nous avons observé une surproduction de biofilm lorsque nous co-incubons les souches de *C. acnes* avec de la doxycycline (0,25 à 16 mg/L). L'hypothèse soulevée serait que la doxycycline induirait un stress chez la bactérie, qui pour se « défendre » produirait plus de biofilm. Cette hypothèse reste encore à étudier. A une concentration de 32 mg/L, la doxycycline semble diminuer la quantité de biofilm produit, ce qui nous laisserait penser qu'à de fortes concentrations, la doxycycline diminuerait la quantité de biofilm. Cette tendance est un leurre du résultat puisque dans nos expériences le BFI du témoin négatif était anormalement bas induisant ainsi un  $\Delta$ BFI faussement faible pour la doxycycline à une concentration de 32 mg/L. Cela peut être expliqué par le fait que la doxycycline est une grosse molécule chargée positivement et peut interférer dans le milieu de réaction avec les billes magnétiques chargées négativement (donnée du fournisseur). Ainsi, cette interaction induirait une immobilisation de nos billes magnétiques. Le laboratoire commercialisant le BRT, nous a confirmé que ce phénomène avait été précédemment observé avec un autre antibiotique la colistine.

Les mêmes séries d'épreuves curatives ont été effectuées en ajoutant de la Myrtacine®. L'ajout de la Myrtacine® sur un biofilm déjà formé a d'abord été évalué avec la technique du CV. Nous avons observé une diminution significative de la biomasse totale du biofilm mature avec l'ajout de Myrtacine® 0,03 % pour l'ensemble des souches de *C. acnes* (à l'exception

des souches A132 et A48). Ces résultats très intéressants, ont permis de valider notre méthode de CV puisqu'ils étaient cohérents avec les résultats publiés par Feuillolay *et al.*, obtenus seulement avec la seule souche ATCC6919 (84).

L'impact de l'ajout de la Myrtacine® sur les premières phases de formation du biofilm a été étudié en utilisant la technique du BRT. Malheureusement, un effet paradoxal de la Myrtacine® a été observé. En effet, l'ajout de Myrtacine® dans le milieu BHI sans bactéries induisant une diminution du BFI par rapport à un milieu BHI sans Myrtacine®. Ainsi, la Myrtacine® seule semblait induire la production de biofilm. Au regard de la potentielle interaction entre la Myrtacine® et les billes magnétiques du BRT chargées négativement, nous n'avons pas pu poursuivre les investigations et les expériences initialement prévues avec la Myrtacine®.

Une dernière épreuve curative consistant en l'association Myrtacine® / doxycycline a été testée. Une diminution significative de la biomasse du biofilm a été observé pour l'ensemble de nos souches. Plusieurs associations de concentrations de Myrtacine® et de doxycycline ont été étudiées. De façon intéressante, nous avons noté que la substance ayant le plus grand impact sur la diminution du biofilm mature était la Myrtacine®.

Au regard de ces différents résultats obtenus lors des épreuves curatives, la Myrtacine® semble être une potentielle bonne molécule pour une utilisation en Dermato cosmétologie.

Suite à ces résultats d'épreuves curatives, très encourageants et intéressants, concernant notamment l'impact de la Myrtacine® sur la biomasse totale d'un biofilm déjà formé, nous avons souhaité étudier son impact ainsi que celui de la doxycycline (antibiotique très utilisé en dermatologie) sur un biofilm pas encore formé, c'est-à-dire en effectuant une épreuve préventive.

L'ajout de différentes concentrations de doxycycline dans le milieu de culture avant la formation du biofilm n'a révélé aucune différence significative sur la formation du biofilm mature. Ces résultats laissent penser que l'utilisation de la doxycycline en préventif que cela soit à dose antimicrobienne ou à dose anti-inflammatoire, n'aurait pas d'impact sur la formation du biofilm de *C. acnes*. Ainsi, l'utilisation de cet antibiotique en préventif ne semble pas justifié.

Une épreuve préventive a été conduite en ajoutant dans le milieu de culture de la Myrtacine®. Nous avons observé un effet majeur, très significatif sur la diminution de la formation du biofilm dès l'ajout de Myrtacine® 0,001 % pour l'ensemble des souches de *C. acnes*. Ce résultat est pertinent et permet d'envisager une place particulière de cette molécule dans la prise en charge thérapeutique des patients acnéiques.

Les conditions environnementales (température, oxygène, pH) et les milieux de cultures, semblent impacter *in vitro* la capacité des souches à produire du biofilm (8). Dans ce travail, nous n'avons pas étudié l'impact de ces différents paramètres sur la formation de biofilm des souches de *C. acnes*. Cependant l'environnement de l'unité pilo-sébacée est lipidique, il serait donc intéressant de reproduire ces expériences avec différents milieux de cultures (BHI, thiglyconate (196), BCC) supplémentés en tween, voire à mener des investigations sur cette collection de souches bien caractérisées avec un dispositif dynamique d'évaluation du biofilm.

Les résultats présentés restent préliminaires, mais semblent confirmer la très grande variabilité dans la capacité à produire du biofilm des souches de *C. acnes* (196). Les souches de *C. acnes* appartenant aux phylotypes IA<sub>1</sub> et IA<sub>2</sub>, principalement retrouvées au niveau cutanée et dans l'acné, semblent être plus productrices de biofilm, dès les premières étapes d'adhérence que les autres phylotypes, notamment le phylotype IB connu pour être impliqué dans le développement d'infection ostéo-articulaire (193,194). L'impact des substances actives sur la formation du biofilm reste encore à approfondir mais la Myrtacine® semble être un bon candidat pour diminuer la production de biofilm tant en curatif mais qu'en préventif.

Toutes ces expériences ont été réalisées à partir de huit souches de *C. acnes*, sélectionnées dans la collection du laboratoire du service de Bactériologie et des contrôles microbiologiques et issues d'une étude précédemment menée au CHU de Nantes dans le service de Dermatologie afin de déterminer les phylotypes de *C. acnes* majoritairement retrouvés chez des patients acnéiques.

Toutefois, *C. acnes* est aussi un pathogène opportuniste, responsable d'infections chroniques ostéo-articulaires, après pose de prothèses ou de matériels (198). La production



d'un biofilm pose alors un véritable problème pour l'éradication de cette bactérie. Il serait donc intéressant d'élargir notre étude en incluant plus d'isolats appartenant au phylotype IB (193) (phylotype impliqué dans le développement d'infections ostéo-articulaires) de différents complexes clonaux (CC36 et CC53 si prothèse et CC18 et CC28 pour le rachis (115)), et d'évaluer l'impact de certains antibiotiques plus utilisés en orthopédie comme l'amoxicilline, la ceftriaxone, ou la rifampicine ainsi que de la Myrtacine® sur le développement du biofilm.

## Références

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 21 mai 1999;284(5418):1318-22.
2. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. févr 2004;2(2):95-108.
3. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can Vet Res*. 2014;78(78):110-6.
4. Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol*. juill 2005;156(5-6):626-33.
5. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*. oct 1998;30(2):295-304.
6. Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 juin 2001;98(12):6911-6.
7. Wang H, Sodagari M, Chen Y, He X, Newby BZ, Ju L-K. Initial bacterial attachment in slow flowing systems: effects of cell and substrate surface properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 15 oct 2011;87(2):415-22.
8. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:249-89.
9. Roux A, Ghigo J-M. Les biofilms bactériens. *Bull Académie Vét Fr*. 2006;(1):261.
10. Tenke P, Kovacs B, Jäckel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World J Urol*. févr 2006;24(1):13-20.
11. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. sept 2016;14(9):563-75.
12. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol*. avr 1994;176(8):2137-42.
13. Tolker-Nielsen null, Molin null. Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microb Ecol*. août 2000;40(2):75-84.
14. Behlau I, Gilmore MS. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960. nov 2008;126(11):1572-81.
15. Coenye T, Peeters E, Nelis HJ. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res Microbiol*. mai 2007;158(4):386-92.

16. Sutherland IW. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* mai 2001;9(5):222-7.
17. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol.* oct 1991;173(20):6558-67.
18. Saur T. Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces: de l'adhésion au biofilm mature [Thèse de doctorat: Sciences des Procédés-Sciences des Aliments]. [Montpellier]: Montpellier 2; 2014.
19. Flemming HC, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res.* 2001;43(6):1-8.
20. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* sept 2010;8(9):623-33.
21. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* déc 1985;22(6):996-1006.
22. Extremina CI, Costa L, Aguiar AI, Peixe L, Fonseca AP. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods.* févr 2011;84(2):167-73.
23. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods.* févr 2008;72(2):157-65.
24. Toté K, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett Appl Microbiol.* févr 2008;46(2):249-54.
25. Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L, et al. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Curr Microbiol.* oct 2016;73(4):474-82.
26. Punithavathy PM, Nalina K, Menon T. Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian J Pathol Microbiol.* mars 2012;55(1):72-4.
27. Jiang L-M, Hoogenkamp MA, van der Sluis LWM, Wesselink PR, Crielaard W, Deng DM. Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *J Endod.* janv 2011;37(1):31-5.
28. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods.* mars 2007;68(3):605-12.

29. Tolker-Nielsen T, Sternberg C. Methods for studying biofilm formation: flow cells and confocal laser scanning microscopy. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1149:615-29.
30. Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, Aguilar C, Kolter R. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:1-16.
31. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire*. avr 2002;66(2):86-92.
32. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. janv 2005;13(1):34-40.
33. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:107-31.
34. Lebeaux D, Ghigo J-M. Infections associées aux biofilms: Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? médecine/sciences. 2012;28(8-9):727-39.
35. Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett*. 1 août 1999;177(1):63-6.
36. Khoury AE, Lam K, Ellis B, Costerton JW. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO J Am Soc Artif Intern Organs* 1992. sept 1992;38(3):M174-178.
37. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J*. oct 2009;30(19):2369-413.
38. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. 12 oct 2000;407(6805):762-4.
39. Linfante A, Allawh RM, Allen HB. The Role of *Propionibacterium acnes* Biofilm in Acne Vulgaris. *J Clin Exp Dermatol Res*. 2017;09(01).
40. Justice SS, Hunstad DA, Seed PC, Hultgren SJ. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci*. 26 déc 2006;103(52):19884-9.
41. Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*. déc 1982;66(6):1339-41.

42. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin Microbiol Rev. avr 2002;15(2):167-93.
43. Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol. août 2010;59(3):227-38.
44. Trautner BW, Darouiche RO. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. Am J Infect Control. mai 2004;32(3):177-83.
45. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. Virulence. 1 janv 2018;9(1):522-54.
46. Haute Autorité de Santé. Recommandation de bonne pratique - Prothèse de hanche ou de genou : diagnostic et prise en charge de l'infection dans le mois suivant l'implantation. 2014.
47. Rodríguez-Martínez JM, Ballesta S, Pascual A. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Antimicrob Agents. oct 2007;30(4):366-8.
48. Landersdorfer CB, Bulitta JB, Kinzig M, Holzgrabe U, Sörgel F. Penetration of antibacterials into bone: pharmacokinetic, pharmacodynamic and bioanalytical considerations. Clin Pharmacokinet. 2009;48(2):89-124.
49. Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. Appl Microbiol Biotechnol. mars 2016;100(5):2141-51.
50. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother. juin 2011;55(6):2655-61.
51. Dréno B. Données récentes sur l'épidémiologie de l'acné. Ann Dermatol Vénéréologie. nov 2010;137:S49-51.
52. Dréno B, Pécastaings S, Corvec S, Veraldi S, Khammari A, Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV. juin 2018;32 Suppl 2:5-14.
53. Park S-Y, Kim HS, Lee SH, Kim S. Characterization and Analysis of the Skin Microbiota in Acne: Impact of Systemic Antibiotics. J Clin Med. 8 janv 2020;9(1).
54. Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. Médecine Mal Infect. 1 juin 2014;44(6):241-50.

55. Zouboulis CC. Acne and sebaceous gland function. Clin Dermatol. oct 2004;22(5):360-6.
56. Dréno B. Physiopathologie de l'acné. Presse Médicale. 1 avr 2005;34(7):537-9.
57. Dreno B. L'acné : actualités. J Pédiatrie Puériculture. 1 oct 2010;23(5):249-53.
58. Ristow HJ, Messmer TO. Basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor I are strong mitogens for cultured mouse keratinocytes. J Cell Physiol. nov 1988;137(2):277-84.
59. Krane JF, Murphy DP, Carter DM, Krueger JG. Synergistic effects of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I/somatomedin C (IGF-I) on keratinocyte proliferation may be mediated by IGF-I transmodulation of the EGF receptor. J Invest Dermatol. avr 1991;96(4):419-24.
60. Barreca A, De Luca M, Del Monte P, Bondanza S, Damonte G, Cariola G, et al. In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors. J Cell Physiol. mai 1992;151(2):262-8.
61. Valentinis B, Baserga R. IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. Mol Pathol MP. juin 2001;54(3):133-7.
62. Sadagurski M, Yakar S, Weingarten G, Holzenberger M, Rhodes CJ, Breitkreutz D, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor signaling regulates skin development and inhibits skin keratinocyte differentiation. Mol Cell Biol. avr 2006;26(7):2675-87.
63. Smith TM, Cong Z, Gilliland KL, Clawson GA, Thiboutot DM. Insulin-like growth factor-1 induces lipid production in human SEB-1 sebocytes via sterol response element-binding protein-1. J Invest Dermatol. juin 2006;126(6):1226-32.
64. Chiu A, Chon SY, Kimball AB. The response of skin disease to stress: changes in the severity of acne vulgaris as affected by examination stress. Arch Dermatol. juill 2003;139(7):897-900.
65. Isard O, Knol A-C, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dréno B. Cutaneous induction of corticotropin releasing hormone by *Propionibacterium acnes* extracts. Dermatoendocrinol. mars 2009;1(2):96-9.
66. Lee WJ, Jung HD, Lee HJ, Kim BS, Lee S-J, Kim DW. Influence of substance-P on cultured sebocytes. Arch Dermatol Res. juill 2008;300(6):311-6.
67. Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Kagoura M, Morohashi M. Sebaceous glands in acne patients express high levels of neutral endopeptidase. Exp Dermatol. juin 2002;11(3):241-7.
68. Farrar MD, Ingham E. Acne: inflammation. Clin Dermatol. oct 2004;22(5):380-4.

69. Jribi M, Boussofara L, Bougmiza I, Aounallah A, Saidi W, Mokni S, et al. Corrélation clinique et psychologique dans l'acné: utilisation des scores ECLA, CADI et Skindex 16. *Ann Dermatol Venereol.* déc 2015;
70. Dreno B, Bodokh I, Chivot M, Daniel F, Humbert P, Poli F, et al. [ECLA grading: a system of acne classification for every day dermatological practice]. *Ann Dermatol Venereol.* févr 1999;126(2):136-41.
71. Dréno B, Poli F, Pawin H, Beylot C, Faure M, Chivot M, et al. Development and evaluation of a Global Acne Severity Scale (GEA Scale) suitable for France and Europe. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* janv 2011;25(1):43-8.
72. Société Française de Dermatologie, Haute Autorité de Santé, Collège des Enseignants en Dermatologie de France, Fédération Française de Formation Continue et d'Evaluation en Dermatologie-Vénéréologie. Dossier de presse- Acne: quand et comment la traiter? 2015.
73. Ballanger F, Baudry P, N'Guyen JM, Khammari A, Dréno B. Heredity: a prognostic factor for acne. *Dermatol Basel Switz.* 2006;212(2):145-9.
74. Claudel JP, Auffret N, Leccia MT, Poli F, Dréno B. Acne and nutrition: hypotheses, myths and facts. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* oct 2018;32(10):1631-7.
75. Revuz J. [Polymorphous juvenile acne and adult acne]. *Ann Dermatol Venereol.* janv 2003;130(1 Pt 2):113-6.
76. Cambazard F. [Neonatal, infantile and pre-puberty acne]. *Ann Dermatol Venereol.* janv 2003;130(1 Pt 2):107-12.
77. Humbert P. [Severe acne]. *Ann Dermatol Venereol.* janv 2003;130(1 Pt 2):117-20.
78. Bhate K, Williams HC. Epidemiology of acne vulgaris. *Br J Dermatol.* mars 2013;168(3):474-85.
79. Marie Le Moigne. Epidémiologie de l'acné modérée à sévère : Isotrétinoïne et risque psychiatrique [Thèse de doctorat : Biologie-Santé]. [Nantes]: Nantes; 2017.
80. Société Française de Dermatologie. Traitement de l'acné par voie locale et générale - Texte des recommandations. 2015.
81. Eady EA, Farmery MR, Ross JI, Cove JH, Cunliffe WJ. Effects of benzoyl peroxide and erythromycin alone and in combination against antibiotic-sensitive and -resistant skin bacteria from acne patients. *Br J Dermatol.* sept 1994;131(3):331-6.
82. Brodersen DE, Clemons WM, Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell.* 22 déc 2000;103(7):1143-54.

83. Saint-Jean M, Dreno B. Acné. 31 mai 2016;
84. Feuillolay C, Pecastaings S, Gac CL, Fiorini-Puybaret C, Luc J, Joulia P, et al. A Myrtus communis extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. Phytomedicine. mars 2016;23(3):307-15.
85. Wang Y, Hata TR, Tong YL, Kao M-S, Zouboulis CC, Gallo RL, et al. The Anti-Inflammatory Activities of *Propionibacterium acnes* CAMP Factor-Targeted Acne Vaccines. J Invest Dermatol. 1 nov 2018;138(11):2355-64.
86. Contassot E. Vaccinating against Acne: Benefits and Potential Pitfalls. J Invest Dermatol. nov 2018;138(11):2304-6.
87. Keshari S, Kumar M, Balasubramaniam A, Chang T-W, Tong Y, Huang C-M. Prospects of acne vaccines targeting secreted virulence factors of *Cutibacterium acnes*. Expert Rev Vaccines. mai 2019;18(5):433-7.
88. Orla-Jensen S. Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystems. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infekt Hyg Abt II. 1909;22:305-46.
89. Ebersson. J Infect Dis. 1918;23:29.
90. Douglas HC, Gunter SE. The taxonomic position of *Corynebacterium acnes*. J Bacteriol. juill 1946;52:15-23.
91. Achermann Y, Goldstein EJC, Coenye T, Shirtliff ME. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. Clin Microbiol Rev. juill 2014;27(3):419-40.
92. Douglas HC, Gunter SE. The taxonomic position of *Corynebacterium acnes*. J Bacteriol. juill 1946;52:15-23.
93. Patrick S, McDowell A. *Propionibacterium*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. American Cancer Society; 2015. p. 1-29.
94. Scholz CFP, Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol. nov 2016;66(11):4422-32.
95. Abeijón Mukdsi MC, Falentin H, Maillard M-B, Chuat V, Medina RB, Parayre S, et al. The secreted esterase of *Propionibacterium freudenreichii* has a major role in cheese lipolysis. Appl Environ Microbiol. janv 2014;80(2):751-6.



96. Corvec S, Dagnelie M-A, Khammari A, Dréno B. Taxonomy and phylogeny of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* in inflammatory skin diseases. *Ann Dermatol Venereol.* janv 2019;146(1):26-30.
97. McDowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney MM, Glenn JV, McLorinan GC, et al. *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. *J Clin Microbiol.* janv 2005;43(1):326-34.
98. McDowell A, Perry AL, Lambert PA, Patrick S. A new phylogenetic group of *Propionibacterium acnes*. *J Med Microbiol.* févr 2008;57(Pt 2):218-24.
99. McDowell A, Hunyadkürti J, Horváth B, Vörös A, Barnard E, Patrick S, et al. Draft genome sequence of an antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* strain, PRP-38, from the novel type IC cluster. *J Bacteriol.* juin 2012;194(12):3260-1.
100. McDowell A, Barnard E, Nagy I, Gao A, Tomida S, Li H, et al. An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium acnes*: investigation of « pathogenic », « commensal » and antibiotic resistant strains. *PloS One.* 2012;7(7):e41480.
101. Dekio I, Culak R, Misra R, Gaulton T, Fang M, Sakamoto M, et al. Dissecting the taxonomic heterogeneity within *Propionibacterium acnes*: proposal for *Propionibacterium acnes* subsp. *acnes* subsp. nov. and *Propionibacterium acnes* subsp. *elongatum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* déc 2015;65(12):4776-87.
102. McDowell A, Barnard E, Liu J, Li H, Patrick S. Corrigendum: Proposal to reclassify *Propionibacterium acnes* type I as *Propionibacterium acnes* subsp. *acnes* subsp. nov. and *Propionibacterium acnes* type II as *Propionibacterium acnes* subsp. *defendens* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(11):4880.
103. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol.* avr 2011;9(4):244-53.
104. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.* 29 mai 2009;324(5931):1190-2.
105. Hall GS, Pratt-Rippin K, Meisler DM, Washington JA, Roussel TJ, Miller D. Growth curve for *Propionibacterium acnes*. *Curr Eye Res.* juin 1994;13(6):465-6.
106. Corvec S, Luchetta J, Aubin GG. Is hemolysis a clinical marker of *Propionibacterium acnes* orthopedic infection or a phylogenetic marker? *Am J Orthop Belle Mead NJ.* mars 2015;44(3):E61-62.
107. Brüggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A, et al. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science.* 30 juill 2004;305(5684):671-3.
108. Brüggemann H. Insights in the pathogenic potential of *Propionibacterium acnes* from its complete genome. *Semin Cutan Med Surg.* juin 2005;24(2):67-72.

109. Holland C, Mak TN, Zimny-Arndt U, Schmid M, Meyer TF, Jungblut PR, et al. Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes*. BMC Microbiol. 27 août 2010;10:230.
110. Valanne S, McDowell A, Ramage G, Tunney MM, Einarsson GG, O'Hagan S, et al. CAMP factor homologues in *Propionibacterium acnes*: a new protein family differentially expressed by types I and II. Microbiol Read Engl. mai 2005;151(Pt 5):1369-79.
111. Nakatsuji T, Tang DC, Zhang L, Gallo RL, Huang C-M. *Propionibacterium acnes* CAMP factor and host acid sphingomyelinase contribute to bacterial virulence: potential targets for inflammatory acne treatment. PloS One. 12 avr 2011;6(4):e14797.
112. Lheure C, Grange PA, Ollagnier G, Morand P, Désiré N, Sayon S, et al. TLR-2 Recognizes *Propionibacterium acnes* CAMP Factor 1 from Highly Inflammatory Strains. PLoS ONE. 30 nov 2016;11(11).
113. Mayslich C, Grange PA, Dupin N. *Cutibacterium acnes* as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors. Microorganisms. 2 févr 2021;9(2):303.
114. Vlassova N, Han A, Zenilman JM, James G, Lazarus GS. New horizons for cutaneous microbiology: the role of biofilms in dermatological disease. Br J Dermatol. oct 2011;165(4):751-9.
115. Aubin GG, Lavigne J-P, Foucher Y, Dellièvre S, Lepelletier D, Gouin F, et al. Tropism and virulence of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* involved in implant-associated infection. Anaerobe. oct 2017;47:73-8.
116. Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR, et al. Detection of Prosthetic Hip Infection at Revision Arthroplasty by Immunofluorescence Microscopy and PCR Amplification of the Bacterial 16S rRNA Gene. J Clin Microbiol. oct 1999;37(10):3281-90.
117. Holmberg A, Lood R, Mörgelin M, Söderquist B, Holst E, Collin M, et al. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. août 2009;15(8):787-95.
118. Furustrand Tabin U, Corvec S, Betrisey B, Zimmerli W, Trampuz A. Role of rifampin against *Propionibacterium acnes* biofilm in vitro and in an experimental foreign-body infection model. Antimicrob Agents Chemother. avr 2012;56(4):1885-91.
119. Jahns AC, Eilers H, Alexeyev OA. Transcriptomic analysis of *Propionibacterium acnes* biofilms in vitro. Anaerobe. déc 2016;42:111-8.
120. Bayston R, Ashraf W, Barker-Davies R, Tucker E, Clement R, Clayton J, et al. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* on biomaterials in vitro and in vivo: impact on diagnosis and treatment. J Biomed Mater Res A. 1 juin 2007;81(3):705-9.

121. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:677-701.
122. Qi X, Gao J, Sun D, Liang W, Wan Y, Li C, et al. Biofilm formation of the pathogens of fatal bacterial granuloma after trauma: potential mechanism underlying the failure of traditional antibiotic treatments. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(3):221-8.
123. Ramage G, Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR. Formation of *Propionibacterium acnes* biofilms on orthopaedic biomaterials and their susceptibility to antimicrobials. *Biomaterials.* août 2003;24(19):3221-7.
124. Jahns AC, Lundskog B, Ganceviciene R, Palmer RH, Golovleva I, Zouboulis CC, et al. An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: a case-control study. *Br J Dermatol.* juill 2012;167(1):50-8.
125. Lee YB, Byun EJ, Kim HS. Potential Role of the Microbiome in Acne: A Comprehensive Review. *J Clin Med.* 07 2019;8(7).
126. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol.* 2012;3:79.
127. Kang SSW, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol.* juin 2006;54(6):951-83; quiz 983-6.
128. Renaud C. L'acné : une pathologie multifactorielle - Facteurs de risques et traitements [Thèse d'exercice : pharmacie]. de Lorraine; 2014.
129. Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quereux G, Khammari A, et al. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol.* déc 2005;153(6):1105-13.
130. Dessinioti C, Katsambas AD. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clin Dermatol.* févr 2010;28(1):2-7.
131. Kim J. Review of the innate immune response in acne vulgaris: activation of Toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *Dermatol Basel Switz.* 2005;211(3):193-8.
132. Yu Y, Champer J, Agak GW, Kao S, Modlin RL, Kim J. Different *Propionibacterium acnes* Phylotypes Induce Distinct Immune Responses and Express Unique Surface and Secreted Proteomes. *J Invest Dermatol.* 2016;136(11):2221-8.
133. Baranova IN, Kurlander R, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Chen Z, Remaley AT, et al. Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 nov 2008;181(10):7147-56.
134. Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, Urbán E, Kemény L. Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8

- expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J Invest Dermatol.* mai 2005;124(5):931-8.
135. Grange PA, Weill B, Dupin N, Batteux F. Does inflammatory acne result from imbalance in the keratinocyte innate immune response? *Microbes Infect.* déc 2010;12(14-15):1085-90.
  136. Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, et al. *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect.* juill 2006;8(8):2195-205.
  137. Beylot C, Auffret N, Poli F, Claudel J-P, Leccia M-T, Del Giudice P, et al. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* mars 2014;28(3):271-8.
  138. Shaheen B, Gonzalez M. Acne sans *P. acnes*. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* janv 2013;27(1):1-10.
  139. Jamilloux Y, Henry T. Les inflammasomes - Plates-formes de l'immunité innée. *médecine/sciences.* 1 nov 2013;29(11):975-84.
  140. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* mars 2009;10(3):241-7.
  141. Qin M, Pirouz A, Kim M-H, Krutzik SR, Garbán HJ, Kim J. *Propionibacterium acnes* Induces IL-1 $\beta$  secretion via the NLRP3 inflammasome in human monocytes. *J Invest Dermatol.* févr 2014;134(2):381-8.
  142. Kistowska M, Gehrke S, Jankovic D, Kerl K, Fettelschoss A, Feldmeyer L, et al. IL-1 $\beta$  drives inflammatory responses to *Propionibacterium acnes* in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol.* mars 2014;134(3):677-85.
  143. Selway JL, Kurczab T, Kealey T, Langlands K. Toll-like receptor 2 activation and comedogenesis: implications for the pathogenesis of acne. *BMC Dermatol.* 6 sept 2013;13:10.
  144. Graham GM, Farrar MD, Cruse-Sawyer JE, Holland KT, Ingham E. Proinflammatory cytokine production by human keratinocytes stimulated with *Propionibacterium acnes* and *P. acnes* GroEL. *Br J Dermatol.* mars 2004;150(3):421-8.
  145. Akaza N, Akamatsu H, Kishi M, Mizutani H, Ishii I, Nakata S, et al. Effects of *Propionibacterium acnes* on various mRNA expression levels in normal human epidermal keratinocytes in vitro. *J Dermatol.* avr 2009;36(4):213-23.

146. Jarrousse V. Rôle de *P. acnes* dans la différenciation kératinocytaire et l'immunité innée kératinocytaire [Thèse de doctorat: Chimie biologie]. [Nantes]: Nantes Faculté de médecine; 2006.
147. Jarrousse V, Castex-Rizzi N, Khammari A, Charveron M, Dréno B. Modulation of integrins and filaggrin expression by *Propionibacterium acnes* extracts on keratinocytes. Arch Dermatol Res. nov 2007;299(9):441-7.
148. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res. sept 2001;305(3):285-98.
149. Trivedi NR, Gilliland KL, Zhao W, Liu W, Thiboutot DM. Gene array expression profiling in acne lesions reveals marked upregulation of genes involved in inflammation and matrix remodeling. J Invest Dermatol. mai 2006;126(5):1071-9.
150. Kim J, Ochoa M-T, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, et al. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. J Immunol Baltim Md 1950. 1 août 2002;169(3):1535-41.
151. Isard O, Knol AC, Ariès MF, Nguyen JM, Khammari A, Castex-Rizzi N, et al. *Propionibacterium acnes* activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and induces keratinocyte proliferation. J Invest Dermatol. janv 2011;131(1):59-66.
152. Auffret N. Avancées physiopathologiques dans l'acné. Ann Dermatol Vénéréologie. nov 2010;137:S52-6.
153. Iinuma K, Sato T, Akimoto N, Noguchi N, Sasatsu M, Nishijima S, et al. Involvement of *Propionibacterium acnes* in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands in vivo and in vitro. J Invest Dermatol. sept 2009;129(9):2113-9.
154. Vora S, Ovhal A, Jerajani H, Nair N, Chakraborty A. Correlation of facial sebum to serum insulin-like growth factor-1 in patients with acne. Br J Dermatol. sept 2008;159(4):990-1.
155. Burkhart CG, Burkhart CN. Expanding the microcomedone theory and acne therapeutics: *Propionibacterium acnes* biofilm produces biological glue that holds corneocytes together to form plug. J Am Acad Dermatol. oct 2007;57(4):722-4.
156. Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne J-P. Le microbiote cutané : étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité. Rev Francoph Lab. févr 2015;2015(469):51-8.
157. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proc Natl Acad Sci. 29 juin 2010;107(26):11971-5.
158. Sanford JA, Gallo RL. Functions of the skin microbiota in health and disease. Semin Immunol. 30 nov 2013;25(5):370-7.

159. Fournière M, Latire T, Souak D, Feuilloley MGJ, Bedoux G. *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*: Two Major Sentinels of Skin Microbiota and the Influence of Cosmetics. *Microorganisms*. 7 nov 2020;8(11).
160. Gallo RL, Nakatsuji T. Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. *J Invest Dermatol*. 1 oct 2011;131(10):1974-80.
161. Christensen GJM, Brüggemann H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef Microbes*. 1 juin 2014;5(2):201-15.
162. Brandwein M, Steinberg D, Meshner S. Microbial biofilms and the human skin microbiome. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 23 nov 2016;2.
163. Barnard E, Shi B, Kang D, Craft N, Li H. The balance of metagenomic elements shapes the skin microbiome in acne and health. *Sci Rep*. 21 2016;6:39491.
164. Dagnelie M-A, Corvec S, Saint-Jean M, Bourdès V, Nguyen J-M, Khammari A, et al. Decrease in Diversity of *Propionibacterium acnes* Phylotypes in Patients with Severe Acne on the Back. *Acta Derm Venereol*. 7 févr 2018;98(2):262-7.
165. Higaki S, Kitagawa T, Kagoura M, Morohashi M, Yamagishi T. Correlation between *Propionibacterium acnes* biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients. *J Dermatol*. août 2000;27(8):519-22.
166. Johnson T, Kang D, Barnard E, Li H. Strain-Level Differences in Porphyrin Production and Regulation in *Propionibacterium acnes* Elucidate Disease Associations. *mSphere*. févr 2016;1(1).
167. Nazipi S, Stødkilde-Jørgensen K, Scavenius C, Brüggemann H. The Skin Bacterium *Propionibacterium acnes* Employs Two Variants of Hyaluronate Lyase with Distinct Properties. *Microorganisms*. 12 sept 2017;5(3).
168. Dréno B, Dagnelie MA, Khammari A, Corvec S. The Skin Microbiome: A New Actor in Inflammatory Acne. *Am J Clin Dermatol*. sept 2020;21(Suppl 1):18-24.
169. Dagnelie M-A, Timon-David E, Khammari A, Corvec S, Dreno B. *C. acnes* et *S. epidermidis* modulent la réponse inflammatoire dans l'acné. *Ann Dermatol Vénéréologie*. 1 déc 2020;147(12, Supplément):A159.
170. Fan Y, Hao F, Wang W, Lu Y, He L, Wang G, et al. Multicenter cross-sectional observational study of antibiotic resistance and the genotypes of *Propionibacterium acnes* isolated from Chinese patients with acne vulgaris. *J Dermatol*. avr 2016;43(4):406-13.
171. Dréno B. Bacteriological resistance in acne: A call to action. *Eur J Dermatol EJD*. 1 avr 2016;26(2):127-32.

172. Ross JI, Eady EA, Carnegie E, Cove JH. Detection of transposon Tn5432-mediated macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance in cutaneous propionibacteria from six European cities. *J Antimicrob Chemother.* 1 janv 2002;49(1):165-8.
173. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Jones CE, Ratyal AH, Miller YW, et al. Clinical resistance to erythromycin and clindamycin in cutaneous propionibacteria isolated from acne patients is associated with mutations in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1997;41(5):1162-5.
174. Nakase K, Nakaminami H, Takenaka Y, Hayashi N, Kawashima M, Noguchi N. A novel 23S rRNA mutation in *Propionibacterium acnes* confers resistance to 14-membered macrolides. *J Glob Antimicrob Resist.* 1 sept 2016;6:160-1.
175. Aoki S, Nakase K, Nakaminami H, Wajima T, Hayashi N, Noguchi N. Transferable Multidrug-Resistance Plasmid Carrying a Novel Macrolide-Clindamycin Resistance Gene, *erm*(50), in *Cutibacterium acnes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 21 févr 2020;64(3).
176. Xu H, Li H. Acne, the Skin Microbiome, and Antibiotic Treatment. *Am J Clin Dermatol.* juin 2019;20(3):335-44.
177. Ross JI, Snelling AM, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Leyden JJ, et al. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia. *Br J Dermatol.* févr 2001;144(2):339-46.
178. Skidmore R, Kovach R, Walker C, Thomas J, Bradshaw M, Leyden J, et al. Effects of subantimicrobial-dose doxycycline in the treatment of moderate acne. *Arch Dermatol.* avr 2003;139(4):459-64.
179. Walker C, Preshaw PM, Novak J, Hefti AF, Bradshaw M, Powala C. Long-term treatment with sub-antimicrobial dose doxycycline has no antibacterial effect on intestinal flora. *J Clin Periodontol.* nov 2005;32(11):1163-9.
180. Eady EA, Cove JH, Holland KT, Cunliffe WJ. Erythromycin resistant propionibacteria in antibiotic treated acne patients: association with therapeutic failure. *Br J Dermatol.* juill 1989;121(1):51-7.
181. Coates P, Vyakrnam S, Eady EA, Jones CE, Cove JH, Cunliffe WJ. Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study. *Br J Dermatol.* mai 2002;146(5):840-8.
182. Ross JI, Snelling AM, Carnegie E, Coates P, Cunliffe WJ, Bettoli V, et al. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *Br J Dermatol.* mars 2003;148(3):467-78.
183. Dumont-Wallon G, Moyse D, Blouin E, Dréno B. Bacterial resistance in French acne patients. *Int J Dermatol.* mars 2010;49(3):283-8.

184. Dreno B, Reynaud A, Moyse D, Habert H, Richet H. Erythromycin-resistance of cutaneous bacterial flora in acne. *Eur J Dermatol EJD*. déc 2001;11(6):549-53.
185. Platsidaki E, Dessinioti C. Recent advances in understanding *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) in acne. *F1000Research*. 2018;7:F1000 Faculty Rev-1953.
186. Moon SH, Roh HS, Kim YH, Kim JE, Ko JY, Ro YS. Antibiotic resistance of microbial strains isolated from Korean acne patients. *J Dermatol*. oct 2012;39(10):833-7.
187. Mendoza N, Hernandez PO, Tying SK, Haitz KA, Motta A. Antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolates from acne patients in Colombia. *Int J Dermatol*. juin 2013;52(6):688-92.
188. González R, Welsh O, Ocampo J, Hinojosa-Robles RM, Vera-Cabrera L, Delaney ML, et al. In vitro antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients in northern Mexico. *Int J Dermatol*. sept 2010;49(9):1003-7.
189. Luk N-MT, Hui M, Lee H-CS, Fu LH, Liu ZH, Lam LY, et al. Antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* among acne patients in a regional skin centre in Hong Kong. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. janv 2013;27(1):31-6.
190. Abdel Fattah NSA, Darwish YW. In vitro antibiotic susceptibility patterns of *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients: an Egyptian university hospital-based study. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. déc 2013;27(12):1546-51.
191. Aoki S, Nakase K, Hayashi N, Noguchi N. Transconjugation of erm(X) conferring high-level resistance of clindamycin for *Cutibacterium acnes*. *J Med Microbiol*. janv 2019;68(1):26-30.
192. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 1 févr 2008;72(2):157-65.
193. Fernandez Sampedro M, Piper KE, McDowell A, Patrick S, Mandrekar JN, Rouse MS, et al. Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes* phylotypes associated with orthopedic implants. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 juin 2009;64(2):138-45.
194. Aubin GG, Baud'huin M, Lavigne J-P, Brion R, Gouin F, Lepelletier D, et al. Interaction of *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* with bone cells: a step toward understanding bone and joint infection development. *Sci Rep*. 20 2017;7:42918.
195. Aubin G. Phylogénie et tropisme de *Cutibacterium acnes* : impact sur la réaction inflammatoire et la réaction immunitaire lors des infections sur implant [Thèse de doctorat: Biologie-Santé]. [Nantes]: Nantes; 2017.
196. Kuehnast T, Cakar F, Weinhäupl T, Pilz A, Selak S, Schmidt MA, et al. Comparative analyses of biofilm formation among different *Cutibacterium acnes* isolates. *Int J Med Microbiol*. déc 2018;308(8):1027-35.



197. Crémet L, Corvec S, Batard E, Auger M, Lopez I, Pagniez F, et al. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mars 2013;75(3):252-5.
198. Foster AL, Cutbush K, Ezure Y, Schuetz MA, Crawford R, Paterson DL. *Cutibacterium acnes* in shoulder surgery: a scoping review of strategies for prevention, diagnosis, and treatment. *J Shoulder Elbow Surg.* juin 2021;30(6):1410-22.

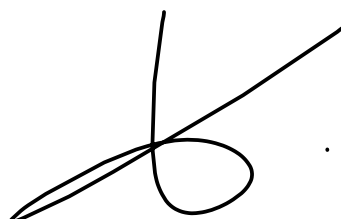
## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Ruffier d'Epenoux Louise

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : 21609495

N° Thèse : 75

Nom et Prénom : Ruffier d'Epenoux Louise

Sujet : Evaluation de l'activité de différentes substances actives sur des  
souches de Cutibacterium acnes après croissance en biofilm.

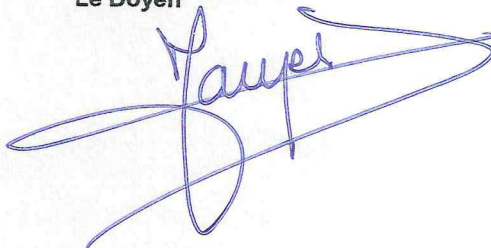
Tours, le : 20/09/2021

Le(s) Directeur(s) de Thèse :

P. S. CORVEC



Vu et Transmis :  
Le Doyen



Louise RUFFIER d'EPENOUX N°75

**Evaluation de l'activité de différentes substances actives sur des souches de *Cutibacterium acnes* après croissance en biofilm**

L'acné est une dermatose inflammatoire chronique qui atteint 80 % de la population dans le monde. Elle touche les glandes pilo-sébacées et induit de lésions inflammatoires. Trois facteurs jouent un rôle clef dans la physiopathologie de l'acné : une hyperséborrhée, une hyperkératinisation et une colonisation par *Cutibacterium acnes*. Cette bactérie en stimulant le système immunitaire innée induit une inflammation chronique et participe à la lipogenèse et à la comédogenèse. *C. acnes* est un bacille à Gram positif divisé en six groupes phylogénétiques principaux (IA<sub>1</sub>, IA<sub>2</sub>, IB, IC, II, III), anaérobie, et capable de former du biofilm lui permettant de résister au système immunitaire et aux antibiotiques.

Ce travail consistait à évaluer les différences de capacité à produire du biofilm de huit souches de *C. acnes* provenant de différents phylotypes, par deux techniques différentes permettant l'étude du biofilm à différents temps : le Crystal Violet (CV) (biofilm mature) et le BioFilm Ring Test® (BRT) (premières phases de formation du biofilm). Dans un second temps, l'impact de différentes substances actives (érythromycine, clindamycine, doxycycline et Myrtacine®) a été étudié. Pour la technique du CV deux types d'épreuves ont été réalisées : des épreuves préventives (ajout des substances actives et des bactéries au même instant) et des épreuves curatives (ajout des substances actives sur un biofilm déjà formé de 48h).

Les isolats de *C. acnes* provenant des phylotypes IA<sub>1</sub> et IA<sub>2</sub>, principalement retrouvés au niveau cutané et dans l'acné semblent être plus producteurs de biofilm dès les premières étapes d'adhérence que les autres phylotypes. L'impact des antibiotiques sur les premières phases de formation du biofilm reste encore à approfondir mais nous avons observé une légère diminution du biofilm avec les macrolides et de manière surprenante une augmentation de la production du biofilm avec la doxycycline. Des épreuves curatives ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité des antibiotiques et de la Myrtacine® sur le biofilm mature. Une efficacité significative des antibiotiques et de la Myrtacine® à 0,03 % a été observée pour l'ensemble de nos souches de *C. acnes*. De plus, l'association Myrtacine®/doxycycline semble diminuer la biomasse totale de biofilm. Pour compléter ces résultats, des épreuves préventives ont été conduites. La doxycycline semble avoir peu d'effet en préventif. A l'inverse, l'ajout de la Myrtacine® en préventif sur un biofilm pas encore formé, a montré une efficacité significative, avec une diminution drastique de la biomasse totale de biofilm dès 0,001 % pour l'ensemble de nos souches de *C. acnes*.

Ces résultats corroborent les conclusions émises par Kuehnast *et al.*, sur la différence de capacité à produire du biofilm des différents phylotypes de *C. acnes*. De plus, ces premiers résultats sur la Myrtacine®, montre une bonne efficacité de cette molécule en curatif et en préventif. Cette substance anti-biofilm semble donc pouvoir prétendre à une place particulière dans la prise en charge thérapeutique des patients acnéiques.

**Mots-clés :** *C. acnes*, acné, biofilm, antibiotiques, Myrtacine®

JURY

**Président :** Professeur Philippe LANOTTE, PU-PH, Faculté de Pharmacie - Tours

**Membres :** Professeur Brigitte DRÉNO, PU-PH, Faculté de Médecine - Nantes

Professeur Stéphane CORVEC, PU-PH, Faculté de Médecine - Nantes

Docteur Aurélie GUILLOUZOUIC, PH Laboratoire de Bactériologie - Nantes

**DATE ET LIEU DE SOUTENANCE :** 13 Septembre 2021, Université de Pharmacie de Nantes