



**HAL**  
open science

# Etude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers

Morgane Barthélémy

► **To cite this version:**

Morgane Barthélémy. Etude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS563 . tel-03173515

**HAL Id: tel-03173515**

**<https://theses.hal.science/tel-03173515>**

Submitted on 18 Mar 2021

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

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

# Sorbonne Université

Ecole doctorale : Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

*Institut de Chimie des Substances Naturelles / Métabolites de plantes et  
micro-organismes associés : isolement, synthèse et bioactivité*

## **Etude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers**

Par Morgane BARTHÉLEMY

Thèse de doctorat en Chimie des substances naturelles

Dirigée par Véronique EPARVIER et David TOUBOUL

Présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 2019

### **JURY :**

P <sup>r</sup> Sophie TOMASI	Professeur des Universités, Université Rennes 1	Rapporteur
D <sup>r</sup> Sylvie LAUTRU	Chargé de Recherche, I2BC, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
D <sup>r</sup> Georges MASSIOT	Directeur de Recherche, Université de Reims	Examineur
P <sup>r</sup> Marcelino SUZUKI	Professeur, LBBM, Sorbonne Université, Banyuls/mer	Examineur
D <sup>r</sup> Véronique EPARVIER	Ingénieur de Recherche, CNRS-ICSN, Gif-sur-Yvette	Directeur
D <sup>r</sup> David TOUBOUL	Chargé de Recherche, CNRS-ICSN, Gif-sur-Yvette	Directeur



Les endophytes sont des micro-organismes présents entre les cellules végétales. Ils ont la capacité d'améliorer le développement et la résistance de leur plante-hôte. Dans cette étude, le palmier *Astrocaryum sciophilum* a été choisi comme modèle. En effet, du fait de la longévité de ses feuilles, nous avons cherché à mettre en évidence une communauté compétitive d'endophytes en fonction de l'âge de ses feuilles. Ainsi, 197 endophytes provenant de six spécimens de palmiers ont été isolés et identifiés de feuilles à différents stades de développement. Afin d'évaluer si les métabolites produits par ces endophytes pourraient être utilisés en santé humaine, les extraits à l'acétate d'éthyle de chaque endophyte ont été testés contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) ainsi que pour leur activité quorum quenching (QQ). En parallèle, afin d'identifier un rôle écologique de protection de la plante par ces endophytes, des co-cultures ont été réalisées avec le phytopathogène *Fusarium oxysporum*. Plusieurs extraits de souches ont été sélectionnés afin d'isoler et d'identifier le ou les métabolites responsables des activités biologiques observées. Différents outils analytiques ont permis de guider le processus d'isolement (LC-MS/MS, réseaux moléculaires et imagerie par spectrométrie de masse).

L'étude de la communauté d'endophytes isolée des feuilles âgées n'a pas mis en évidence un arsenal chimique plus compétitif. Toutefois, au sein de la communauté cultivable, deux souches bactériennes du genre *Luteibacter* sp. ont montré un extrait actif sur SARM et de nombreux extraits de bactéries présentent une activité QQ. Des acides gras et des acylhomosérine lactones (AHLs) ont été identifiés comme étant responsables de ces activités. Une étude complémentaire a révélé des différences de production en AHLs par ces bactéries suivant leur température de culture. Par la suite, le métabolome secondaire du genre *Colletotrichum* (genre majoritaire de notre communauté) a été étudié à l'aide des réseaux moléculaires. Un isolat de ce genre a été ciblé pour son originalité chimique et quatre nouveaux métabolites nommés colletamide A-D ont été isolés et identifiés. Enfin, un champignon de la famille des Xylariaceae a été étudié pour son activité contre *F. oxysporum* conduisant à l'isolement et la caractérisation structurale de depsipeptides bioactifs nommés xylariacéines. Trois nouveaux métabolites ont également été identifiés, possédant un noyau 3-imidazolinone formé par une dimérisation de motifs phénylalanines. Un composé contenant un furane glycosylé a également été isolé du phytopathogène *F. oxysporum* dont la production est stimulée par un stress microbien. Dans le cadre de cette thèse, sept souches endophytes ont été étudiées chimiquement permettant l'isolement et l'identification de 42 molécules dont dix sont nouvelles.

### **Study of chemical and biological diversity of palm's endophytes**

Endophytes are microorganisms living in close association with plants, within plants tissues. They can improve the development and resistance of their host plant. The palm *Astrocaryum sciophilum* was the host plant model chosen in this work. Indeed, due to the longevity of its leaves, we expected to show a competitive community of endophytes within the oldest leaves. Thus, 197 endophytes have been isolated and identified from different leaves of six palm specimens. In order to evaluate whether the compounds produced by these microorganisms could be used for the treatment of human disease, ethyl acetate extracts of each endophyte were tested against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), as well as, for quorum quenching (QQ) activity. Simultaneously, co-culture were carried with the pathogen fungus *Fusarium oxysporum* in order to highlight endophytes providing plant protection against phytopathogens. Interesting extracts were selected to isolate and identify the bioactive metabolites. Various analytical tools were used to improve the isolation process (LC-MS/MS, molecular networking and MS imaging).

The study of the endophytic community isolated from older leaves did not show a more competitive chemical arsenal. However, among the cultivable community, two *Luteibacter* strains exhibited an ethyl acetate extract active against MRSA, and several bacteria yielded extracts with quorum quenching activities. Fatty acids and acylhomoserine lactones (AHLs) were responsible for the observed activities. A parallel study showed that the production of AHLs was dependent on the growth temperature of the bacteria. The metabolome of *Colletotrichum* genus (predominant in the fungal community) was studied using molecular networking. Four original metabolites named Colletamide A-D were isolated and identified from one isolate. Finally, a fungus from the Xylariaceae family was studied for its capacity to inhibit *F. oxysporum*'s growth. New depsipeptides named Xylariaceines were responsible for this activity. Three new metabolites were also identified sharing a 3-imidazolinone core probably formed by a dimerization of phenylalanines. A glycosylated furan compound named Focicine was isolated from the phytopathogen *F. oxysporum* extract and is produced in a greater amount in a competitive setting. Overall, in our study, seven endophyte strains were chemically investigated leading to the isolation and identification of 42 molecules of those ten are novel.



## Remerciements

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit a été effectué au sein de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS-ICSN) sous la direction des D<sup>rs</sup> Véronique Eparvier et David Touboul.

C'est à eux que j'adresse mes premiers remerciements pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail dans cet environnement et ces conditions. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez témoignée, la très grande liberté que vous m'avez octroyée pour mener cette thèse et pour toutes les participations aux congrès et voyages que vous m'avez accordées.

Je remercie les membres de mon jury, les D<sup>rs</sup> Sophie Tomasi et Sylvie Lautru pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit, et les D<sup>rs</sup> Georges Massiot et Marcelino Suzuki pour avoir accepté de juger mon travail.

Cette thèse étant inscrite dans un projet collaboratif entre plusieurs laboratoires, je tiens également à remercier les porteurs de l'ANR SECIL, le D<sup>r</sup> Didier Stien et le D<sup>r</sup> Jean-Luc Wolfender pour leurs conseils scientifiques ainsi que leur sympathie à chacune de nos rencontres. Merci Didier pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et d'avoir apporté tes conseils avisés sur mon travail.

Merci donc à tous les collaborateurs, de différents pays, compétences scientifiques et expériences : Raphaël, Alice, Nina, Laurent, Yoan, Jérôme, Mélanie, Julian, Karl, Léonie, Abdulelah et Sara. Cela a toujours été un plaisir d'échanger avec vous et de se retrouver à Gaillac, Banyuls/mer ou Paris.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon comité de thèse : les D<sup>rs</sup> Séverine Zirah et Pierre Le Pogam-Alluard. Merci beaucoup de l'intérêt que vous avez accordé à ce travail et à vos remarques pertinentes. Je remercie le D<sup>r</sup> Zirah de m'avoir suivie depuis le Master 2 au MNHN ainsi que pour sa bienveillance en toutes occasions.

Mes remerciements vont également à l'équipe « masse » de l'ICSN, tout spécialement Vincent Guérineau et Nicolas Elie pour m'avoir accompagnée sur mes expériences et avoir partagé vos connaissances. Merci pour votre sympathie au quotidien, j'appréciais toujours de venir vous voir ! Également merci aux membres de l'équipe 45 « Métabolites de plantes et micro-organismes associés », le D<sup>r</sup> Fanny Roussi, le D<sup>r</sup> Marc Litaudon, le D<sup>r</sup> Sandy Desrat et Cécile Apel, pour nos échanges scientifiques et personnels.

Ces recherches ont également été rendues possibles grâce aux différents services internes à l'ICSN. Ainsi je tiens à remercier Jean-François Gallard, Pascal Retailleau, David Lê, Guillaume Loire et Alda Da Costa pour son soutien administratif. Un énorme merci à Annie Moretto, pour sa gentillesse et sa bienveillance chaque jour, en nous apportant une aide matérielle si précieuse au laboratoire... Merci à Régis Guillot, le D<sup>r</sup> Grégory Genta-Jouve et le D<sup>r</sup> Mehdi Beniddir pour leurs contributions scientifiques et leur disponibilité.

Mon quotidien durant ces trois ans a été rythmé par les membres de mon équipe, déjà partis, toujours présents ou récemment arrivés ! Ainsi je les remercie tous (par ordre d'apparition) pour nos moments partagés : Amandine, Seindé, Laure-Anne, Jonathan, Oriane, Marine, Marceau et Téo. Une petite dédicace aux nombreux stagiaires de passage entre nos murs ! Je remercie également les étudiants et permanents de l'ICSN, pour tous les moments ensemble.

Plus que des collègues mais des amis, je souhaite remercier du fond du cœur mes zouzes Amandine, Seindé, Orianne, Gwen, Julie, Laure et Pauline ainsi que Simon et Eddy pour nos partages d'état d'âme, votre écoute et votre soutien. Tant de moments extra-scolaires passés ensemble, merci d'avoir été là, tous les jours, tout le temps.

Merci à mes amis de plus longue date, les toulousains et les bretons, dans leur engagement à m'éloigner de ce travail si prenant le temps d'une soirée, d'un week-end ou de vacances. Particulièrement, je remercie Sasha, Ophélie, Solenne et Marion, mes anciens colocos Pierre-Gilles et Norma d'être toujours là malgré le temps et les distances (et même quand on se trouve dans la même ville !).

Merci à ma famille, mes grands-parents, oncle, tantes et cousins, pour toutes leurs pensées chaleureuses et leurs encouragements. Également, je remercie Lily de m'avoir toujours accompagnée dans ma vie et pour toute son affection. Plus que tout, je remercie mes parents, mon frère et ma sœur. Pour votre présence malgré l'éloignement, pour votre soutien malgré mes nombreux moments d'humeur et de faiblesse. Merci à Cédric et Soazig d'être là quand j'en ai besoin et de m'avoir montré l'assurance, la détermination et la volonté. Svetlana et Antoine, je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté sur mon travail et votre indéfectible bonne humeur. À mes deux petits choux, Margaux et Gabriel, vous m'accompagnez tous les jours. Enfin je remercie mes parents, qui ont contribué le plus à m'amener où je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir donné les moyens ainsi que de m'avoir toujours poussée et entourée.

## Table des matières

Remerciements .....	1
Table des matières.....	1
Liste des illustrations .....	6
Liste des tableaux.....	12
Liste des abréviations .....	13
<b>Introduction</b> .....	15
<b>Etat de l'art</b> .....	17
<b>I. Lutte contre les infections en santé publique</b> .....	18
1.1. Classes et modes d'action des antimicrobiens.....	18
1.1.1. Les antibactériens.....	18
1.1.2. Les antifongiques .....	23
1.1.3. Autres antimicrobiens.....	26
1.2. La résistance antimicrobienne .....	27
1.2.1. Développement et transfert des mécanismes de résistance.....	27
1.2.2. Causes .....	29
1.2.3. Prévention.....	30
1.3. Stratégies contre la résistance antimicrobienne .....	31
1.3.1. Inhibiteurs d'enzymes de dégradation .....	31
1.3.2. Combinaison et alternance des thérapies.....	32
1.3.3. Vaccins.....	32
1.3.4. Découvertes de nouvelles molécules .....	32
1.3.5. Phagothérapie .....	32
1.3.6. Stratégie contre la virulence des pathogènes microbiens .....	33
<b>II. Les endophytes, symbiotes ubiquitaires des plantes</b> .....	38
2.1. Diversité des micro-organismes endophytes.....	38
2.1.1. Diversité des endophytes bactériens.....	39
2.1.2. Diversité des endophytes fongiques .....	39
2.2. Localisation des endophytes.....	40
2.3. Transmission et colonisation des endophytes .....	40
2.4. Rôle dans les systèmes végétaux.....	43
2.4.1. Stimulation de la croissance de la plante-hôte .....	43
2.4.2. Protection de la plante contre les stress .....	45
2.5. Activité pharmacologique des métabolites secondaires d'endophytes .....	52
2.5.1. Activité antimicrobienne .....	53
2.5.2. Activité antitumorale.....	54

2.5.3.	Immunosuppresseurs .....	56
2.5.5.	Autres activités pharmacologiques .....	56
2.6.	Perspectives sur l'isolement d'endophytes et la caractérisation de métabolites bioactifs .....	57
III.	Study of leaf endophytic fungi : Exploration and valorization of biosourCed Innovative antibacterial metaboLites : Projet SECIL.....	59
3.1.	Objectifs et organisation du projet.....	59
3.2.	Organisation des communautés endophytiques .....	59
3.3.	Technologies appliquées .....	62
3.3.1.	Séquençage .....	62
3.3.2.	Avancées dans la recherche en produits naturels : les réseaux moléculaires.....	62
3.4.	Contexte et cible biologique du projet.....	67
<b>Résultats</b>	.....	<b>69</b>
IV.	Biodiversité des micro-organismes endophytes : isolement et identification.....	70
4.1.	Récolte et isolement des endophytes.....	70
4.2.	Identification des micro-organismes isolées.....	71
4.2.1.	Identification génétique des micro-organismes.....	71
4.2.2.	Discrimination des endophytes par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	80
4.3.	Diversité écologique de la communauté étudiée.....	91
4.3.1.	Diversité des genres bactériens .....	91
4.3.2.	Diversité des genres fongiques .....	92
4.3.3.	Diversité des endophytes suivant les spécimens <i>A. sciophilum</i> récolté.....	93
4.3.1.	Diversité des endophytes suivant l'âge des feuilles.....	93
4.4.	Conclusion .....	96
V.	Criblage biologique des micro-organismes .....	97
5.1.	Cibles biologiques.....	97
5.1.1.	Pathogènes humains.....	97
5.1.2.	Le champignon phytopathogène <i>Fusarium oxysporum</i> .....	98
5.2.	Essais biologiques.....	99
5.2.1.	Culture et extraction des métabolites secondaires.....	99
5.2.2.	Activité antimicrobienne .....	99
5.2.3.	Activité quorum quenching .....	99
5.2.4.	Activité cytotoxique .....	101
5.3.	Résultats du criblage et discussion .....	101
5.3.1.	Activité antimicrobienne sur pathogènes humains.....	101
5.3.2.	Activité quorum quenching des extraits.....	103
5.3.3.	Activité des endophytes contre <i>F. oxysporum</i> .....	104

5.4.	Conclusion : choix des souches d'intérêts .....	106
VI.	Etude des extraits de souches présentant une activité Quorum Quenching. ....	107
6.1.	Différentiation des souches du genre <i>Paraburkholderia</i> .....	108
6.2.	Analyses chimiques des extraits et activité biologique .....	109
6.2.1.	BSNB-0656 : Isolement et identification de métabolites.....	109
6.2.2.	Diversité chimique des souches de <i>Paraburkholderia</i> .....	111
6.2.3.	Activité QQ des extraits et des molécules AHLs .....	115
6.2.4.	Discussion .....	118
6.3.	Production en AHLs en fonction de la température de culture .....	120
6.3.1.	Analyses des spectres UHPLC-MS/MS.....	121
6.3.2.	Comparaison des données UHPLC-MS/MS par analyse en réseau moléculaire ...	124
6.3.3.	Dosage des AHL dans les extraits.....	125
6.3.4.	Discussion .....	126
6.4.	Discussion générale et conclusion.....	127
VII.	Activité antibactérienne des extraits d'endophytes contre <i>S. aureus</i> .....	130
7.1.	Analyse de la diversité chimique des extraits par les réseaux moléculaires .....	130
7.1.1.	Observation de la diversité chimique des champignons endophytes .....	130
7.1.2.	Observation de la diversité chimique des bactéries endophytes.....	133
7.2.	Diversité chimique de <i>Bacillus</i> sp. (BSNB-0730).....	134
7.3.	Diversité chimique de <i>Luteibacter</i> sp. (BSNB-0721) et activité antibactérienne .....	135
7.4.	Discussion et conclusion.....	138
VIII.	Analyses des souches endophytes du genre <i>Colletotrichum</i> .....	140
8.1.	Discrimination des souches de <i>Colletotrichum</i> suivant leur empreinte MALDI-TOF MS .....	142
8.2.	Diversité chimique des souches de <i>Colletotrichum</i> .....	143
8.2.1.	Réseau moléculaire .....	143
8.2.2.	Approche t-SNE.....	145
8.2.3.	Etude chimique de <i>Colletotrichum</i> sp.14.....	147
8.2.4.	Etude chimique de <i>Colletotrichum</i> sp.12.....	148
8.2.5.	Etude chimique de <i>Colletotrichum</i> sp.2.....	149
8.2.6.	Discussion .....	153
8.3.	Conclusion .....	154
IX.	Etude de la compétition entre l'endophyte BSNB-0294 et <i>Fusarium oxysporum</i> .....	156
9.1.	Etude de la compétition Xylariaceae sp. (BSNB-0294) – <i>F. oxysporum</i> au cours du temps .....	156
9.1.1.	Analyse de la compétition par les profils UHPLC et UHPLC-MS.....	157
9.1.2.	Analyse de la compétition par les réseaux moléculaires.....	159

9.1.3.	Analyse de la compétition par MALDI-TOF.....	161
9.1.4.	Activité antifongique des extraits.....	165
9.1.5.	Discussion .....	165
9.2.	Etude chimique des extraits de BSNB-0294 et <i>F. oxysporum</i> lors de leur co-culture... 166	
9.2.1.	Etude chimique de l'extrait BSNB-0294C .....	166
9.2.2.	Etude chimique de l'extrait FOCIC .....	172
9.3.	Activité biologique .....	175
9.3.1.	Activité antifongique des fractions .....	175
9.3.2.	Activité antifongique des molécules .....	175
9.4.	Discussion .....	176
9.5.	Conclusion .....	177
<b>Conclusion</b>	.....	<b>179</b>
<b>X.</b>	<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>182</b>
10.1.	Matériel biologique .....	182
10.1.1.	Récolte, isolement et conservation des endophytes.....	182
10.1.2.	Culture .....	182
10.1.3.	Identification génétique .....	182
10.1.4.	Extraits protéiques .....	183
10.1.5.	Extraits lipidiques.....	183
10.1.6.	Culture à grande échelle des endophytes .....	184
10.1.7.	Essais antimicrobiens sur pathogènes humains .....	184
10.1.8.	Essais Quorum Quenching.....	186
10.1.9.	Co-culture avec le phytopathogène <i>F. oxysporum</i> .....	187
10.1.10.	Évaluation du potentiel antifongique sur <i>F. oxysporum</i> des COVs produits par les endophytes.....	187
10.1.11.	Essais antifongique sur <i>F. oxysporum</i> par diffusion en gélose.....	188
10.1.12.	Evaluation de l'activité cytotoxique .....	188
10.2.	Solvants.....	188
10.3.	Extraction des endophytes.....	188
10.4.	Appareillage .....	189
10.4.1.	Système d'analyse.....	189
10.4.2.	Dosage des acylhomosérine lactones dans les extraits.....	191
10.4.3.	Pré-traitement des données MS/MS .....	192
10.4.4.	Réseau moléculaire .....	193
10.4.5.	Système de purification.....	194
10.4.6.	Préparation des FAMES (Fatty acid methyl ester) et analyse.....	194
10.4.7.	Identification structurale.....	195

10.5.	Etude par fractionnement bio-guidé de la souche BSNB-0656 .....	195
10.6.	Etude par fractionnement bio-guidé de la souche BSNB-0721 .....	197
10.7.	Etude de la souche BSNB-0730 .....	199
10.8.	Etude de la souche BSNB-0580 .....	200
10.9.	Etude de la souche BSNB-0536 .....	201
10.10.	Etude de la souche BSNB-0583 .....	203
10.11.	Etude de la compétition entre BSNB-0294 et <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> .....	204
<b>Références</b> .....		211
<b>Annexes</b> .....		230

## Liste des illustrations

Figure I. 1. Exemples d'antibactériens de la classe des $\beta$ -lactamines .....	19
Figure I. 2. Exemples d'antibactériens de la classe des glycopeptides .....	21
Figure I. 3. Exemples d'antibactériens de la classe des tétracyclines.....	21
Figure I. 4. Exemples d'antibactériens de la classe des aminoglycosides.....	22
Figure I. 5. Exemple de macrolide .....	22
Figure I. 6. Exemples d'antibactériens de la classe des quinolones .....	23
Figure I. 7. Exemples d'antifongiques de la classe des polyènes.....	24
Figure I. 8. Exemples d'antifongiques de la classe des imidazoles et des triazoles.....	25
Figure I. 9. Voie de biosynthèse simplifiée de l'ergostérol à partir de l'acétyl-CoA au sein des champignons.....	25
Figure I. 10. Exemples d'antifongiques de la classe des allylamines .....	26
Figure I. 11. Exemple d'échinocandine. ....	26
Figure I. 12. Sites d'actions de quelques classes d'antibiotiques et mécanismes de résistance développés par les bactéries. ....	28
Figure I. 13. Campagnes de prévention pour l'utilisation raisonnée des antibiotiques en France par le ministère de la santé, le ministère de l'agriculture et de l'alimentation et l'assurance maladie. ....	31
Figure I. 14. Exemples d'inhibiteur de $\beta$ -lactamases.....	31
Figure I. 15. Exemples d'autoinducteurs du quorum sensing de bactéries à Gram négatif et à Gram positif et exemples d'agents développés pour inhiber ce QS.....	34
Figure I. 16. Représentation schématique du système <i>agr</i> de <i>S. aureus</i> . ....	36
Figure I. 17. Molécules répertoriées pour une activité QQ sur <i>S. aureus</i> . ....	36
Figure II. 1. Arbre phylogénétique de la vie .....	39
Figure II. 2. Voies de transmission des endophytes chez les plantes à fleurs : a) Graine colonisée par un endophyte provenant d'une plante-mère, b) Germination de la graine et colonisation par l'endophyte de la racine ainsi que dissémination dans la rhizosphère, c et d) Colonisation verticale du jeune plant et colonisation horizontale par différents micro-organismes environnementaux, e) colonisation des organes reproducteurs par des endophytes et dissémination future des graines colonisées.....	41
Figure II. 3. Phytohormones communément impliquées dans la régulation physiologique de la plante. ....	44
Figure II. 4. Métabolites secondaires produits par des endophytes possédant une activité contre divers phytopathogènes.....	47
Figure II. 5. Composés organiques volatils (COVs) produits par des endophytes possédant une activité contre divers phytopathogènes.....	48
Figure II. 6. Métabolites secondaires produits par des endophytes possédant une activité toxiques sur les herbivores ou les insectes ravageurs.....	49
Figure II. 7. Rôle des endophytes au sein des systèmes végétaux .....	52
Figure II. 8. Métabolites secondaires produits par des endophytes possédant une activité antimicrobienne contre des pathogènes humains.....	54
Figure II. 9. Exemples de métabolites secondaires produits par des endophytes possédant une activité cytotoxique contre différentes lignées cellulaires. ....	56
Figure II. 10. Teixobactine, peptide isolé d'une bactérie non cultivée <i>Eleftheria terrae</i> . ....	57

Figure III. 1. Palmier <i>Astrocaryum sciophilum</i> .....	61
Figure III. 2. Diagramme foliaire d' <i>Astrocaryum sciophilum</i> .....	61
Figure III. 3. Exemple de représentation vectoriel d'un spectre MS/MS avec trois pics détectés. Pour un spectre MS/MS à n pics, la représentation vectorielle se fait sur n dimensions. ....	63
Figure III. 4. Exemple de réseau moléculaire créée à partir des données LC-MS/MS de dérivés de tryptophane et de dérivés de biotine.....	64
Figure III. 5. Méthodologie pour la priorisation des extraits à travailler. Les extraits des endophytes sont testés sur différentes cibles biologiques et les endophytes sont identifiés génétiquement en parallèle de l'analyse LC-MS/MS de leurs extraits. Ces informations taxonomiques et les activités biologiques peuvent être mises en évidence par des couleurs sur les réseaux moléculaires afin de cibler des clusters de molécules d'intérêts.....	66
Figure III. 6. Evolution du nombre de publications portant sur les réseaux moléculaires par an.67	

Figure IV. 1. Carte de la Guyane et localisation des spécimens d' <i>Astrocaryum sciophilum</i> . ....	70
Figure IV. 2. Procédure pour l'isolement des endophytes à partir de feuille d' <i>A. sciophilum</i> .....	70
Figure IV. 3. Ensemble des bactéries de la communauté. Arbre phylogénétique dérivé d'une analyse par maximum de vraisemblance d'un alignement de séquences ARNr 16S.....	73
Figure IV. 4. Ensemble des champignons de la communauté. Arbre phylogénétique dérivé d'une analyse par maximum de vraisemblance d'un alignement de séquences ITS.....	78
Figure IV. 5. Principe du MALDI-TOF MS pour l'obtention d'un spectre. ....	80
Figure IV. 6. Empreintes protéiques des trois souches du genre <i>Caballeronia</i> . ....	83
Figure IV. 7. Empreintes protéiques des trois souches du genre <i>Pantoea</i> . ....	84
Figure IV. 8. Empreintes protéiques des trois souches du genre <i>Bjerkandera</i> . ....	85
Figure IV. 9. Empreintes protéiques des cinq souches du genre <i>Stereum</i> . ....	85
Figure IV. 10. Empreintes lipidique des trois souches du genre <i>Caballeronia</i> .....	87
Figure IV. 11. Empreintes lipidique des trois souches du genre <i>Pantoea</i> .....	88
Figure IV. 12. Empreinte lipidique d'une souche de <i>Bacillus</i> sp. BSNB-0566. ....	88
Figure IV. 13. Empreintes lipidique des trois souches du genre <i>Bjerkandera</i> . ....	89
Figure IV. 14. Empreintes lipidique des cinq souches du genre <i>Stereum</i> .....	89
Figure IV. 15. Répartition des endophytes isolés suivant leur appartenance à différents taxons.92	
Figure IV. 16. Répartition des genres endophytiques retrouvés suivant les spécimens <i>A. sciophilum</i> prélevés.....	94
Figure IV. 17. Répartition des genres endophytiques retrouvés suivant le type de feuilles prélevées.....	95

Figure V. 1. Principe de la mesure de l'activité quorum quenching de <i>S. aureus</i> . En présence d'un extrait possédant une activité QQ, il n'y a pas de diminution cellulaire de <i>S. aureus</i> car l'activation du gène <i>pyrFE</i> n'est pas réalisée .....	99
Figure V. 2. Exemple d'halo d'inhibition du quorum sensing chez <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026.....	100
Figure V. 3. Principe de la mesure de l'activité quorum quenching chez le biosenseur <i>P. putida</i> F117.....	100
Figure V. 4. Pourcentage de souches dont l'extrait AcOEt montre une activité antimicrobienne suivant l'âge des feuilles.....	103
Figure V. 5. Pourcentage de souches dont l'extrait AcOEt montre une activité antimicrobienne suivant le spécimen <i>A. sciophilum</i> récolté.....	103
Figure V. 6. Co-culture à 5 semaines entre <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> avec BSNB-0294 et avec BSNB-0299.....	105

Figure V. 7. Co-culture entre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> et une souche de <i>Paraburkholderia</i> sp. BSNB-0519.....	105
Figure V. 8. Pousse de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> face à l'endophyte BSNB-0294 et à l'endophyte BSNB-0299.....	105
Figure VI. 1. Répartition en différentes espèces des souches de <i>Paraburkholderia</i> (à droite) suivant leur empreinte protéique par analyse MALDI-TOF MS (à gauche).....	108
Figure VI. 2. Dégradation des acylhomosérine lactones (AHL) et ouverture de la lactone avec les déplacements RMN en ppm des protons (bleu) et des carbones (rouge).....	110
Figure VI. 3. AHLs isolées et identifiées des fractions F3 et F4.....	110
Figure VI. 4. Fragments caractéristiques des AHLs en MS/MS.....	111
Figure VI. 5. Réseau moléculaire construit avec les données UHPLC-MS/MS des 22 extraits AcOEt de <i>Paraburkholderia</i> sp. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par une répartition en secteur du nœud suivant l'intégration du signal XIC. Les clusters encadrés sont formés de nœuds possédant des signaux de $m/z$ caractéristiques aux AHLs sur leur spectre de fragmentation.....	112
Figure VI. 6. Cluster de nœuds analogues d'AHLs spécifiques aux <i>Paraburkholderia</i> sp.2 (BSNB-0656, -0658, -0661) et <i>Paraburkholderia</i> sp.3 et sp.8. Les spectres de fragmentation sont associés à quatre nœuds, présentant un pic à $m/z$ 120,066. ....	113
Figure VI. 7. Spectre de fragmentation et prédiction de la molécule associée au nœud à $m/z$ 206,153. ....	114
Figure VI. 8. Spectre de fragmentation et prédiction de la molécule associée au nœud à $m/z$ 245,164. ....	114
Figure VI. 9. Nœuds spécifiques à <i>Paraburkholderia</i> sp.5 avec prédiction de dérivés de phényléthylamide. ....	115
Figure VI. 10. Inhibition du QQ de <i>S. aureus</i> (P2-pyrFE) par l'extrait initial de BSNB-0656 (en gris), l'extrait issu de la grande échelle (GE, en jaune) et les fractions BSNB-0656-F2 à BSNB-0656-F7.....	116
Figure VI. 11. Profil HPLC avec détection UV (210 nm – bleu foncé, 220 nm – vert, 254 nm – bleu clair, 270 nm – rouge et 320 nm – violet) et DEDL (jaune) des deux extraits de BSNB-0656 : l'extrait actif ayant servi au criblage (en haut) et l'extrait obtenu après la culture à grande échelle (en bas). Le gradient d'élution indiquant la proportion en ACN est superposé en rouge. ....	116
Figure VI. 12. Comparaison des activités QQ sur <i>S. aureus</i> de deux lots d'extraits AcOEt de notre collection d'endophytes.....	117
Figure VI. 13. Activité QQ sur CV026 des fractions de l'extrait issu de la culture à grande échelle de BSNB-0656.....	117
Figure VI. 14. Comparaison des profils UHPLC-MS/MS (Base Peak $m/z$ 50,0000 - 1500,0000) entre 0 et 15 min des extraits AcOEt du milieu gélosé incubé à 10°C (en haut) et de BSNB-0661 incubé à 10°C (en bas). ....	121
Figure VI. 15. Comparaison des profils UHPLC-MS/MS (Base Peak $m/z$ 50,0000 - 1500,0000) entre 4 et 15 min des extraits AcOEt de la souche BSNB-0661 incubée à différentes températures ainsi que de l'extrait à l'AcOEt du milieu gélosé.....	122
Figure VI. 16. Comparaison des profils UHPLC-MS/MS (Base Peak $m/z$ 50,0000 - 1500,0000) entre 4 et 15 min d'un mélange d'AHLs à 1 mg/mL (en haut) et des extraits AcOEt de la souche BSNB-0661 incubée à 20°C (au milieu) et à 28°C (en bas).....	122
Figure VI. 17. Spectres de fragmentation MS/MS de l'ion à $m/z$ 298,2011 (en haut) et de l'ion à $m/z$ 318,2279 (en bas) présents dans l'extrait de BSNB-0661 cultivée à 20°C et 28°C respectivement. ....	123

Figure VI. 18. Comparaison des profils UHPLC-MS/MS (Base Peak $m/z$ 50,0000 – 1500,0000) entre 4 et 15 min des extraits AcOEt de la souche BSNB-0670 incubée à différentes températures ainsi que de l'extrait AcOEt du milieu gélosé. ....	123
Figure VI. 19. Clusters relatifs aux AHLs issu du réseau moléculaire formé avec les données UHPLC-MS/MS des extraits de BSNB-0661 en culture aux différentes températures. ....	124
Figure VI. 20. Clusters relatifs aux AHLs issu du réseau moléculaire formé avec les données UHPLC-MS/MS des extraits de BSNB-0670 en culture aux différentes températures. ....	125
Figure VI. 21. Dosage des C <sub>8</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>12</sub> et C <sub>14</sub> -HSL suivant leur fonctionnalisation dans les extraits de BSNB-0661 et BSNB-0670 cultivées à différentes températures. ....	126
Figure VII. 1. Réseau moléculaire construit avec les 131 extraits AcOEt des champignons endophytes. Les clusters annotés regroupent des ions provenant d'extraits de champignons actifs contre SARM.....	131
Figure VII. 2. Zoom du cluster 2 issu du précédent réseau moléculaire. Ce cluster regroupe des ions provenant d'extraits de <i>Fusarium</i> sp. qui semblent être des analogues de depsipeptides. ....	132
Figure VII. 3. A) Réseau moléculaire construit avec les 66 extraits AcOEt des bactéries endophytes. B) Clusters contenant des ions provenant des extraits de <i>Luteibacter</i> sp. C) Clusters contenant des ions provenant de l'extrait de la souche active de <i>Bacillus</i> sp. D) Répartition des ions des clusters de C) suivant le genre microbien des extraits d'où ils proviennent.....	133
Figure VII. 4. Spectre XIC (base peak) de l'extrait BSNB-0719 ( <i>Luteibacter</i> sp.). Des ions d'un cluster spécifique à l'extrait sont associés aux signaux de ce spectre. ....	134
Figure VII. 5. Comparaison des profils UV et DEDL de l'extrait actif et inactif sur SARM de <i>Bacillus</i> sp. BSNB-0730.....	135
Figure VII. 6. Spectre MS/MS de l'ester méthylique de l'acide ( <i>Z</i> )-hexadécenoïque ( <b>16</b> ) permettant de déterminer la place de la double liaison en position 9 et 10. ....	137
Figure VIII. 1. Arbre phylogénétique dérivé d'une analyse par maximum de vraisemblance d'un alignement de séquence ITS de souches <i>Colletotrichum</i> sp. de notre échantillonnage (BSNB-). Les séquences ITS de <i>Colletotrichum</i> sp. les plus proches ont été déterminées par BLAST et incluses dans l'arbre.....	141
Figure VIII. 2. Comparaison des dix-huit différentes empreintes protéiques des souches de <i>Colletotrichum</i> sp.....	142
Figure VIII. 3. Regroupement hiérarchique des isolats de <i>Colletotrichum</i> d'après l'ion le plus intense de leur empreinte protéique MALDI-TOF MS. ....	143
Figure VIII. 4. Réseau moléculaire établi d'après les données UHPLC-MS/MS des 42 extraits de <i>Colletotrichum</i> sp. A) Clusters d'ions spécifiques à BSNB-0583 ( <i>Colletotrichum</i> sp.2), B) Clusters d'ions spécifiques aux isolats de <i>Colletotrichum</i> sp.1 et sp.12, C) Clusters d'ions spécifiques aux isolats de <i>Colletotrichum</i> sp.14 et sp.11, D) Clusters d'ions spécifiques aux isolats de <i>Colletotrichum</i> sp.6.....	144
Figure VIII. 5. Représentation t-SNE du réseau moléculaire établi d'après les données UHPLC-MS/MS des 42 extraits de <i>Colletotrichum</i> sp. Autour de la représentation t-SNE se trouvent les clusters du réseau moléculaire relatifs aux différentes zones entourées. Les molécules dessinées ont été isolées et déterminées après l'étude chimique des extraits, et sont associées à leur ion respectif dans les clusters.....	146
Figure VIII. 6. Déréplication d'un cluster de peptides contenant des ions retrouvés dans les extraits de <i>Colletotrichum</i> sp.11 et sp.14. ....	148
Figure VIII. 7. Corrélations des spectres RMN 2D ayant permis l'identification structurale des molécules <b>24-27</b> : <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY, <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC et <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY. Les corrélations NOESY intenses sont en traits pleins et les plus faibles en pointillés.....	151

Figure VIII. 8. Fragmentation de la chaîne décadiénamide dans la série des Colletamides..... 152

Figure IX. 1. Compétition entre le phytopathogène <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> (gauche) et l'endophyte Xylariaceae sp. BSNB-0294 à trois semaines de co-culture.....	157
Figure IX. 2. Comparaison des profils UV à 254 nm des extraits de Xylariaceae sp. BSNB-0294 en culture seule et en compétition avec <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> (FOCIC) pendant une, deux et trois semaines .....	158
Figure IX. 3. Comparaison des profils UV à 254 nm des extraits de Xylariaceae sp. BSNB-0294C et <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> (FOCIC) après trois semaines de compétition.....	158
Figure IX. 4. Comparaison des profils UV à 254 nm des extraits de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> (FOCIC) en culture seule et en compétition avec Xylariaceae sp. BSNB-0294 pendant une, deux et trois semaines.....	159
Figure IX. 5. Clusters spécifiques aux extraits du champignon phytopathogène issus du réseau moléculaire regroupant les données MS/MS des extraits de <i>F. oxysporum</i> f.sp <i>ciceris</i> (FOCIC) et Xylariaceae sp. BSNB-0294 en culture seule ou en co-culture de une, deux et trois semaines...	160
Figure IX. 6. Clusters spécifiques aux extraits de l'endophyte issus du réseau moléculaire regroupant les données MS/MS des extraits de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> (FOCIC) et Xylariaceae sp. (BSNB-0294) en culture seule ou en co-culture de une, deux et trois semaines.....	161
Figure IX. 7. Image par MALDI-TOF MS de la compétition entre <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> et BSNB-0294 à 3, 4 et 5 jours de co-culture. Les quatre ions les plus intenses de la compétition y sont relevés : <i>m/z</i> 806,49, 987,68, 1145,71 et 1286,86. Les traits noirs indiquent la zone de croissance des deux champignons.....	162
Figure IX. 8. Image par MALDI-TOF MS de la compétition entre <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> et BSNB-0294 à 6, 7 et 10 jours de co-culture. Les quatre ions les plus intenses de la compétition y sont relevés : <i>m/z</i> 806,49, 987,68, 1145,77 et 1286,88. Les traits noirs indiquent la zone de croissance des deux champignons.....	163
Figure IX. 9. Analyse MALDI-TOF MS d'une empreinte de BSNB-0294 en co-culture avec le phytopathogène à 2 semaines, de l'extrait butanol et de l'extrait AcOEt de BSNB-0294.....	164
Figure IX. 10. Zones récoltées de la compétition pour réaliser différents extraits.....	164
Figure IX. 11. Corrélations COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H, HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C et HMBC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N visibles sur les spectres RMN 2D ayant permis la détermination des molécules <b>30</b> , <b>31</b> et <b>32</b> .....	168
Figure IX. 12. Corrélations HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C et HMBC <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N visibles sur les spectres RMN 2D ayant permis la détermination de la molécule <b>33</b> .....	169
Figure IX. 13. Corrélations HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C permettant de définir l'enchaînement des acides aminés qui composent la molécule <b>36</b> .....	170
Figure IX. 14. Corrélations COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H, HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C et NOESY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H visibles sur les spectres RMN 2D ayant permis la détermination de la molécule <b>42</b> .....	173
Figure IX. 15. Prédiction des déplacements carbonés pour les deux possibilités de structure envisagées.....	174
Figure IX. 16. Halo d'inhibition de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> formé par la présence de la fraction BSNB-0294C-F5 et la fraction de rinçage THF de la colonne (50 µL à 10 mg/mL).....	175
Figure IX. 17. Halo d'inhibition de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> formé par la présence des fractions : BSNB-0294C-F5, BSNB-0294C-F5-4, BSNB-0294C-F5-5 et BSNB-0294C-F5-6 (de gauche à droite). .....	175
Figure IX. 18. Halo d'inhibition de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> formé par la présence des molécules : xylariacéine A ( <b>36</b> ) (10 mg/mL), xylariacéine A ( <b>36</b> ) (5 mg/mL) et xylariacéine B ( <b>37</b> ) (5 mg/mL). .....	176

Figure X. 1. Préparation et dépôt sur plaque MALDI-TOF d'un extrait protéique d'endophyte.	183
Figure X. 2. Préparation et dépôt sur plaque MALDI-TOF d'un extrait lipidique d'endophyte...	184
Figure X. 3. Plan d'une plaque multi-puits utilisé pour l'évaluation de la CMI de nos extraits AcOEt par micro-dilution.....	186
Figure X. 4. Schéma de la co-culture permettant le criblage de l'activité antifongique des bactéries et champignons endophytes contre le phytopathogène <i>F. oxysporum</i> .	187
Figure X. 5. Schémas des co-cultures entre le phytopathogène <i>F. oxysporum</i> est un champignon ou une bactérie endophyte.....	187
Figure X. 6. Schéma du montage des boîtes de Pétri pour mesurer l'activité antifongique des COVs. L'endophyte (blanc) est repiqué sur une boîte et le phytopathogène (violet) sur une autre.....	188
Figure X. 7. Dégradation de la lactone par ajout d'hydroxyde de lithium LiOH.....	192

## Liste des tableaux

Tableau IV. 1. Identification proposée pour les endophytes bactériens de la communauté. L'identification a été réalisée par comparaison avec l'outil BLAST du NCBI et par la réalisation d'arbres phylogénétiques. ....	72
Tableau IV. 2. Identification proposée pour les endophytes fongiques de la communauté. L'identification s'est faite d'après les résultats de comparaison par l'outil BLAST du NCBI et par la réalisation d'arbres phylogénétiques. ....	75
Tableau V. 1. Emplacement et taxonomie des endophytes dont l'extrait AcOEt montre une activité antimicrobienne .....	102
Tableau VI. 1. Résultat d'activité QQ sur CV026 des fractions de l'extrait issu de la culture à grande échelle de BSNB-0656. ....	117
Tableau VI. 2. Activité QQ sur CV026 de différentes AHLs .....	118
Tableau VII. 1. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des composés <b>10–17</b> contre <i>S. aureus</i> résistant à la méticilline. ....	137

## Liste des abréviations

ABA	Acide abscissique
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Acide formique
AHL	Acyldihomoserine lactone
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCC	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
BLAST	Basic local alignment search tool
CCM	Chromatographie sur couche mince
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlorométhane
CH <sub>3</sub> Cl	Chloroforme
CHCA	Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
CI <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice médiane
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COV	Composé organique volatil
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DPN	Dictionnaire des produits naturels
EPA	Agence américaine de la protection de l'environnement
EPS	Exo-polysaccharide
EtOH	Ethanol
FAME	Fatty acid methyl ester
FDA	Food and drug administration
FOC	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>
GC	Chromatographie gazeuse
GFP	Protéine fluorescente verte
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie en phase liquide haute performance
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
HSL	Homoserine lactone
IAA	Auxine acide indole-3-acétique
ISR	Résistance systémique acquise
ITS	Internal transcribed spacer
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
MAMP	Motifs moléculaires associés aux microbes
MDR	Multidrug resistance
MeOH	Méthanol
MN	Molecular network
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NCBI	National center for biotechnology information
OMS	Organisation mondiale de la santé
OSMAC	One strain many compound
OTU	Unité taxonomique opérationnelle
PBE	Plant beneficial environmental
PBP	Protéines de liaison aux pénicillines
PCR	Réaction en chaîne par polymérase

PDA	Potato dextrose agar
PGPB	Plant growth promoting bacteria
QQ	Quorum quenching
QS	Quorum sensing
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la métiline
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
UFC	Unité formant colonie
UHPLC	Chromatographie en phase liquide à ultra haute performance
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XDR	Extensive drug resistance

## Introduction

Depuis des temps immémoriaux, l'Homme a utilisé la faune et la flore notamment à des fins médicales. Le 20<sup>ème</sup> siècle a initié une rupture avec la pharmacognosie par les avancées en biologie et en synthèse chimique. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les maladies s'avère actuellement cruciale pour un emploi ciblé et rationnel de molécules thérapeutiques.<sup>1</sup> Malgré tout, les produits naturels ont marqué le domaine de la santé moderne en étant source d'inspiration pour des squelettes chimiques originaux à potentialité thérapeutique. La littérature indique que 37% des petites molécules approuvées comme médicament par la FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 et 2014 sont des produits naturels ou leurs analogues.<sup>2</sup> Par exemple, depuis les années 1940, sur les 175 composés antitumoraux approuvés (hors vaccins et protéines), 85 soit 49% sont directement issus ou inspirés de composés naturels.<sup>2</sup> Malgré cela, les sociétés pharmaceutiques ont délaissé leur programme de recherche de médicaments dérivés de substances naturelles au profit des grandes campagnes de criblage à haut débit de collections chimiques, de la chimie combinatoire et du développement des anticorps.<sup>1,2</sup>

Pour autant, la chimie des substances naturelles n'a pas perdu tout son potentiel. Sur les 59 entités chimiques approuvées comme médicaments en 2018, dix ont une structure chimique dérivée de produits naturels.<sup>3</sup> De nouvelles avancées technologiques suscitent également un regain d'intérêt pour ce domaine, notamment avec la manipulation des génomes microbiens, l'activation de voies cryptiques de biosynthèses ou encore les études métabolomiques par réseaux moléculaires.<sup>4</sup>

L'équipe « Métabolites de plantes et micro-organismes associés : isolement, synthèse et bioactivité » de l'ICSN s'intéresse à la valorisation des molécules naturelles dans le domaine de la santé. À ce titre, les micro-organismes présentent un secteur de recherche prometteur. En effet, les micro-organismes sont une source relativement peu connue de métabolites secondaires en proportion de leur abondance et de leur diversité sur Terre. Il a été estimé que seulement 1% des espèces bactériennes et moins de 5% des espèces fongiques sont actuellement connues, portant à plusieurs millions le nombre d'espèces microbiennes encore à découvrir.<sup>5</sup>

Parmi ces sources microbiennes, les micro-organismes associés aux plantes appelés endophytes ont été peu exploités. Pourtant leur évolution en tant que symbiotes de plantes les a amenés à être présents dans des environnements uniques, spécifiques et compétitifs. Ils se sont ainsi montrés être une source indéniable de substances naturelles originales.<sup>6</sup>

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'ANR international SECIL (Study of leaf endophytic fungi : Exploration and valorization of biosourCed Innovative antibacterial metaboLites) pour la découverte de métabolites secondaires bioactifs à partir d'endophytes. Au sein de ce projet, nous sommes attachés à étudier la diversité chimique de communautés d'endophytes isolées de plusieurs feuilles de spécimens du palmier *Astrocaryum sciophilum*. *A. sciophilum* a été la plante modèle choisie pour ce projet en raison de la longévité et de la pousse périodique de ses feuilles. Ainsi, il a été postulé que des communautés d'endophytes présentes sur des feuilles âgées peuvent

---

<sup>1</sup> Ortholand J.-Y., Ganesan A., Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, p. 271–280.

<sup>2</sup> Newman D. J., Cragg G. M., Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, p. 629–661.

<sup>3</sup> G. de la Torre B., Albericio F., The pharmaceutical industry in 2018. an analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules* **2019**, *24*, p. 809.

<sup>4</sup> Trivella D. B. B., de Felicio R., The tripod for bacterial natural product discovery: genome mining, silent pathway induction, and mass spectrometry-based molecular networking. *mSystems* **2018**, *3*, p. e00160-17.

<sup>5</sup> Gunatilaka A. A. L., Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, p. 509–526.

<sup>6</sup> Zhang H. W., Song Y. C., *et al.*, Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, p. 753–771.

abriter des souches plus compétitives, qui ont dû lutter contre d'autres micro-organismes pour s'installer dans l'hôte de façon pérenne.

L'objectif de cette thèse a été d'exploiter la diversité chimique de ces endophytes afin de trouver des métabolites secondaires possédant une activité antibiotique ou de quorum quenching sur le pathogène humain *Staphylococcus aureus*. Par la suite, ce projet a également été dirigé afin d'identifier un rôle de défense par les micro-organismes endophytes contre le phytopathogène *Fusarium oxysporum*. Ces recherches sont présentées dans le présent manuscrit, après un état de l'art sur le contexte actuel de résistance aux antimicrobiens et sur une présentation non exhaustive des micro-organismes endophytes.

# État de l'art

---

## I. Lutte contre les infections en santé publique

Le 20<sup>ème</sup> siècle a été marqué par l'avènement des agents antimicrobiens permettant une avancée considérable dans la lutte contre les contaminations et infections. Plusieurs catégories d'antimicrobiens peuvent être décrites<sup>7</sup> :

- les désinfectants, comme l'eau de javel, qui sont des produits non sélectifs utilisés sur les surfaces inertes,
- les antiseptiques, comme la bétadine, ayant également un spectre d'activité très large utilisés sur des tissus vivants en usage externe,
- et les antibiotiques (antibactériens, antifongiques, antiviraux ...), de spécificité variable, agissant lentement mais de manière systémique dans tout l'organisme. Les antibiotiques ont la capacité de tuer les microbes infectieux ou d'inhiber leur développement (effet biostatique).

L'utilisation massive des antimicrobiens depuis les années 1940 a permis une diminution de la mortalité causée par les maladies infectieuses à travers le monde, augmentant ainsi l'espérance de vie. En effet, aux États-Unis en 1900, les trois principales causes de mortalité étaient la pneumonie, la tuberculose et les épisodes de diarrhées et entérites. Ces maladies causaient un tiers des décès dont 40% survenaient chez les enfants de moins de cinq ans. Tandis qu'en 1997, le pourcentage de mortalité occasionnée par les principales maladies infectieuses (la pneumonie et les virus de la grippe et du SIDA) représentait 4,5%.<sup>8</sup>

Deux types d'antimicrobiens peuvent être distingués : les antimicrobiens d'origine naturelle, dont la plupart ont été découverts et isolés de micro-organismes, et les antimicrobiens synthétiques. Des antibiotiques possédant une origine naturelle et modifiés par synthèse ont également été développés afin d'améliorer leurs activités thérapeutiques.<sup>9</sup> Cette partie de ce manuscrit présente un état de l'art sur les différentes classes d'antimicrobiens utilisées cliniquement et leurs modes d'action, puis rassemble quelques informations sur le phénomène inquiétant de résistance à ces molécules ainsi que les moyens mis en place pour garder l'acquis de l'Homme en matière de lutte microbienne.

### 1.1. Classes et modes d'action des antimicrobiens

Les antimicrobiens sont distingués selon leur cible microbienne (bactérie, champignon...) et répartis en classes suivant leur structure chimique. Cette structure chimique impacte leur mode d'action ainsi que leurs propriétés pharmacologiques.

#### 1.1.1. Les antibactériens

Il existe plusieurs classes d'antibactériens, détaillées de manière non exhaustive dans les paragraphes suivants.

##### 1.1.1.1. Les $\beta$ -lactamines

Ce groupe comprend les analogues de la pénicilline, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Tous ces composés contiennent un noyau  $\beta$ -lactame à quatre chaînons (en bleu

<sup>7</sup> Combemorel P., 'Antiseptiques, antibiotiques, désinfectants : quelles différences?', consulté sur <https://planet-vie.ens.fr/article/2236/antiseptiques-antibiotiques-desinfectants-queelles-differences>, 2016.

<sup>8</sup> Achievements in public health, 1900-1999: control of infectious diseases. *MMWR* 1999, 48, p. 621-628.

<sup>9</sup> Fair R. J., Tor Y., Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* 2014, 6, p. 25-64.

sur la Figure I. 1). Des variations s'opèrent sur les substitutions ou le noyau adjacent selon les classes, modifiant ainsi les propriétés chimiques et biologiques des molécules.<sup>10</sup>

Nous devons la découverte de la première  $\beta$ -lactamine à Alexander Fleming en 1928, avec l'isolement de la pénicilline G (benzylpénicilline) à partir d'un champignon filamenteux *Penicillium notatum*.<sup>10</sup> Son développement pour une utilisation médicale a été initié en 1940 afin de soigner les soldats blessés de la seconde guerre mondiale. De nombreuses pénicillines ont eu une utilisation clinique majeure contre les infections à streptocoque et à staphylocoque comme la méticilline, l'oxacilline et la cloxacilline.

La classe des céphalosporines a été découverte en 1945 à partir de moisissures du genre *Acremonium*. Depuis, avec l'introduction de formes semi-synthétiques, cinq générations de céphalosporines ont été développées et commercialisées, possédant des efficacités différentes sur les bactéries à Gram positif et/ou à Gram négatif. Le noyau caractéristique des céphalosporines (cycle  $\beta$ -lactame accolé à une dihydrothiazine) a également été retrouvé produit par des souches de *Streptomyces* et compose le sous-groupe des céphamycines.<sup>10</sup>

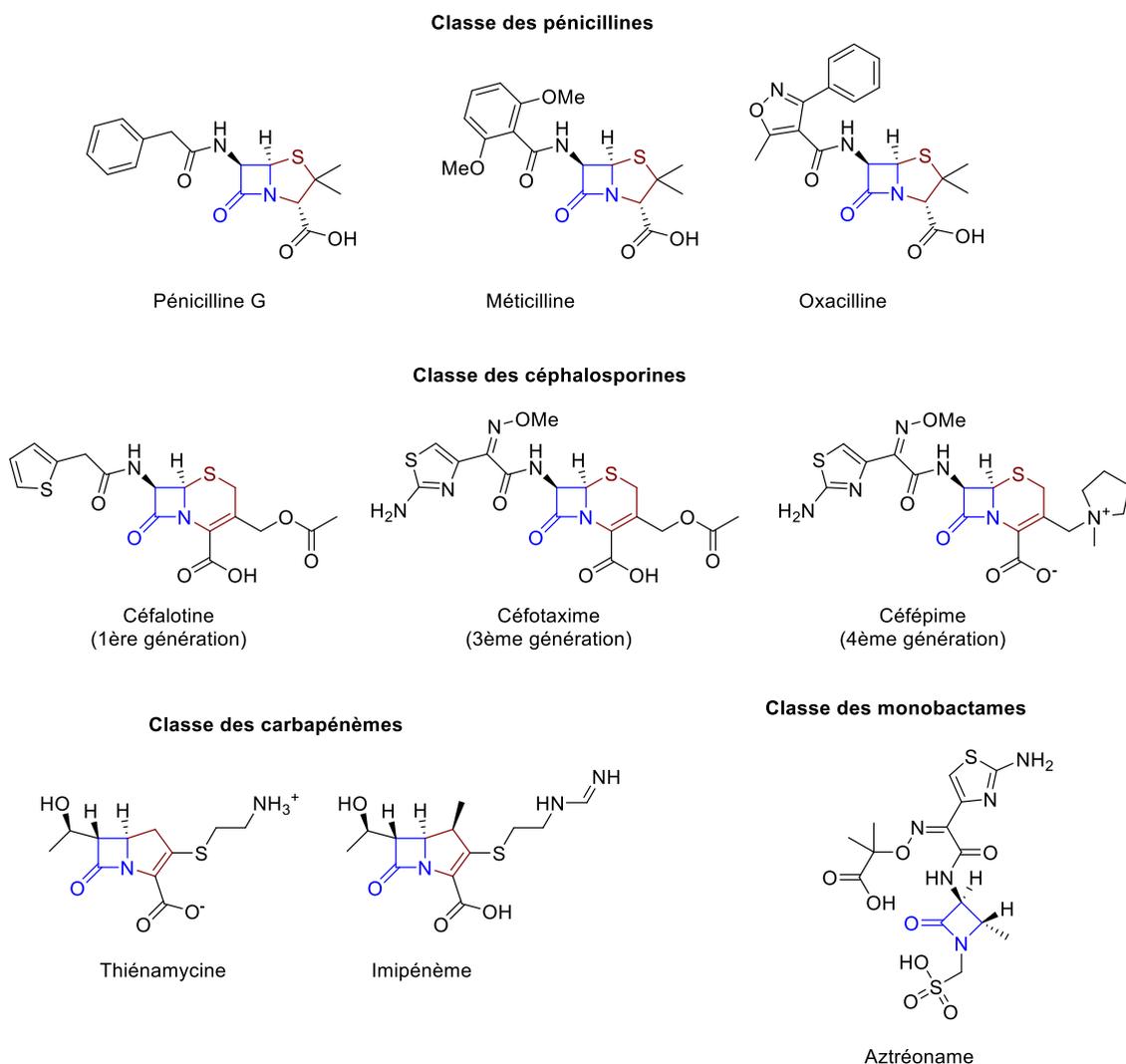


Figure I. 1. Exemples d'antibactériens de la classe des  $\beta$ -lactamines.  
Le cycle  $\beta$ -lactame est représenté en bleu.

<sup>10</sup> Bush K., Bradford P. A.,  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2016**, 6, p. 1–22.

Le premier carbapénème, la thiénamycine, a été isolé de *Streptomyces cattleya* lors de la recherche d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases.<sup>11</sup> A partir de ce composé, de nombreux carbapénèmes ont été développés synthétiquement étant donné leur activité antibactérienne sur un large spectre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif.

Les monobactames forment une classe caractérisée par un noyau  $\beta$ -lactame seul, non accolé à un deuxième cycle. Produite par des bactéries du sol (*Chromobacterium*, *Gluconobacter*, *Acetobacter*...), cette classe a été découverte en 1979 et est particulièrement efficace contre les bactéries à Gram négatif.<sup>12,13</sup> L'aztréoname est le seul monobactame autorisé pour un usage thérapeutique.<sup>10</sup>

Les  $\beta$ -lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés : ils représenteraient 65% des prescriptions antibiotiques aux États-Unis entre 2004 et 2014, les céphalosporines contribuant pour moitié à ce pourcentage.<sup>10</sup> Leur succès est dû à leur efficacité et leur tolérance. Ils agissent sur la formation de la paroi cellulaire en formant des liaisons covalentes avec des protéines essentielles à la bactérie nommées protéines de liaisons aux pénicillines (penicillin-binding proteins PBPs). Ces enzymes ont des activités de transpeptidases, en étant impliquées dans la formation de la liaison entre deux unités du peptidoglycane. Leur inhibition entraîne la lyse cellulaire ou l'arrêt de la division cellulaire.<sup>10</sup> Chaque espèce bactérienne (à Gram positif et à Gram négatif) a son propre panel de PBPs permettant la formation de peptidoglycane, ce qui peut engendrer des spécificités entre les espèces et les classes de  $\beta$ -lactamines.

#### 1.1.1.2. Glycopeptides

Les glycopeptides développés en antimicrobiens sont des heptapeptides non-ribosomiques glycosylés (Figure I. 2). Les premiers ont été découverts à partir de bactéries de la classe des actinomycètes (*Amycolatopsis*, *Actinoplanes*). La vancomycine et la teicoplanine entrent dans la première génération des glycopeptides mis sur le marché en 1958 et 1988 respectivement.<sup>14</sup> La deuxième génération compte des dérivés semi-synthétiques de glycopeptides naturels comme la télavancine.<sup>14</sup>

Les glycopeptides agissent sur la paroi cellulaire en empêchant l'élongation du peptidoglycane par liaison au dipeptide terminal (D-Ala-D-Ala). Les glycopeptides sont inefficaces sur les bactéries à Gram négatif car la grande taille de ces molécules ne leur permet pas de passer à travers les pores de la membrane externe et d'atteindre la paroi où se polymérise le peptidoglycane.<sup>9</sup>

---

<sup>11</sup> Papp-Wallace K. M., Endimiani A., *et al.*, Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, p. 4943–4960.

<sup>12</sup> Sykes R. B., Bonner D. P., Discovery and development of the monobactams. *Rev. Infect. Dis.* **1985**, 7, p. S579–S593.

<sup>13</sup> Sykes R. B., Bonner D. P., Aztreonam: the first monobactam. *Am. J. Med.* **1985**, 78, p. 2–10.

<sup>14</sup> Binda E., Marinelli F., *et al.*, Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiotics* **2014**, 3, p. 572–594.

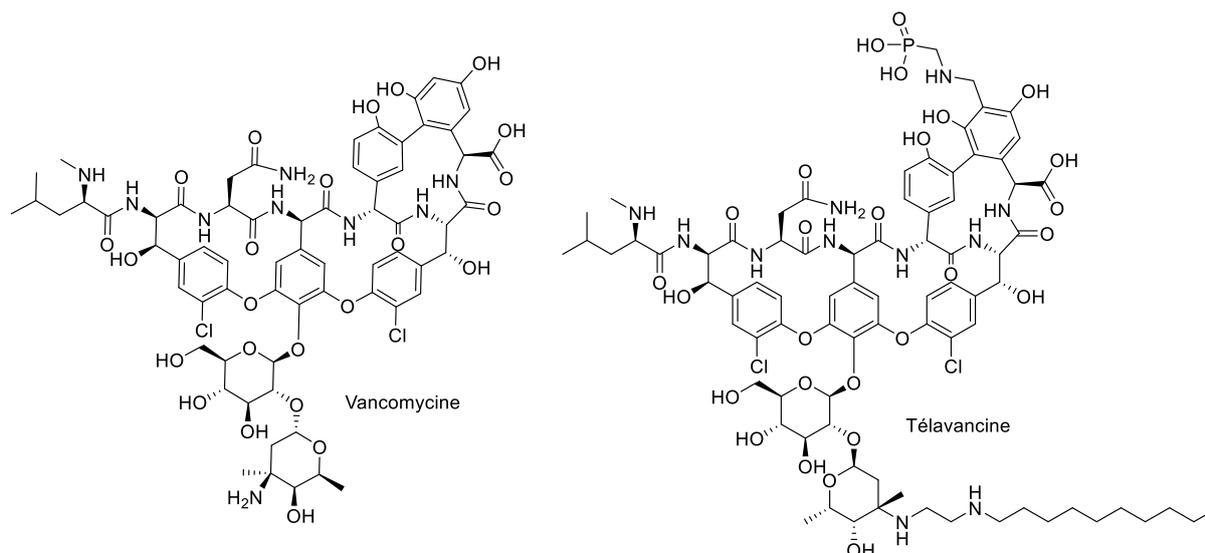


Figure I. 2. Exemples d'antibactériens de la classe des glycopeptides.

### 1.1.1.3. Tétracyclines

Les antibiotiques de la classe des tétracyclines présentent un squelette octahydro-tétracène (Figure I. 3). La première, la tétracycline, a été isolée dans les années 1940 de la bactérie *Streptomyces aureofaciens*.<sup>15</sup> Des approches semi-synthétiques ont par la suite rapidement été conduites afin d'améliorer leur solubilité et leur efficacité. Trois générations de tétracyclines peuvent être distinguées selon les périodes de mise sur le marché.

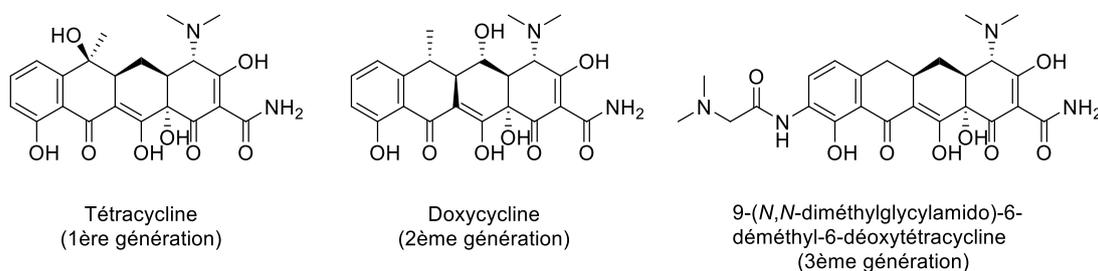


Figure I. 3. Exemples d'antibactériens de la classe des tétracyclines.

Il semblerait que les tétracyclines inhibent la synthèse protéique des bactéries en empêchant l'association d' aminoacyl-ARNt au ribosome bactérien. Afin d'interagir avec cette cible, ces molécules nécessitent de traverser la ou les membranes bactériennes. Étant de bons agents de chélation, la formation d'un complexe antibiotique/ion métallique cationique leur permet de passer par les pores nucléaires des membranes. L'association des tétracyclines au ribosome est réversible ce qui pourrait expliquer l'activité bactériostatique de ces composés.<sup>15</sup>

<sup>15</sup> Chopra I, Roberts M., Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 65, p. 232-260.

### 1.1.1.4. Aminoglycosides

Le premier aminoglycoside, la streptomycine, a été découvert en 1943 à partir de *Streptomyces griseus* (Figure I. 4). Ces antibactériens sont des composés glycosylés possédant plusieurs groupements amine ou hydroxy.<sup>9</sup>

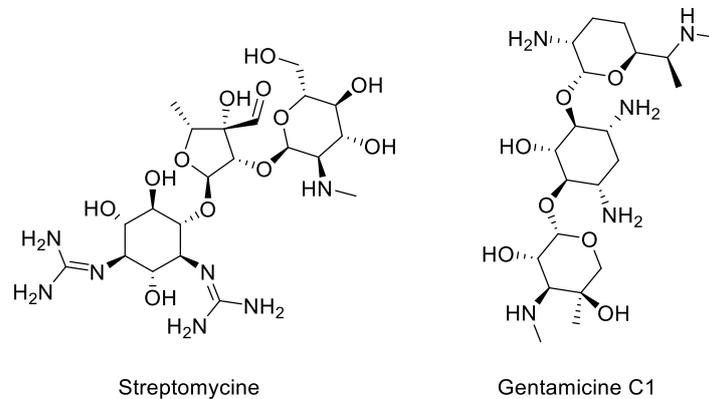


Figure I. 4. Exemples d'antibactériens de la classe des aminoglycosides.

Ces groupements amine font des aminoglycosides des molécules polycationiques en milieu biologique. Ils montrent ainsi de hautes affinités pour des portions d'ARN.<sup>9</sup> Il a par exemple été montré que la gentamicine se lie avec le site A du ribosome bactérien, empêchant ainsi l'insertion des aminoacyl-ARNt.<sup>16</sup>

### 1.1.1.5. Macrolides

La première molécule découverte de la classe des macrolides est l'érythromycine en 1952 (Figure I. 5).<sup>17</sup> Elle a été rapidement utilisée cliniquement pour remplacer la pénicilline chez les patients allergiques à cette dernière. D'autres macrolides ont par la suite été développés et sont principalement efficaces contre les bactéries à Gram positif. Les macrolides comportent un macrocycle lactone de 14, 15 ou 16 carbones substitué par plusieurs sucres.<sup>17</sup>

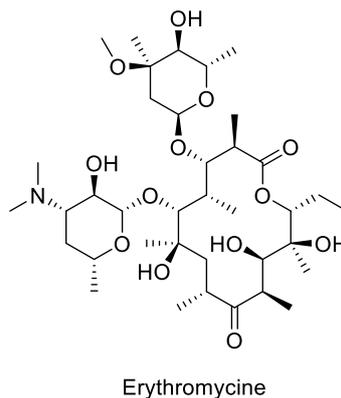


Figure I. 5. Exemple de macrolide.

<sup>16</sup> Kotra L. P., Haddad J., *et al.*, Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, p. 3249–3256.

<sup>17</sup> Mazzei T., Mini E., *et al.*, Chemistry and mode of action of macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* **1993**, *31*, p. 1–9.

Les macrolides interagissent avec le ribosome des bactéries par de nombreuses liaisons hydrogènes, et semblent affecter différents aspects de la synthèse protéique : interférences avec la sous-unité 50S du ribosome, dissociation de l'ARNt du ribosome empêchant la traduction protéique et inhibition de la formation de liaison peptidique. L'inhibition de la synthèse protéique des bactéries est alors un facteur entraînant l'arrêt de la croissance cellulaire.<sup>18</sup>

#### 1.1.1.6. Quinolones

Les antibactériens de cette classe possèdent un noyau quinoléine avec diverses substitutions, dont une substitution parfois cyclique sur l'azote.<sup>9</sup> L'acide nalidixique, première quinolone, a été synthétisé en 1962 (Figure I. 6).<sup>9</sup> Beaucoup de dérivés synthétiques ont alors été produits comme la ciprofloxacine qui a été mise sur le marché en 1968. L'ajout d'un atome de fluor sur le noyau a permis d'augmenter la pénétration intracellulaire de ces fluoroquinolones. Quatre générations de quinolones ont été successivement mises sur le marché, avec des activités variables sur les bactéries à Gram positif et/ou à Gram négatif.<sup>9</sup>

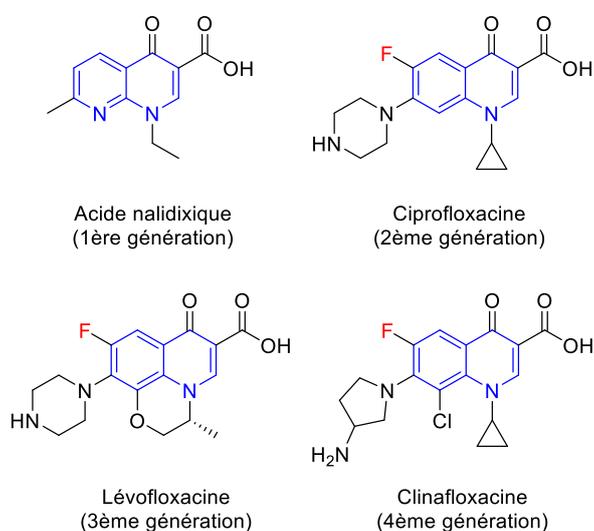


Figure I. 6. Exemples d'antibactériens de la classe des quinolones. Le noyau principal (naphtyridine ou quinoléine) est représenté en bleu.

Les quinolones empêchent la réplication de l'ADN bactérien en inhibant les topoisomérases II et IV. Ces topoisomérases permettent l'enroulement et le stockage de l'ADN dans la cellule.<sup>9</sup>

D'autres antibactériens sont décrits et utilisés, ayant différentes structures chimiques : les polymyxines, les sulfonamides, les lipopeptides... Toutes ces classes attestent de la grande diversité chimique des antibactériens connus. Les différences structurelles entre bactéries et champignons rendent les antibactériens inefficaces contre ces derniers. Des classes de molécules antifongiques ont été développées.

#### 1.1.2. Les antifongiques

Les traitements antifongiques, également appelés antimycotiques, sont des médicaments fongicides ou fongistatiques utilisés dans le cas du développement de mycoses chez l'Homme et les animaux. Les infections fongiques sont soit superficielles, causées par des dermatophytes ou des levures, soit invasives et se manifestent principalement chez des patients immunodéficients.<sup>19</sup>

<sup>18</sup> Gaynor M., Mankin A. S., Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3, p. 949–961.

<sup>19</sup> Chen S. C. A., Sorrell T. C., Antifungal agents. *Med. J. Aust.* **2007**, 187, p. 404–409.

Quatre classes principales d'agents antifongiques peuvent être distinguées : les polyènes, les composés azolés, les allylamines et les échinocandines.

### 1.1.2.1. Polyènes

Les polyènes antifongiques sont formés d'un macrocycle lactone comportant une chaîne insaturée entre 20 et 40 atomes de carbone, substitué par un groupement D-mycosamine (Figure I. 7). Durant 30 ans, l'amphotéricine B, isolé de *Streptomyces nodosus* en 1959, a été le seul médicament commercialisé pouvant traiter les infections fongiques sévères.<sup>20,21</sup> Les polyènes ont une forte affinité pour les stérols incorporés dans les membranes cellulaires, notamment l'ergostérol chez les champignons. La formation de ces complexes perturbe alors l'intégrité cellulaire en formant des pores ce qui favorise la fuite des électrolytes hors du cytoplasme.<sup>22</sup> Cette affinité pour les stérols entraîne une certaine toxicité pour l'Homme par la liaison des polyènes au cholestérol. Ainsi, seuls trois polyènes, les moins toxiques, ont été autorisés pour une utilisation clinique : l'amphotéricine B, la nystatine et la natamycine.

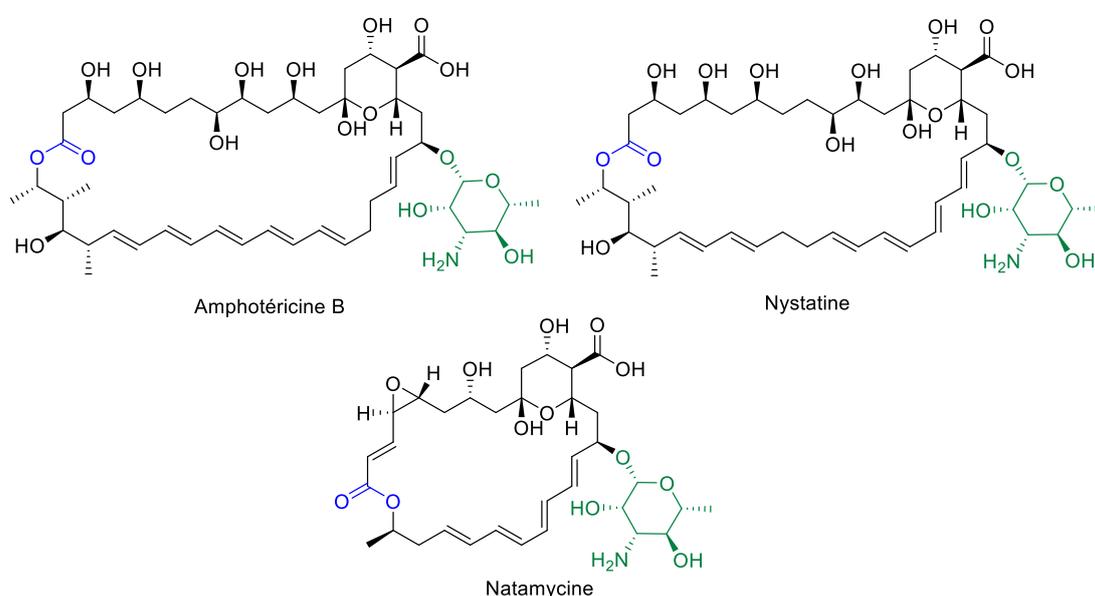


Figure I. 7. Exemples d'antifongiques de la classe des polyènes. Le groupement lactone est représenté en bleu et le groupement D-mycosamine en vert.

### 1.1.2.2. Composés azolés

À partir des années 1980, les composés azolés ont été les antifongiques les plus utilisés cliniquement.<sup>19</sup> Deux groupes de composés azolés peuvent être distingués : les imidazoles (kétoconazole, éconazole, clotrimazole...) et les triazoles (fluconazole, itraconazole, voriconazole...) (Figure I. 8). Deux générations de triazoles ont été développées ; la seconde génération possède un spectre d'activité plus étendu et est également utilisée dans le cas de champignons résistants à la première génération.<sup>19</sup>

<sup>20</sup> Caffrey P., Lynch S., *et al.*, Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, p. 713–723.

<sup>21</sup> Ghannoum M. A., Rice L. B., Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, p. 501–517.

<sup>22</sup> Brajtburg J., Powderly W. G., *et al.*, Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, p. 183–188.

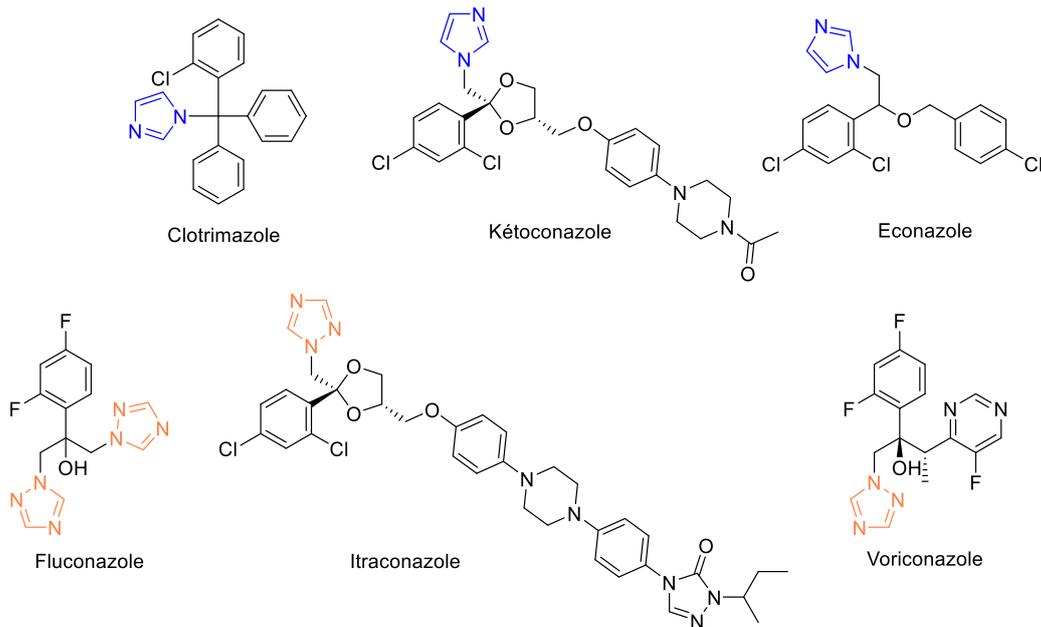


Figure I. 8. Exemples d'antifongiques de la classe des imidazoles (noyau en bleu) et des triazoles (noyau en orange).

Ils agissent en inhibant les cytochromes P450 des champignons : ces derniers ne peuvent plus intervenir dans la déméthylation du 14- $\alpha$ -lanostérol, une des étapes de la biosynthèse de l'ergostérol (Figure I. 9).<sup>19</sup> Cela occasionne une diminution du taux d'ergostérol dans la membrane cellulaire et donc une altération de sa perméabilité. Les triazoles possèdent une affinité plus forte pour les cytochromes P450 fongiques que pour ceux des mammifères, ce qui a permis le traitement des infections de manière efficace et avec un risque de toxicité moindre.

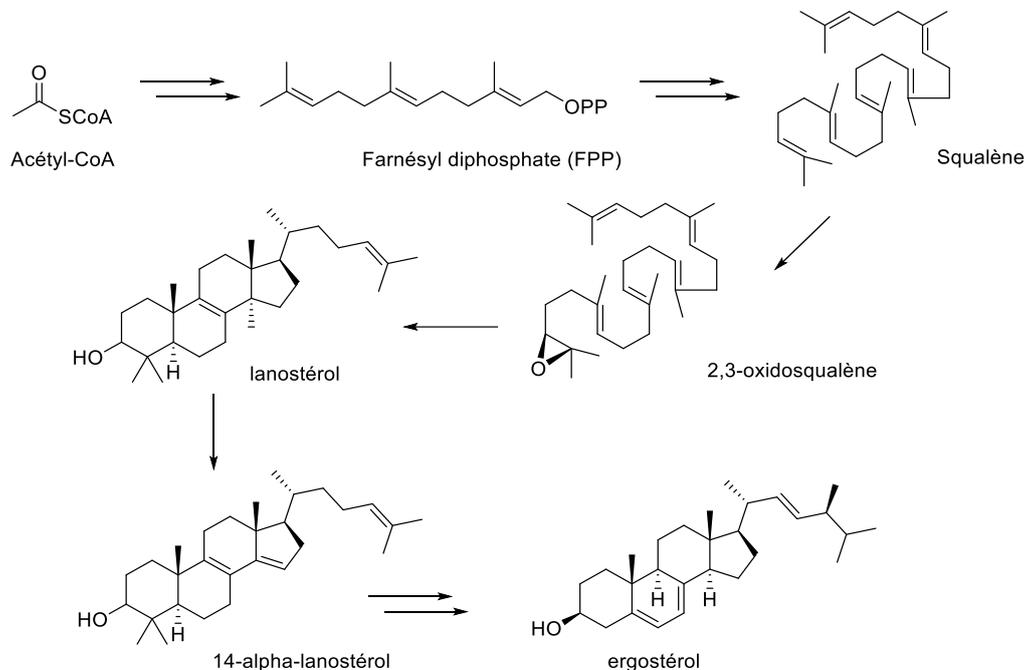


Figure I. 9. Voie de biosynthèse simplifiée de l'ergostérol à partir de l'acétyl-CoA au sein des champignons.

### 1.1.2.3. Allylamines

Les allylamines interviennent également sur la biosynthèse de l'ergostérol à l'étape d'époxydation du squalène (Figure I. 9).<sup>21</sup> La terbinafine et la naftifine sont les allylamines les plus connues et sont utilisées pour traiter les infections de dermatophytes (Figure I. 10).

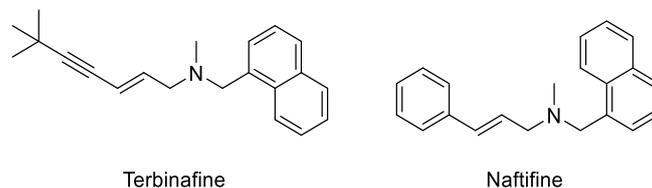


Figure I. 10. Exemples d'antifongiques de la classe des allylamines.

### 1.1.2.4. Echinocandines

La classe des échinocandines est la dernière classe d'antifongique développée au cours du 21<sup>ème</sup> siècle. Ce sont des dérivés synthétiques de lipopeptides. Seules trois molécules ont été pour l'instant autorisées dans certains pays : la caspofungine (Figure I. 11), la micafungine et l'anidulafungine.<sup>19</sup> Faiblement toxiques pour l'homme, elles agissent sur la synthèse du glucane, composant structural de la paroi fongique. Les échinocandines se sont montrées efficaces contre les genres *Candida* et *Aspergillus*.<sup>19</sup>

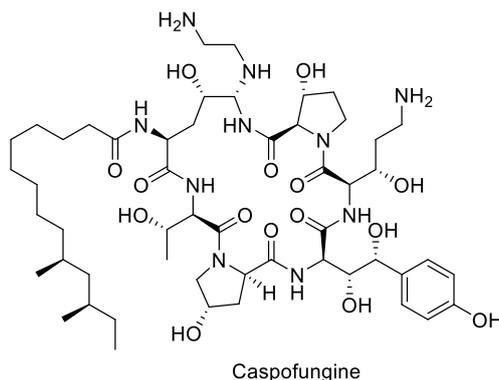


Figure I. 11. Exemple d'échinocandine.

D'autres classes d'antifongiques ont également été développées parmi lesquelles sont retrouvées les morpholines et les fluoropyrimidines (flucytosine, cytosine...),<sup>23,24</sup>

### 1.1.3. Autres antimicrobiens

Les antimicrobiens comptent également les molécules possédant une activité antiparasitaire ou antivirale. Actuellement, le paludisme est la maladie parasitaire avec le plus d'impact dans le monde : en 2015, le parasite *Plasmodium falciparum* a touché 212 millions de patients et causé 429 000 morts, principalement en Afrique sur des enfants de moins de cinq ans.<sup>25</sup> Les traitements basés sur l'artémisinine combinée avec d'autres anti-paludiques sont recommandés pour traiter

<sup>23</sup> Mercer E. I., Morpholine antifungals and their mode of action. *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, 19, p. 788-793.

<sup>24</sup> Vermes A., Guchelaar H. J., *et al.*, Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, 46, p. 171-179.

<sup>25</sup> Blasco B., Leroy D., *et al.*, Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat. Med.* **2017**, 23, p. 917-928.

et prévenir la maladie. La plupart des agents antiviraux ont été conçus pour le traitement des virus du VIH, de l'herpès, des hépatites B et C ainsi que des virus de la grippe.<sup>26</sup>

Malheureusement depuis quelques dizaines d'années, la recherche peine à découvrir de nouvelles classes de molécules antimicrobiennes. Depuis les années 1960, aucune nouvelle classe de composés antibactériens à spectre large n'a été découverte. Et hormis la bédaquiline acceptée en 2012 pour son activité antibactérienne contre *M. tuberculosis* multirésistante, la dernière classe d'antibiotique à spectre réduit découverte a été les streptogramines en 1964 pour une autorisation dans les années 1990.<sup>27</sup> Cette constatation inquiète d'autant plus que l'efficacité des antimicrobiens actuels baisse au vu de la résistance que les pathogènes ont développée à leur rencontre.

## 1.2. La résistance antimicrobienne

Le phénomène de résistance des micro-organismes est un processus biologique naturel permettant l'adaptation des organismes dans le temps. Il se génère par des mutations génétiques qui sélectionnent ainsi les souches capables de résister aux stress subis.<sup>9</sup>

La résistance des pathogènes aux antimicrobiens a été prédite par Alexander Fleming dès 1945 lors de la remise de son prix Nobel : « [But] I would like to sound one note of warning. [...] There may be a danger, though, in underdosage. It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentration not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body. The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant. [...] Moral: If you use penicillin, use enough.»<sup>28</sup>

Au-delà d'un processus naturel, ce phénomène est actuellement inquiétant car les résistances aux antimicrobiens se développent de plus en plus rapidement après chaque mise sur le marché d'une nouvelle molécule. Sachant qu'avant l'ère des antibiotiques, 30% de la mortalité étaient dus aux infections (tuberculose, pneumonie et gastroentérites), la prise de conscience sur la gravité de cette situation est devenue mondiale.<sup>9</sup>

### 1.2.1. Développement et transfert des mécanismes de résistance

Actuellement, des résistances à toutes les classes d'antimicrobiens développées sont connues.

#### 1.2.1.1. Résistance bactérienne

Plusieurs mécanismes de résistances ont été mis à jour chez les bactéries, empêchant l'activité initiale des antibactériens (Figure I. 12) :

- la dégradation ou modification des antibactériens. L'exemple le plus connu est la dégradation par hydrolyse des  $\beta$ -lactamines par des enzymes  $\beta$ -lactamases. Différentes enzymes acquises par les bactéries peuvent également modifier les antibactériens en ajoutant un groupement acétyl ou phosphate changeant ainsi sa capacité de liaison au site actif,<sup>29</sup>

<sup>26</sup> Razonable R. R., Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, *86*, p. 1009-1026.

<sup>27</sup> Lewis K., Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, p. 371-387.

<sup>28</sup> Fleming A., Nobel Lecture : Penicillin. **1945**.

<sup>29</sup> Peterson E., Kaur P., Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*.

- l'altération du site actif, modifiant l'affinité de l'antibactérien à celui-ci. Les souches *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) présentent des protéines PBP insensibles à l'action des  $\beta$ -lactamines,<sup>29</sup>
- l'augmentation de l'efflux des molécules hors de la cellule ou diminution de la perméabilité cellulaire. Des mutations sur les gènes codant pour les porines impactent la sensibilité des bactéries à Gram négatif aux antibiotiques hydrophiles.<sup>30</sup> Les bactéries à Gram négatif sont devenues particulièrement efficaces à empêcher les antibactériens de pénétrer leur membrane.

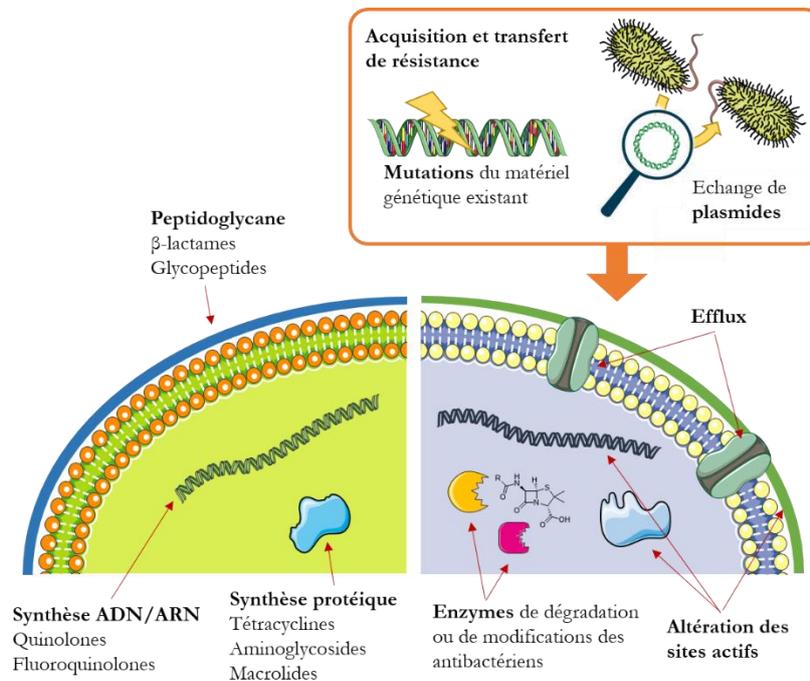


Figure I. 12. Sites d'actions de quelques classes d'antibiotiques (à gauche) et mécanismes de résistance développés par les bactéries (à droite).

Deux processus ont été identifiés, provoquant l'acquisition de résistance chez les bactéries :

- des mutations de l'ADN de la cellule bactérienne, provoquant des changements sur le matériel génétique existant,
- l'insertion dans le matériel génétique bactérien de gènes nouveaux.<sup>31</sup>

En effet, les bactéries échangent du matériel génétique notamment par transfert de plasmides. Ces éléments, mobiles d'une cellule à une autre, sont des molécules d'ADN double brins, circulaires ou non, et sont composés de plusieurs gènes. Ce matériel génétique s'échange par des mécanismes, comme la conjugaison entre les bactéries, et peuvent alors s'insérer dans le génome. Ces échanges participent largement à la dissémination des gènes de résistance entre les bactéries.<sup>31</sup>

Certaines bactéries peuvent acquérir ainsi plusieurs gènes d'intérêt, leur permettant de devenir résistantes à différentes classes d'antibiotiques. C'est le cas de souches de staphylocoque, qui ont montré des résistances à la fois envers les  $\beta$ -lactamines et les quinolones. Il est estimé qu'aux États-Unis, 19 000 morts sont occasionnés chaque année par une infection au staphylocoque doré

<sup>30</sup> Li H., Luo Y.-F., *et al.*, Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int. J. Med. Microbiol.* **2012**, 302, p. 63-68.

<sup>31</sup> Bennett P. M., Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 153, p. S347-S357.

résistant à la méticilline (SARM).<sup>9</sup> L'utilisation de vancomycine afin de traiter les infections causées par SARM, par *Clostridium difficile* et par les entérocoques ont favorisé par la suite l'émergence des staphylocoques résistants à la vancomycine.<sup>32</sup>

Le développement de la multi-résistance chez les bactéries à Gram positif (pneumocoque, entérocoque et staphylocoque) et chez les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp.) inquiète face à l'absence de renouveau de notre arsenal chimique. En 2014, environ 480 000 cas de tuberculose multi-résistante ont été estimés. Parmi ces cas, 9,7% des patients était supposément atteints d'une tuberculose ultrarésistante (XDR), c'est-à-dire résistante à au moins une fluoroquinolone et aux trois antituberculeux de deuxième intention (amikacine, capréomycine et kanamycine).<sup>33</sup> Dans certains pays, les carbapénèmes sont inefficaces pour la moitié des patients atteints d'une infection au *Klebsiella pneumoniae*. De même, la résistance d'*E. coli* aux fluoroquinolones s'est largement répandue.<sup>33</sup> Ce même phénomène de résistance se retrouve aussi pour les traitements antifongiques.

#### 1.2.1.2. Résistance fongique

La plupart des infections fongiques se développent chez des patients immunodéprimés et peuvent engager le pronostic vital.<sup>34</sup>

L'altération des cibles des molécules antifongiques, leur efflux hors de la cellule et la réduction de l'accessibilité à ces cibles sont des mécanismes de résistance importants chez les champignons.<sup>21</sup> Peu de publications attestent de l'existence de la dégradation des antifongiques comme mécanisme de résistance, à l'instar des bactéries.

L'efflux actif des antifongiques azolés par un système protéique a été observé chez les genres *Candida*, *Cryptococcus* et *Saccharomyces*.<sup>21</sup> Des mutations des gènes codant pour l'enzyme glucane synthase ont été observées, participant à la résistance des levures *Candida* aux échinocandines.<sup>35</sup> Des cas de candidoses multi-résistantes sont donc apparus. La résistance d'*Aspergillus fumigatus* aux composés azolés a été causée par des mutations du gène codant pour l'enzyme Cyp51 impliquée dans la conversion de lanostérol en ergostérol.<sup>35</sup>

Les connaissances sur les échanges génétiques entre les champignons, s'ils existent, sont moins abouties que ce que nous savons des échanges entre les bactéries.<sup>36</sup>

#### 1.2.1.3. Résistance antiparasitaire et antivirale

En 2016, la résistance de *P. falciparum*, parasite responsable du paludisme, face aux traitements combinatoires basés sur l'artémisine a été confirmée dans cinq pays : le Cambodge, le Laos, la Birmanie, la Thaïlande et le Vietnam.<sup>33</sup> De même, le développement de résistance des virus du VIH et de la grippe est sous surveillance afin d'éviter leur dissémination.<sup>33</sup>

### 1.2.2. Causes

La principale cause de l'augmentation du phénomène de résistance aux antimicrobiens est la surconsommation et l'utilisation inappropriée de ces composés dans de nombreuses activités

<sup>32</sup> Lowy F. D., Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, p. 1265–1273.

<sup>33</sup> 'Antimicrobial Resistance', consulté sur <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, **2018**.

<sup>34</sup> Cowen L. E., Sanglard D., *et al.*, Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2015**, *5*.

<sup>35</sup> Wiederhold N. P., Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect. Drug Resist.* **2017**, *10*, p. 249–259.

<sup>36</sup> Richards T. A., Leonard G., *et al.*, Gene transfer into the fungi. *Fungal Biol. Rev.* **2011**, *25*, p. 98–110.

humaines.<sup>9</sup> Cette grande quantité d'antimicrobiens consommée induit une pression sélective sur les micro-organismes.

Dans de nombreux pays développés et en voie de développement, leur utilisation excessive est due à leur disponibilité et leur facilité d'acquisition.<sup>37</sup> Les milieux hospitaliers contribuent principalement à l'apparition de résistance étant donné l'utilisation intensive et longue d'antibiotiques en ces lieux. En effet, selon une étude, 35% des patients hospitalisés en Europe ont reçu un traitement antimicrobien en 2011. De plus, la présence importante de personnes fragilisées et de patients immunodéficients (ayant subi transplantations, chimiothérapies...) favorise la propagation des infections.<sup>37</sup> De nombreuses infections nosocomiales se développent dans ces milieux, principalement causées par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Des études ont montré que l'utilisation d'une unique molécule (ou d'une unique classe) antimicrobienne sur de longues périodes en grande quantité favorise la sélection de souches résistantes. Par exemple, afin de contrer la résistance de souches *Escherichia coli* au triméthoprim/sulfaméthoxazole, le centre de santé de Denver (États-Unis) a utilisé la lévofloxacine comme traitement des infections urinaires à partir de 1999. Une étude rapporte alors qu'une augmentation de la résistance à cette fluoroquinolone a rapidement suivi en six ans.<sup>38</sup>

Les antibiotiques sont également utilisés de manière non négligeable dans les domaines de l'agriculture et de la nutrition animale.<sup>39</sup> Ces utilisations massives participent à la dissémination de ces composés dans l'environnement. Des mécanismes de résistance se retrouvent ainsi chez des souches environnementales. L'analyse microbienne d'échantillons de sols ou de rivières en Asie et en Afrique atteste de la présence de mécanismes de résistance aux antimicrobiens pour plus de 75% des bactéries isolées.<sup>40</sup> Également, les eaux usées municipales, pouvant contenir des traces de métabolisation incomplète d'antibiotiques, rendent compte de concentrations élevées de bactéries résistantes.<sup>37</sup>

L'apparition de résistance est parfois difficilement attribuable à une seule cause. L'émergence simultanée entre 2009 et 2013 du champignon multirésistant *Candida auris* dans plusieurs régions de la planète pourrait être due à la pression médicamenteuse par les antifongiques ainsi qu'au changement climatique.<sup>41</sup> De plus, la mondialisation et la facilité des échanges participent également à la dissémination rapide des souches résistantes ce qui nécessite une harmonisation mondiale des pratiques et des politiques d'utilisation des antimicrobiens.<sup>42</sup>

### 1.2.3. Prévention

L'émergence et la propagation rapide de résistances peuvent être retardées par une utilisation plus judicieuse et raisonnée des antibiotiques. Notamment, les traitements antibiotiques ne doivent pas être proscrits dans le cas d'infections virales ce qui nécessite la mise en place de moyens de diagnostic rapide permettant la distinction entre les celles-ci et les infections bactériennes.<sup>43</sup> De préférence, ils doivent être choisis spécifiquement selon le pathogène, avec un

---

<sup>37</sup> Prestinaci F., Pezzotti P., *et al.*, Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Global Health* **2015**, *109*, p. 309–318.

<sup>38</sup> Johnson L., Sabel A., *et al.*, Emergence of fluoroquinolone resistance in outpatient urinary *Escherichia coli* isolates. *Am. J. Med.* **2008**, *121*, p. 876–884.

<sup>39</sup> Chang Q., Wang W., *et al.*, Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* **2015**, *8*, p. 240–247.

<sup>40</sup> Manyi-Loh C., Mamphweli S., *et al.*, Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules* **2018**, *23*, p. 795–843.

<sup>41</sup> Forsberg K., Woodworth K., *et al.*, *Candida auris*: the recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Med. Mycol.* **2019**, *57*, p. 1–12.

<sup>42</sup> MacPherson D. W., Gushulak B. D., *et al.*, Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. *Emerging Infect. Dis.* **2009**, *15*, p. 1727–1731.

<sup>43</sup> Leekha S., Terrell C. L., *et al.*, General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, *86*, p. 156–167.

spectre d'activité le plus réduit possible, et consommé le temps nécessaire pour éliminer l'infection.<sup>43</sup>

La gestion de la consommation de ces antimicrobiens chez l'Homme ou les animaux reste la clé de voûte pour une perte de vitesse de ces phénomènes de résistance. Les gouvernements et organisations mettent en place des plans d'actions afin de prévenir les risques de la résistance antimicrobienne et d'occasionner une prise de conscience. En 2006, l'Union européenne interdit l'utilisation non médicale des antibiotiques chez les animaux, évitant une utilisation sub-thérapeutique à des fins de croissance et de prévention des maladies.<sup>39</sup> L'OMS publie ainsi en 2015 un projet de plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens.<sup>44</sup> En France, comme dans de nombreux autres pays, des campagnes de prévention ont été souvent menées afin d'informer la population par des slogans du bon usage des antibiotiques (Figure I. 13).



Figure I. 13. Campagnes de prévention pour l'utilisation raisonnée des antibiotiques en France par le ministère de la santé, le ministère de l'agriculture et de l'alimentation et l'assurance maladie.

En parallèle de cette prise de conscience sur notre consommation d'antibiotiques, des stratégies sont envisagées afin de renouveler notre arsenal thérapeutique.

### 1.3. Stratégies contre la résistance antimicrobienne

#### 1.3.1. Inhibiteurs d'enzymes de dégradation

Afin de pallier l'activité de dégradation des  $\beta$ -lactamases, des inhibiteurs de ces enzymes ont été développés et associés au traitement antibactérien lors de l'utilisation de  $\beta$ -lactamines.<sup>10</sup> L'acide clavulanique a été la première molécule inhibitrice de  $\beta$ -lactamases découverte dans les années 1970. La sulbactame et la tazobactame ont été également commercialisées (Figure I. 14).<sup>10</sup>

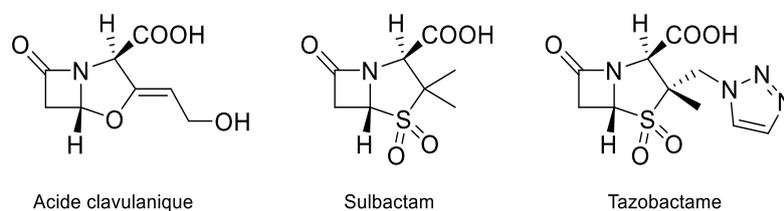


Figure I. 14. Exemples d'inhibiteur de  $\beta$ -lactamases.

Ces inhibiteurs se lient de façon irréversible aux  $\beta$ -lactamases, empêchant ainsi leur action de dégradation des antibiotiques  $\beta$ -lactamines.

<sup>44</sup> 'OMS | Projet de plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens', consulté sur [http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/development\\_process/fr/](http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/development_process/fr/), 2014.

### 1.3.2. Combinaison et alternance des thérapies

La combinaison de deux agents antimicrobiens comme thérapie peut être plus efficace que l'utilisation d'un seul. En effet, les mécanismes de résistance étant différents entre les classes antimicrobiennes, la probabilité qu'une souche pathogène ait acquis à la fois deux mécanismes de résistance est plus faible que l'acquisition d'un seul.<sup>43</sup> Des mécanismes de synergie peuvent également se produire, améliorant ainsi les effets désirés. Une thérapie combinatoire entre une formulation d'amphotéricine B et la flucytosine se révèle efficace pour le traitement de la méningite cryptococcale.<sup>19</sup>

Quelques études ont montré l'efficacité de thérapies préconisant l'utilisation alternative de différents antimicrobiens.<sup>45</sup> L'émergence de résistance se fait ainsi moins rapidement que dans le cas de l'utilisation unique d'une molécule. De plus, des phénomènes de résistance croisée négative ont été décrits : lorsqu'un micro-organisme acquiert un mécanisme de résistance à un antimicrobien, sa sensibilité à une autre classe peut augmenter.<sup>45</sup>

### 1.3.3. Vaccins

Le traitement des infections bactériennes par les vaccins a été envisagé. Les vaccins entraînent le système immunitaire des hôtes à répondre plus rapidement et plus efficacement à une maladie, ou alors à en réduire ses effets.<sup>46</sup>

L'introduction des vaccins contre les infections invasives à pneumocoque dans les années 1990, a montré une efficacité de plus de 90% chez les enfants de moins de cinq ans.<sup>46</sup> L'utilisation de ce type de vaccins a permis de réduire la consommation d'antibiotique et la prévalence de bactéries résistantes *Streptococcus pneumoniae*.<sup>46</sup>

Plusieurs vaccins sont actuellement en développement afin de parer la résistance aux antimicrobiens, notamment pour lutter contre les infections à *Clostridium difficile* et à *S. aureus*. Actuellement, le SA4Ag (Pfizer®) en essai clinique pour le traitement de *S. aureus* invasif, induit une forte production d'anticorps antibactériens chez l'adulte.<sup>46</sup>

### 1.3.4. Découvertes de nouvelles molécules

La recherche de molécules possédant de nouveaux mécanismes d'actions reste toujours une stratégie envisagée malgré la faible proportion de découverte dans ce domaine depuis quelques dizaines d'années. Récemment, de nombreuses avancées technologiques (métabolomique, screening, modification des génomes...) apportent de nouvelles méthodologies et approches pour l'identification de molécules d'intérêts (Partie 3.3.2 p.62).<sup>47</sup>

### 1.3.5. Phagothérapie

L'utilisation de phages (virus de bactéries) pour traiter les infections bactériennes est une thérapie connue depuis plus d'un siècle, mais est actuellement envisagée dans le cadre de la résistance des bactéries aux antibiotiques.<sup>48</sup> Les phages sont de petites entités composées d'ADN ou d'ARN enfermés dans une capsid. Après leur liaison à la surface de la bactérie, ils attaquent la cellule en injectant leur matériel génétique pour se répliquer et lyser ainsi la cellule bactérienne.

<sup>45</sup> Kim S., Lieberman T. D., *et al.*, Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, p. 14494–14499.

<sup>46</sup> Jansen K. U., Anderson A. S., The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance (AMR). *Hum. Vaccines Immunother.* **2018**, *14*, p. 2142–2149.

<sup>47</sup> Harvey A. L., Edrada-Ebel R., *et al.*, The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, p. 111–129.

<sup>48</sup> Lin D. M., Koskella B., *et al.*, Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **2017**, *8*, p. 162–173.

Des essais cliniques pour leur utilisation en conservation alimentaire, médecine vétérinaire et médecine humaine sont en cours.<sup>48</sup>

Les phages ont l'avantage d'être plus spécifiques que les antibactériens mais le développement d'un cocktail de multiples phages est nécessaire afin de cibler plusieurs espèces, ou même plusieurs souches au sein d'une même espèce.<sup>49</sup>

### 1.3.6. Stratégie contre la virulence des pathogènes microbiens

Chez les bactéries, un facteur de virulence est mis en place dans le but d'améliorer leur pouvoir pathogène. Ainsi, de nombreux facteurs de virulence augmentent les capacités des bactéries à coloniser et d'envahir un hôte ainsi que de contourner son système de défense. Bloquer ces facteurs de virulence est une thérapie permettant de stopper l'effet pathogène d'une bactérie le temps que le système immunitaire réagisse ou que des antibiotiques auxiliaires fassent effet.<sup>49</sup>

La sécrétion de toxine est un des facteurs de virulence bactérienne. Plusieurs agents (inhibiteurs chimiques ou anticorps) ont montré une inhibition de ces toxines entraînant le blocage de l'effet pathogène.<sup>49,50</sup>

La formation de biofilm est également un facteur de virulence et de résistance en permettant aux bactéries pathogènes une adhérence à des matériaux inertes. En effet, la matrice extracellulaire de ces biofilms est constituée de polysaccharides, protéines et ADN extracellulaire qui empêchent les antibactériens de pénétrer les cellules.<sup>51</sup> Des matériaux de différentes compositions ont été étudiés afin d'empêcher cette adhérence, notamment dans le cadre de chirurgie et de transplantation.<sup>49</sup> Des stratégies sont également envisagées afin de cibler les protéines adhésives bactériennes permettant leur adhérence.<sup>49</sup>

Les bactéries formant un biofilm se sont montrées 100 à 1000 fois plus tolérantes aux antimicrobiens que les bactéries ayant un mode de vie planctonique. La formation de biofilm peut également être ciblée en impactant le quorum sensing (QS) des bactéries. Le QS est un système de communication dépendant de la densité bactérienne régi par la production d'autoinducteurs (molécules de signalisation) entraînant la régulation de certains gènes, notamment ceux des facteurs de virulence et de la formation de biofilm.<sup>51</sup> De manière générale, les bactéries à Gram négatif utilisent des *N*-acylhomoserine lactones (AHLs) tandis que les bactéries à Gram positif possèdent des peptides (AIP) comme autoinducteurs de leur QS. Les « autoinducteurs-2 » peuvent être sécrétés à la fois par des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Figure I. 15). Tous ces autoinducteurs sont sécrétés dans des proportions dépendantes de la densité cellulaire. Une fois une certaine concentration d'autoinducteurs sécrétée dans l'environnement (liée alors au nombre de bactéries), leur seuil de détection par les bactéries est alors atteint et des mécanismes de régulation sont initiés, aboutissant à un comportement collectif. Empêcher cette signalisation permet d'impacter la virulence des bactéries et leur capacité à former un biofilm.<sup>51</sup>

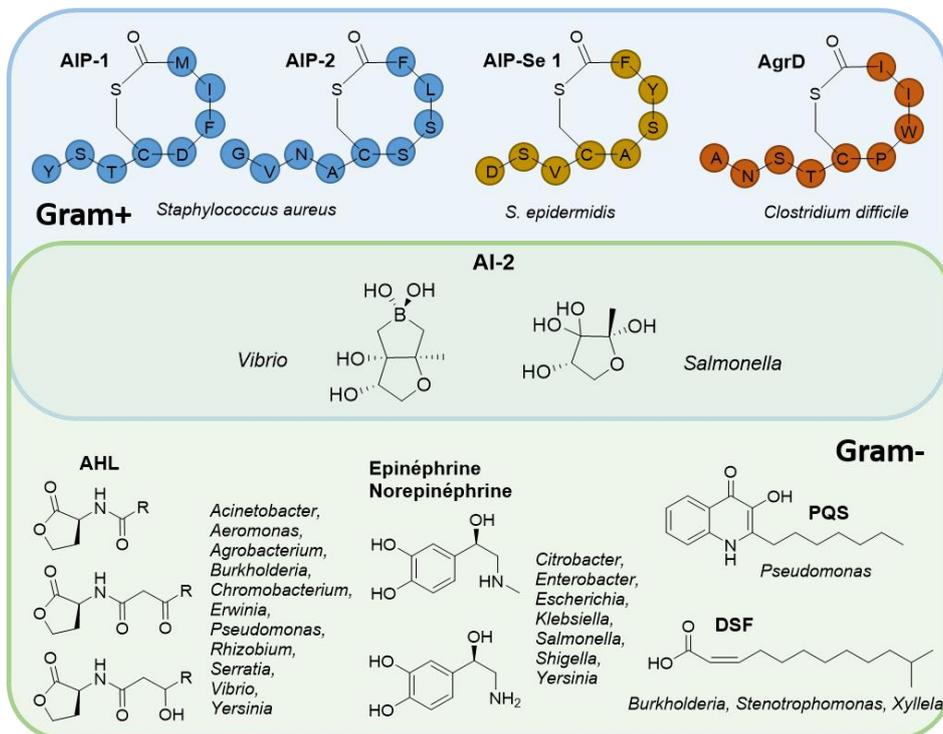
---

<sup>49</sup> Hauser A. R., Meccas J., *et al.*, Beyond antibiotics: new therapeutic approaches for bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63*, p. 89–95.

<sup>50</sup> Rouha H., Badarau A., *et al.*, Five birds, one stone: neutralization of  $\alpha$ -hemolysin and 4 bi-component leukocidins of *Staphylococcus aureus* with a single human monoclonal antibody. *mAbs* **2014**, *7*, p. 243–254.

<sup>51</sup> Rémy B., Mion S., *et al.*, Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, p. 203.

Exemples d'autoinducteurs



Exemples d'agents QQ

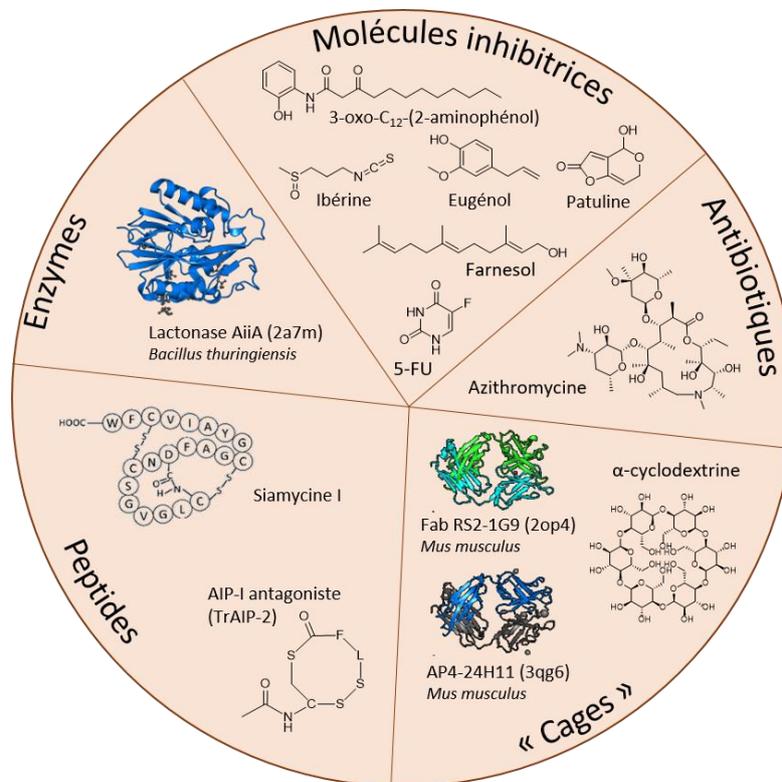


Figure I. 15. Exemples d'autoinducteurs du quorum sensing de bactéries à Gram négatif et à Gram positif et exemples d'agents développés pour inhiber ce QS.

Plusieurs stratégies d'interférence avec le QS des bactéries, nommées quorum quenching (QQ), existent (Figure I. 15) :

- l'utilisation d'enzymes permettant la dégradation des autoinducteurs (lactonases, oxydoréductases, acylases...),
- l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de ces autoinducteurs,
- l'utilisation d'inhibiteurs des interactions entre les autoinducteurs et leurs récepteurs.<sup>49</sup>

Des peptides ont été recensés possédant une activité antagoniste sur le QS de bactéries à Gram positif. Des molécules naturelles possèdent une activité QQ principalement sur les bactéries à Gram négatif : polyphénols, eugénol, patuline... tout comme des molécules synthétiques : 5-fluorouracile (5-FU) et azithromycine. Enfin des macromolécules comme des anticorps ou des cyclodextrines ont montré une capacité à piéger les autoinducteurs, bloquant ainsi la communication bactérienne.<sup>51</sup>

Le QS de la bactérie *S. aureus* est l'un des mieux étudiés, compte tenu de la recherche de nouvelles cibles contre ce pathogène en vue de lutter contre sa résistance aux antibiotiques. Le principal QS de *S. aureus* repose sur le système *agr* qui exprime et régule ses facteurs de virulence dont les mécanismes de résistance aux antibiotiques (régulation positive du système d'efflux).<sup>52</sup> La région chromosomique *agr* code pour deux transcrits : ARN II et ARN III sous le contrôle des promoteurs P2 et P3 respectivement (Figure I. 16). Le segment ARN II est un opéron de quatre gènes, *agrBDCA*, codant pour les principaux composants du QS :

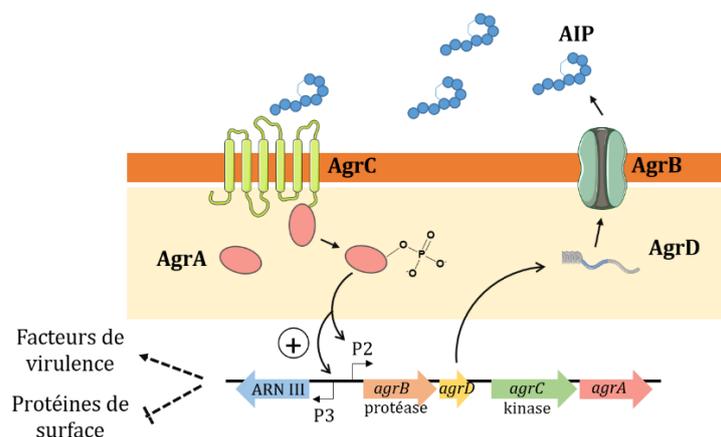
- AgrB, une endopeptidase jouant le double rôle d'enzyme protéolytique et transporteur transmembranaire : elle convertit AgrD en autoinducteur AIP et l'exporte dans le milieu extracellulaire,
- AgrC, une protéine réceptrice transmembranaire, qui reconnaît alors l'AIP (détection et début du QS) et entraîne une phosphorylation de AgrA.

L'ArgA phosphorylée régule positivement le système *agr* en se liant au promoteurs P2 et P3. Le segment ARN III active l'expression de facteur de virulence (protéases, hémolysines, toxine  $\alpha$ ...) et réprime la transcription de gènes codant pour des protéines de surface (protéine A, protéines de liaison à la fibronectine...) qui interviennent dans les processus de colonisation de *S. aureus*.<sup>52,53</sup> La protéine A chez *S. aureus* permet notamment l'inhibition de la phagocytose par le système immunitaire.

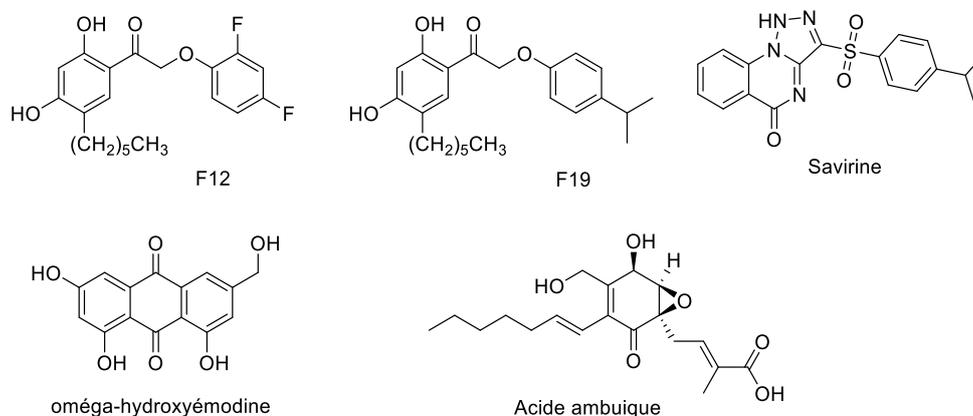
---

<sup>52</sup> Yarwood J. M., Schlievert P. M., Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, p. 1620–1625.

<sup>53</sup> Salam A. M., Quave C. L., Targeting virulence in *Staphylococcus aureus* by chemical inhibition of the accessory gene regulator system in vivo. *mSphere* **2018**, *3*.

Figure I. 16. Représentation schématique du système *agr* de *S. aureus*.

Des molécules quenching de ce système ont déjà été répertoriées (Figure I. 17).<sup>53</sup> Les biarylhydroxycétones (F12 et F19) entraînent une perturbation de l'interaction entre AgrA et P3. La combinaison de ces molécules avec des antibiotiques a montré un effet de synergie et une diminution de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques sur SARM. La savirine a également été décrite comme QQ en inhibant l'activation de P3. Deux molécules isolées de champignons ont été rapportées pour leur activité QQ. L' $\omega$ -hydroxyémidine (OHM) isolé de *Penicillium restrictum* inhibe la fixation de AgrA aux promoteurs. L'acide ambuique, métabolite fongique, semble perturber la biosynthèse des autoinducteurs AIP. Des extraits de plantes (feuilles de *Castanea sativa* et baies de *Schinus terebinthifolia*) ont également montré un effet QQ non bactéricide en diminuant l'expression du système *agr*.<sup>53</sup>

Figure I. 17. Molécules répertoriées pour une activité QQ sur *S. aureus*.

Le quorum quenching semble une perspective prometteuse pour une stratégie antivirulente et peut être employé de manière complémentaire aux agents antimicrobiens. Peu de molécules ont été testées cliniquement pour leur effet QQ. L'effet QQ de l'antibiotique azithromycine n'a été évalué qu'après sa commercialisation en tant que traitement des fibroses kystiques, tout comme l'activité QQ de la 5-fluorouracile (5-FU) utilisée en tant qu'agent antitumoral. Cependant, de nombreux agents QQ ont été intégrés avec succès dans des équipements médicaux comme les cathéters, afin de lutter contre leur contamination. Par exemple, des peptides inhibiteurs du QS *agr* de *S. aureus* ont été ajoutés à des nanofibres polymériques, procurant au matériau une activité

biologique contre *S. aureus* sur trois semaines.<sup>54</sup> A ce jour, peu de choses sont connues sur de potentiels mécanismes de résistance des bactéries à cette stratégie QQ, mais l'expérience de la résistance aux antibiotiques montrent que les agents QQ doivent être choisis et utilisés scrupuleusement.<sup>51</sup>

Le plus grand succès de la santé publique au 20<sup>ème</sup> siècle a été le traitement des infections aboutissant à une diminution de la mortalité due à ces maladies. Les efforts gouvernementaux pour améliorer l'hygiène ont également contribué au concept d'une santé publique collective. L'assainissement des eaux, la gestion des déchets, la sécurité alimentaire, le contrôle des animaux porteurs de maladies et les activités de prévention ont été autant de mesures prises afin d'accompagner l'industrialisation, l'immigration et le développement des villes pouvant favoriser la propagation rapide des maladies infectieuses.<sup>8</sup> Ainsi l'incidence de la tuberculose et de la peste aux États-Unis a fortement diminué entre 1900 et 1940 avant l'introduction des thérapies antibiotiques.<sup>8</sup> Cependant, c'est le développement de ces thérapies qui a le plus participé à cette réussite. Les antibiotiques sont utilisés depuis plus de 80 ans et ont permis de sauver des patients atteints d'infections aux streptocoques, staphylocoques, gonorrhées et syphilis. Cependant, le 20<sup>ème</sup> siècle a vu la montée et la propagation de nouvelles maladies infectieuses comme le SIDA ainsi que des épidémies importantes de grippe. L'apparition de ces nouvelles maladies souligne l'importance d'une prévention continue pour lutter contre leur propagation.

La résistance aux traitements antibiotiques par de nombreux micro-organismes pathogènes renverse actuellement cette avancée thérapeutique. Ainsi, il a été observé la réémergence de la tuberculose (incluant les souches multi-résistantes aux antibiotiques), de même que l'apparition et la dissémination rapide de souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine. Il est nécessaire aujourd'hui de continuer à protéger nos acquis en matière de santé en trouvant de nouvelles stratégies afin d'éviter un retour à l'ère pré-antibiotique.

---

<sup>54</sup> Kratochvil M. J., Yang T., *et al.*, Nonwoven polymer nanofiber coatings that inhibit quorum sensing in *Staphylococcus aureus*: toward new nonbactericidal approaches to infection control. *ACS Infect. Dis.* **2017**, 3, p. 271–280.

## II. Les endophytes, symbiotes ubiquitaires des plantes

Le monde végétal est au cœur d'une chaîne alimentaire dont dépend la vie sur Terre. De nombreuses espèces tirent profit des ressources végétales, comme les insectes herbivores et les micro-organismes. Les végétaux abritent une communauté de micro-organismes commensaux et mutualistes dont les plus connus et étudiés se trouvent au sein de leur système racinaire. Que ce soit dans la phyllosphère (parties aériennes) ou dans la rhizosphère (racines), les interactions plantes/micro-organismes sont nombreuses et diverses. Elles peuvent se produire sans contact direct entre les deux partenaires, comme c'est le cas pour les rhizobactéries, ou bien avec contact direct à la surface ou dans la plante. C'est ce dernier type d'interaction que l'on retrouve lors du développement de mycorhizes ou lors de la colonisation des tissus végétaux par les endophytes.

Le terme « endophyte » est issu des racines grecques « endon » signifiant dedans et « phyton » signifiant plante.<sup>55</sup> Un endophyte est classiquement défini comme un micro-organisme passant au moins une partie de sa vie entre les cellules végétales, sans causer de dommages apparents à son hôte. Il s'est avéré que les endophytes peuvent jouer un rôle crucial sur le développement de la plante qu'ils occupent au travers de symbioses.<sup>56</sup> Les endophytes forment des relations symbiotiques très diverses avec leur plante-hôte, relation commensaliste ou relation bénéfique pour les deux partenaires (mutualiste).<sup>57</sup> De manière générale, la plupart des endophytes isolés sont définis comme commensalistes sans identification claire de leur rôle au sein de la plante. Peu d'études parviennent à identifier l'intérêt écologique d'un endophyte au sein de son hôte, et ces données restent par ailleurs dépendantes des conditions de culture et du type de plante colonisé. En effet, il est apparu que des interactions initialement mutualistes entre les endophytes et leur hôte peuvent se transformer en interactions délétères amenant un endophyte à se comporter comme un phytopathogène, notamment sous la pression de stress abiotiques.<sup>56</sup> Il a également été montré que certains micro-organismes endophytes se montrent bénéfiques sur une plante et pathogènes sur une autre.<sup>56</sup> Récemment, la volonté de comprendre le rôle des endophytes amène des questionnements sur la frontière entre phytopathogène et endophyte, et à une redéfinition du terme. Ainsi Hardoim *et al.* définissent comme endophyte, tout micro-organisme colonisant les tissus végétaux sans distinction du type d'association qu'ils partagent avec la plante.<sup>56</sup>

Cette partie fait un état de l'art non exhaustif sur les endophytes et leur rôle écologique au sein des plantes ainsi que les raisons pour lesquelles la recherche scientifique s'intéresse à leur diversité chimique en terme de santé publique. La distribution des endophytes, leur localisation et leur transmission seront également abordées.

### 2.1. Diversité des micro-organismes endophytes

De nombreuses études débattent de la diversité des micro-organismes endophytes et les estimations sur l'étendue de cette diversité sur Terre varient. Hawksworth estime ainsi que le chiffre conventionnellement établi de 1,5 millions d'espèces endophytiques potentiellement existantes peut être multiplié par cinq selon les données accessibles par les méthodes de séquençage de l'ADN.<sup>58</sup> Les endophytes sont généralement différenciés suivant leurs espèces fongiques ou bactériennes.

---

<sup>55</sup> Kandel S. L., Joubert P. M., *et al.*, Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* **2017**, 5, p. 77–103.

<sup>56</sup> Hardoim P. R., van Overbeek L. S., *et al.*, The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2015**, 79, p. 293–320.

<sup>57</sup> Card S., Johnson L., *et al.*, Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, 92, fiw114.

<sup>58</sup> Hawksworth D. L., The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* **2001**, 105, p. 1422–1432.

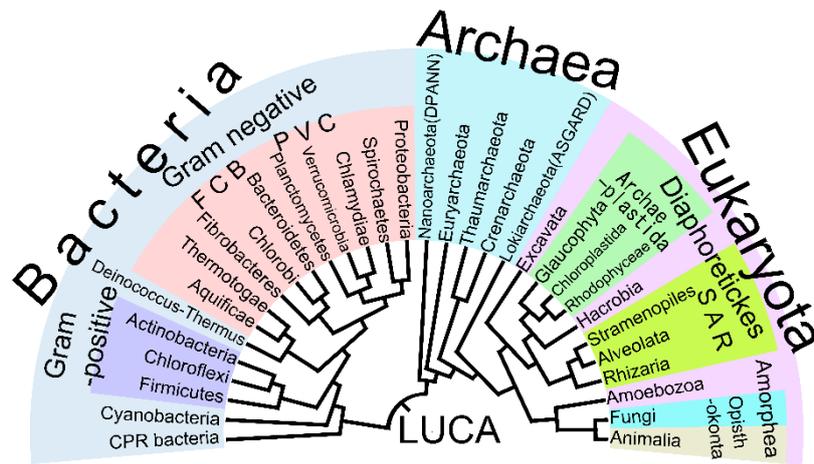


Figure II. 1. Arbre phylogénétique de la vie (adaptation de Hug *et al.* et Adl *et al.*).<sup>59,60</sup>

### 2.1.1. Diversité des endophytes bactériens

Hardoim *et al.* estiment que 96% des endophytes bactériens recensés (sur la base des séquences 16S ARNr >300 paires de bases) se retrouvent dans quatre groupes bactériens : Proteobacteria (54%), Actinobacteria (20%), Firmicutes (16%) et Bacteroidetes (6%).<sup>56</sup> Ces groupes sont les plus fréquemment isolés lors de l'étude d'endophytes bactériens.<sup>61,62</sup>

Parmi le groupe des Proteobacteria, dominant dans la phyllosphère, les gammaprotéobactéries sont les plus représentées mais seulement par quelques genres : *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* et *Serratia*. Il est intéressant de remarquer que des souches de *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas* et *Enterobacter* sont décrites comme phytopathogènes alors que d'autres sont décrites au contraire comme mutualistes de plantes. La plupart des séquences des alphaprotéobactéries sont assignées au genre *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium* et *Shingomonas*. Les genres les plus fréquemment retrouvés au sein des bêtaprotéobactéries sont les genres *Burkholderia*, *Massilia*, *Variovorax* et *Collimonas*.

Parmi les Actinobacteria (bactéries à Gram positif), les genres les plus fréquemment isolés sont *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter* et *Curtobacterium*. Enfin la division des Firmicutes est représentée par les genres *Bacillus*, *Paenibacillus* et *Staphylococcus*.<sup>56</sup>

### 2.1.2. Diversité des endophytes fongiques

D'après l'analyse de 8 439 séquences de gènes provenant de la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information), Hardoim *et al.* ont montré que les endophytes isolés proviennent à 40% de la division Glomeromycota, à 31% de la division Ascomycota et à 20% de la division Basidiomycota.<sup>56</sup> Les séquences d'endophytes non identifiés représentent 8%.

La classe des glomérormycètes renferme des champignons formant des mycorrhizes arbusculaires sur les racines (extension du système racinaire) comme les genres *Glomus* et *Rhizophagus*, écologiquement indispensables pour améliorer l'apport en azote à la plante (Partie 2.4.1.1 p. 43). Parmi les Ascomycota, beaucoup d'endophytes sont identifiés comme appartenant à la classe

<sup>59</sup> Hug L. A., Baker B. J., *et al.*, A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, p. 16048.

<sup>60</sup> Adl S. M., Simpson A. G. B., *et al.*, The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryotic Microbiol.* **2012**, *59*, p. 429–493.

<sup>61</sup> Wemheuer F., Kaiser K., *et al.*, Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.

<sup>62</sup> Vacher C., Hampe A., *et al.*, The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2016**, *47*, p. 1–24.

Dothideomycetes (15%) avec les genres *Phoma* et *Paraconiothyrium* et à la classe Sordariomycetes avec les genres *Balansia*, *Epichloë*, *Nemania*, *Xylaria* et *Colletotrichum*. Cette dernière classe renferme de nombreux phytopathogènes comme par exemple l'espèce *Cryphonectria parasitica* (chancre du châtaignier), et les genres *Fusarium* et *Verticillium*.

Enfin dans la division Basidiomycota, la classe Agaricomycetes est la plus représentée (18%) au côté des classes Atractiellomycetes, Cystobasidiomycetes, Microbotryomycetes et Tremellomycetes.

## 2.2. Localisation des endophytes

Les endophytes sont des micro-organismes ubiquitaires qui ont été retrouvés dans différentes parties du globe, sous différents types de climat : dans les déserts, en Arctique, dans les mangroves, les régions tempérées et tropicales, ainsi que les prairies, savanes et champs de culture.<sup>63</sup> Ils sont communs dans tous les lignages de plantes terrestres, comme les plantes non vasculaires (mousses), les conifères, les herbes, les plantes à fleurs et les fougères.<sup>63</sup>

Il semblerait que les régions tropicales soient des zones géographiques où la densité de colonisation d'endophytes dans les plantes est très importante.<sup>64</sup> Les communautés d'endophytes des hautes latitudes se caractérisent par une faible bigarrure d'espèces tandis que les communautés tropicales présentent une grande diversité.<sup>64</sup> Ainsi cette diversité décroît des tropiques aux forêts boréales les plus au nord.

Plusieurs facteurs impactent la distribution des endophytes au sein des plantes. La localisation géographique est un des facteurs les plus influents.<sup>65</sup> Mais des études ont décrit l'influence de la saisonnalité, des conditions environnementales et aussi du génotype de la plante-hôte colonisée.<sup>66,67</sup> La diversité des endophytes semble exceptionnelle, et des hétérogénéités ont été observées à l'échelle mondiale aussi bien qu'à une échelle géographiquement plus réduite. Ces variations se retrouvent également à l'échelle d'un individu et aux différents organes de cet individu où les mêmes espèces d'endophytes ne sont pas forcément retrouvées. La distribution des endophytes est intrinsèquement liée à leur capacité de transmission et de leur aptitude de colonisation de la plante-hôte.

## 2.3. Transmission et colonisation des endophytes

Les voies de transmission de nombreux endophytes restent à déterminer mais des études ont pu montrer des exemples de transmissions horizontales (transmission par des facteurs environnementaux) ou verticales (transmission d'une plante « parent » à une plante « enfant »).

Les semences de la plante-hôte constituent un des modes de transmission identifiés des endophytes. En effet, en se développant au sein d'un embryon de graine, les endophytes aboutissent à la colonisation du jeune plant une fois cette dernière germée (Figure II. 2).<sup>68</sup> La colonisation des graines permettant cette transmission peut s'effectuer selon trois voies :

---

<sup>63</sup> Arnold A. E., Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* **2007**, *21*, p. 51–66.

<sup>64</sup> Arnold A. E., Lutzoni F., Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* **2007**, *88*, p. 541–549.

<sup>65</sup> Zhang T., Yao Y.-F., Endophytic fungal communities associated with vascular plants in the high arctic zone are highly diverse and host-plant specific. *PLOS ONE* **2015**, *10*, p. e0130051.

<sup>66</sup> Christian N., Sullivan C., *et al.*, Plant host and geographic location drive endophyte community composition in the face of perturbation. *Microb. Ecol.* **2016**, *72*, p. 621–632.

<sup>67</sup> Collado J., Platas G., *et al.*, Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.* **1999**, *144*, p. 525–532.

<sup>68</sup> Shahzad R., Khan A. L., *et al.*, What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, p. 24.

- via les tissus non-vascularisés ou le xylème des plantes,
- via les organes reproducteurs femelles comme le stigmate,
- ou par la contamination exogène des graines à partir de l'environnement.<sup>55</sup>

L'exemple le mieux documenté de transmission verticale au sein de graines est la voie de propagation des espèces fongiques asexués du genre *Epichloë*.<sup>69</sup> Les voies de transmission verticale ont probablement fait l'objet d'une évolution permettant d'aboutir à la transmission de partenaires symbiotiques mutualistes. Ainsi les plantes sont assurées de transmettre un symbiote bénéfique à la génération suivante.<sup>70</sup> Dans le cas de plusieurs symbioses verticalement transmises, le micro-organisme est dans l'incapacité de survivre seul dans l'environnement et a ainsi développé des mécanismes pour assurer sa dissémination.<sup>55</sup> Cependant tous les micro-organismes mutualistes ne sont pas capables d'être transmis verticalement.<sup>71</sup>

Indépendamment d'une transmission verticale, un végétal peut à tout moment être colonisé par les endophytes sur différents organes : les racines, les tiges, les feuilles ou même les fleurs.<sup>70</sup> Cette transmission horizontale s'effectue à travers le sol, l'atmosphère par la dissémination de spores, ou encore *via* des vecteurs tels que les insectes (Figure II. 2). Pour les bactéries endophytes, le sol est l'endroit privilégié pour une transmission horizontale.<sup>66</sup>

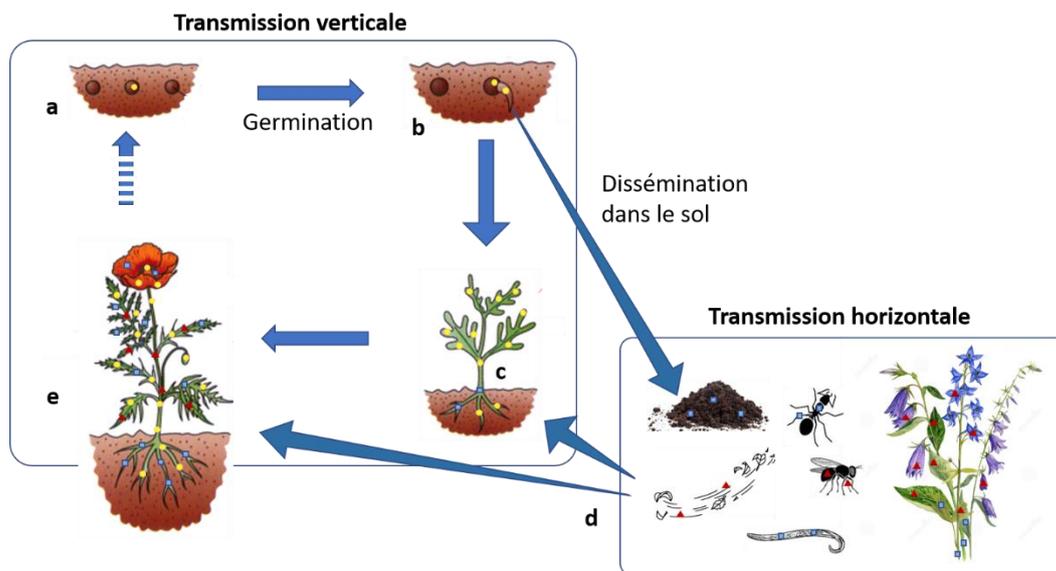


Figure II. 2. Voies de transmission des endophytes chez les plantes à fleurs : a) Graine colonisée par un endophyte provenant d'une plante-mère, b) Germination de la graine et colonisation par l'endophyte de la racine ainsi que dissémination dans la rhizosphère, c et d) Colonisation verticale du jeune plant et colonisation horizontale par différents micro-organismes environnementaux, e) colonisation des organes reproducteurs par des endophytes et dissémination future des graines colonisées.

Il est de l'intérêt de la plante de recruter une grande diversité de micro-organismes endophytes afin de répondre à des changements des conditions environnementales (Partie 2.4 p. 43).<sup>70</sup> Il apparaît que la diversité en endophytes généralistes retrouvés au sein d'une plante varie selon

<sup>69</sup> Philipson M. N., Christey M. C., The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*. *N. Z. J. Bot.* **1986**, 24, p. 125–134.

<sup>70</sup> Frank A. C., Saldierna Guzmán J. P., *et al.*, Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms* **2017**, 5, p. E70.

<sup>71</sup> Herre E. A., Knowlton N., *et al.*, The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol.* **1999**, 14, p. 49–53.

son environnement autant que selon son génotype.<sup>72,73</sup> La sécrétion par la plante d'exsudats dans la rhizosphère lui permet d'attirer des micro-organismes par le biais de ces racines. Ces exsudats contiennent des acides organiques, des acides aminés, des protéines ou encore des composés ayant un effet quorum sensing et permettent une communication entre les bactéries endophytes et la plante afin de diriger le processus de colonisation.<sup>55</sup> Par exemple, il a été rapporté que la souche *Burkholderia phytofirmans* PsJN mutée pour une altération des mécanismes de son quorum sensing ne colonisait plus efficacement *Arabidopsis thaliana*.<sup>74</sup>

La fixation à la surface cellulaire de la plante est la première étape de colonisation des endophytes. Les cellules végétales disposent de récepteurs de reconnaissance à leur surface, afin de détecter des motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs Microbe Associated Molecular Pattern). Ces motifs sont le plus souvent des molécules conservées comme les protéines flagelline, EF-Tu (facteur d'élongation des procaryotes), le peptidoglycane, les lipopolysaccharides (LPS), la chitine, les  $\beta$ -glucanes... Des structures bactériennes comme le flagelle, les fimbriae ou les polysaccharides sont probablement impliquées dans l'ancrage des bactéries endophytes à la surface des plantes.<sup>55</sup> Balsanelli *et al.* rapportent que les lipopolysaccharides bactériens sont nécessaires à l'attachement de l'endophyte *Herbaspirillum seropedicae* par le lien établi entre la partie N-acétylglucosamine et les lectines des racines chez le maïs.<sup>75</sup> Cependant les mécanismes d'attachement des endophytes ont été relativement peu explorés à ce jour.

Après l'attachement, la seconde étape est l'insertion dans les tissus végétaux. L'entrée des endophytes au sein de la plante s'effectue le plus vraisemblablement au niveau des discontinuités naturelles de la plante comme les fissures et les sites d'émergence des racines et tiges.<sup>55</sup> Des bactéries endophytes montrent également une capacité à modifier la paroi cellulaire de la plante par la sécrétion d'enzymes cellulolytiques (cellulases, xylanases, pectinases, endoglucanases...) permettant de faciliter leur entrée.<sup>76</sup>

Afin de coloniser la plante, les endophytes s'établissent dans les espaces intercellulaires, où les sucres, acides aminés et minéraux sont abondants.<sup>55</sup> Des endophytes ont été retrouvés dans tous les organes de végétaux. Cette colonisation peut s'établir de manière spécialisée au niveau d'un organe voire d'un tissu ou alors se retrouver sur la plante entière. Les bactéries endophytes se déplacent au sein de la plante par le système vasculaire du xylème, ce qui leur permet également d'atteindre les organes reproducteurs de la plante et d'assurer une transmission verticale.<sup>56,70</sup> Des exemples de colonisation intracellulaire d'endophytes bactériens ont également été rapportés.<sup>55</sup>

La tolérance des plantes pour cette colonisation, ainsi que les mécanismes évolutivement aboutis pour développer ces symbioses indiquent un bénéfice mutuel des interactions plantes/endophytes. Plusieurs rôles des endophytes dans les écosystèmes ont pu être identifiés et décrits.

---

<sup>72</sup> Peiffer J. A., Spor A., *et al.*, Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS* **2013**, *110*, p. 6548–6553.

<sup>73</sup> Edwards J., Johnson C., *et al.*, Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *PNAS* **2015**, *112*, p. E911–E920.

<sup>74</sup> Zúñiga A., Poupin M. J., *et al.*, Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2013**, *26*, p. 546–553.

<sup>75</sup> Balsanelli E., Tuleski T. R., *et al.*, Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. *PLOS ONE* **2013**, *8*, p. e77001.

<sup>76</sup> Reinhold-Hurek B., Maes T., *et al.*, An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2006**, *19*, p. 181–188.

## 2.4. Rôle dans les systèmes végétaux

Il est à noter que les rôles décrits des endophytes ne sont pas inhérents à toutes les souches et qu'une même souche n'aura pas les mêmes fonctions suivant la plante colonisée ou les conditions environnementales.<sup>56</sup> Les deux fonctions des endophytes les plus couramment décrites sont la stimulation de la croissance et du développement de leur plante-hôte ainsi que la protection de cette dernière face à des stress environnementaux.

### 2.4.1. Stimulation de la croissance de la plante-hôte

L'apport en nutriments (azote, phosphore...) impacte le développement d'une plante comme l'atteste l'épandage des nombreux fertilisants dans les cultures maraîchères. Il s'avère que certains endophytes ont montré une capacité à faciliter cet apport au sein des plantes.

#### 2.4.1.1. Apport en azote

La fixation de l'azote par les micro-organismes est un mécanisme bien étudié au sein de la rhizosphère. Cette fixation permet un apport pour la plante et participe ainsi à son développement.<sup>56</sup>

De nombreux endophytes bactériens ont montré une capacité à fixer l'azote, comme les genres *Azoarcus*<sup>77</sup>, *Azotobacter*<sup>78</sup>, *Clostridium*<sup>79</sup> ou *Rhizobium*<sup>80</sup>. Ces bactéries possèdent toutes le gène conservé *nifH* codant pour la protéine nitrogénase permettant la réduction enzymatique du N<sub>2</sub> en ammoniac NH<sub>3</sub>. L'ammoniac peut ensuite être oxydé sous forme de nitrate suivant le processus biologique de nitrification conduit par des bactéries. Cette minéralisation rend l'azote assimilable pour la plante.<sup>81</sup> Également, la bactérie endophytique *Gluconacetobacter diazotrophicus*, retrouvée en symbiose avec différent type de plantes, montre un fort taux de fixation de l'azote.<sup>82</sup>

#### 2.4.1.2. Autres apports nutritifs

Le phosphore est un autre nutriment essentiel au fonctionnement des végétaux car il joue un rôle crucial dans de nombreuses réactions enzymatiques. De la même façon que pour l'azote, le phosphore ne peut pas être directement assimilé par la plante car il forme dans le sol de nombreux complexes : dicalcium, tricalcium phosphate ou hydroxyapatite. La solubilisation du phosphore en phosphate peut être réalisée entre autres par les bactéries endophytes lors de la sécrétion de phosphatases, le rendant ainsi assimilable par la plante.<sup>83,84</sup> Ainsi, dans des conditions de sol où le phosphore est sous forme hydroxyapatite Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, il a été montré que l'endophyte *Colletotrichum tofieldiae* contribue au développement de la plante-hôte par solubilisation du phosphore.<sup>85</sup>

<sup>77</sup> Hurek T., Reinhold-Hurek B., *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, p. 169–178.

<sup>78</sup> Banik A., Dash G. K., *et al.*, Application of rice (*Oryza sativa* L.) root endophytic diazotrophic *Azotobacter* sp. strain Avi2 (MCC 3432) can increase rice yield under green house and field condition. *Microbiol. Res.* **2019**, *219*, p. 56–65.

<sup>79</sup> Miyamoto T., Kawahara M., *et al.*, Novel endophytic nitrogen-fixing *Clostridia* from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, p. 6580–6586.

<sup>80</sup> Chi F., Shen S.-H., *et al.*, Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, p. 7271–7278.

<sup>81</sup> Yang B., Wang X.-M., *et al.*, Fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* affects nitrogen transformation processes and related microorganisms in the rice rhizosphere. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, p. 982.

<sup>82</sup> Eskin N., Vessey K., *et al.*, Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. *Int. j. Agron.* **2014**, p. 1–13.

<sup>83</sup> Otieno N., Lally R. D., *et al.*, Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, p. 745.

<sup>84</sup> Matos A. D. M., Gomes I. C. P., *et al.*, Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2017**, *89*, p. 2945–2954.

<sup>85</sup> Hiruma K., Gerlach N., *et al.*, Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell* **2016**, *165*, p. 464–474.

Le fer existe dans le sol majoritairement sous la forme d'oxide ferrique insoluble. L'assimilation de ce fer par les végétaux est améliorée lors de la production microbienne d'agents chélatants appelés sidérophores. Ces sidérophores présentent une grande affinité avec les ions  $Fe^{3+}$  et  $Fe^{2+}$ . L'absorption du fer par la plante se fait par des voies de dégradations de ces complexes Fe-sidérophores.<sup>86</sup> Les sidérophores sont également impliqués dans la protection de la plante contre des stress abiotiques : de manière générale, la complexation microbienne des métaux intervient également lors de processus de phytoremédiation des sols (Partie 2.4.2.2 p.50).

### 2.4.1.3. Production en phytohormones

Les phytohormones sont des régulateurs de croissance au sein des plantes. Ces substances chimiques régulent la croissance des plantes et peuvent être impliquées dans la communication entre les individus.<sup>87</sup> Leur détection par la plante impacte son fonctionnement. Plusieurs classes de phytohormones ont été recensées : parmi les plus étudiées, on retrouve les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, et des molécules telles que l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique et l'éthylène (Figure II. 3).<sup>87</sup>

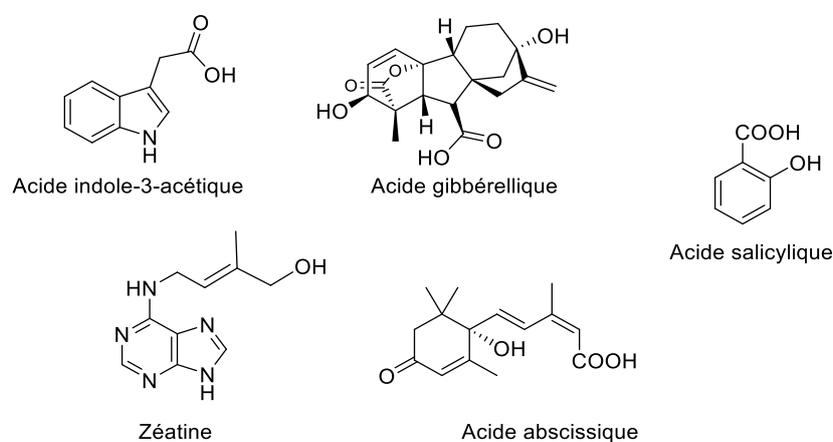


Figure II. 3. Phytohormones communément impliquées dans la régulation physiologique de la plante.

Les auxines sont des phytohormones importantes pour le développement de la plante. De nombreuses études portent sur le rôle de l'auxine acide indole-3-acétique (IAA) et ont montré qu'elle contribue à la division cellulaire, l'élongation des tissus végétaux et la différenciation des cellules.<sup>88</sup> Leur présence inhibe l'abscission, c'est-à-dire la chute de feuilles et des fruits.<sup>89</sup> Les gibbérellines, quant à elles, participent à la croissance des tiges et des fruits et ont une influence sur la dormance du végétal.<sup>90</sup> Lorsque la plante sort de sa phase de repos, les gibbérellines sont impliquées dans l'initiation de la floraison et du débourrement de bourgeons. Les cytokinines, associées à la présence d'auxines, sont impliquées dans le maintien de la prolifération et la division cellulaire. Elles activent également la production de chlorophylle.<sup>91</sup> L'acide abscissique, à

<sup>86</sup> Ma Y., Rajkumar M., *et al.*, Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Environ. Manage.* **2016**, *174*, p. 14–25.

<sup>87</sup> Egamberdieva D., Wirth S. J., *et al.*, Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, p. 2104.

<sup>88</sup> Campanoni P., Nick P., Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol.* **2005**, *137*, p. 939–948.

<sup>89</sup> Estornell L. H., Agustí J., *et al.*, Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Sci.* **2013**, *199–200*, p. 48–60.

<sup>90</sup> Achard P., Genschik P., Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, p. 1085–1092.

<sup>91</sup> Dobránszki J., Mandler-Drienyovszki N., Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *J. Plant Physiol.* **2014**, *171*, p. 1472–1478.

l'inverse des gibbérellines, est impliqué dans l'abscission des feuilles et la dormance des bourgeons.<sup>92</sup>

Cette production en hormone végétale est endogène mais il s'est avéré que les endophytes peuvent contribuer à cette production et ainsi stimuler les mécanismes de croissance végétale. L'inoculation de *Penicillium citrinum* LWL4 et d'*Aspergillus terreus* LWL5, deux endophytes producteurs de gibbérellines, dans les racines de tournesol (*Helianthus annuus* L.) améliore le rendement de biomasse de la plante par comparaison à des plants sans ces endophytes.<sup>93</sup> Dans une étude, la délétion du gène de biosynthèse de la cytokinine au sein de l'endophyte *Piriformospora indica* montre que celui-ci est nécessaire à la croissance de sa plante-hôte.<sup>94</sup> La production en phytohormones par de nombreux endophytes permet le développement de la plante mais l'aide aussi à supporter différents stress (Partie 2.4.2.2 p.50).

L'éthylène est une phytohormone « multifonction ». Suivant sa concentration ou son temps d'application, elle peut soit promouvoir soit inhiber différents mécanismes de croissance et de sénescence d'une plante.<sup>95</sup> Des endophytes bactériens se sont montrés capables de produire l'enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, impliquée dans la réduction des signaux de l'éthylène. En effet, l'ACC deaminase clive le précurseur de l'éthylène ; ACC en ammoniac et 2-oxobutanoate.<sup>95</sup> L'inactivation du gène codant pour cette enzyme au sein de *Burkholderia phytofirmans* entraîne une perte de capacité de l'endophyte à promouvoir l'allongement des racines de *Brassica* sp.<sup>96</sup> Il a été montré que des bactéries du genre *Pseudomonas* contenant l'enzyme ACC deaminase retardent la sénescence des fleurs de leur hôte.<sup>97</sup>

Certaines molécules, sans être qualifiées de phytohormones, déclenchent également des mécanismes additionnels impliqués dans la croissance de la plante. C'est le cas des polyamines, comme la cadavérine : Cassan *et al.* montrent que la production de cadavérine par l'endophyte *Azospirillum brasilense* Az39 contribue à la croissance racinaire du riz (*Oryza sativa* L.).<sup>98</sup>

## 2.4.2. Protection de la plante contre les stress

Les micro-organismes endophytes montrent la production de métabolites secondaires diversifiés : alcaloïdes, peptides, stéroïdes, flavonoïdes, terpénoïdes, quinones, composés chlorés et beaucoup d'autres classes chimiques.<sup>6</sup> Ces métabolites confèrent aux endophytes une capacité de défense face aux agressions mais leur permettent également de protéger la plante-hôte devant des stress biotiques et abiotiques.

### 2.4.2.1. Stress biotiques

Les végétaux sont particulièrement vulnérables aux prédateurs étant donné leur immobilité. Pour assurer leur survie, ils peuvent entre autres employer des moyens de défenses chimiques. Certains endophytes participent à cette défense chimique contre des micro-organismes

<sup>92</sup> Tuan P. A., Kumar R., *et al.*, Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, p. 668.

<sup>93</sup> Waqas M., Khan A. L., *et al.*, Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *J. Plant Interact.* **2015**, *10*, p. 280–287.

<sup>94</sup> Vadassery J., Ritter C., *et al.*, The Role of Auxins and Cytokinins in the Mutualistic Interaction Between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *MPMI* **2008**, *21*, p. 1371–1383.

<sup>95</sup> Iqbal N., Khan N. A., *et al.*, Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, p. 475–494.

<sup>96</sup> Glick B. R., Todorovic B., *et al.*, Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2007**, *26*, p. 227–242.

<sup>97</sup> Ali S., Charles T. C., *et al.*, Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, p. 1139–1144.

<sup>98</sup> Cassán F., Maiale S., *et al.*, Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur. J. Soil Biol.* **2009**, *45*, p. 12–19.

phytopathogènes ou des prédateurs herbivores. Quelques exemples de métabolites produits par des endophytes et pouvant avoir un rôle de protection de la plante sont détaillés ci-dessous.

#### 2.4.2.1.1. Protection contre les phytopathogènes

De par leurs mécanismes de défense et de compétition, de nombreux endophytes possèdent une activité antagoniste contre des phytopathogènes pouvant agresser les plantes-hôtes. Tout d'abord, l'occupation physique des tissus végétaux par les endophytes empêche les phytopathogènes de facilement s'intégrer dans ces niches. La production en métabolites secondaires permet également de lutter contre une agression microbienne. L'activité antimicrobienne d'une souche endophyte est classiquement identifiée après son isolement puis mise en compétition contre divers phytopathogènes. Par surcroît, l'activité des endophytes peut être mesurée par réalisation d'extraits qui sont ensuite testés contre les phytopathogènes (dilutions successives en plaques 96 puits, bioautographie ou encore diffusion par gélose).<sup>99,100</sup>

La cryptocine (Figure II. 4) isolée à partir du champignon endophyte *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* est un alcaloïde contenant un acide tétramique. Cette molécule possède une activité entre autres contre la maladie fongique du riz causé par *Pyricularia oryzae*.<sup>101</sup> L'épichlicine, peptide cyclique (Figure II. 4) a été isolé de *Epichloë typhina*, endophyte de la plante herbacée *Phleum pratense* et a montré une activité inhibitrice contre le phytopathogène *Cladosporium phlei* avec une  $CI_{50}$  mesurée à 22 nM.<sup>102</sup> Des dérivés d'ergostérol, comme le 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihydroxy-6 $\beta$ -acétoxy-ergosta-7,22-diène (Figure II. 4) isolé de l'endophyte *Colletotrichum* sp. retrouvé à partir d'*Artemisia annua*, montrent une activité fongistatique contre plusieurs phytopathogènes de plantes de cultures.<sup>103</sup> Le champignon endophyte *Edenia gomezpompae* produit plusieurs dérivés de naphthoquinone nommés preussomerines (Figure II. 4) possédant des activités antifongiques contre les quatre phytopathogènes suivants : *Phytophthora capsici*, *P. parasitica*, *Fusarium oxysporum* et *Alternaria solani*.<sup>104</sup> Trois pestalachlorides (Figure II. 4) ont été isolés de l'endophyte *Pestalotiopsis adusta*. La pestalachloride B possède une activité antifongique avec des CMIs de 49,0 et 12,2  $\mu$ M sur les phytopathogènes *Fusarium culmorum*, *Gibberella zeae* et *Verticillium albo-atrum*.<sup>105</sup>

<sup>99</sup> Silva-Hughes A. F., Wedge D. E., et al., Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiol. Res.* **2015**, 175, p. 67–77.

<sup>100</sup> Shentu X., Zhan X., et al., Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, 45, p. 248–254.

<sup>101</sup> Li J. Y., Strobel G., et al., Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Org. Lett.* **2000**, 2, p. 767–770.

<sup>102</sup> Seto Y., Takahashi K., et al., Novel cyclic peptide, epichlicin, from the endophytic fungus, *Epichloë typhina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, 71, p. 1470–1475.

<sup>103</sup> Lu H., Zou W. X., et al., New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci.* **2000**, 151, p. 67–73.

<sup>104</sup> Macías-Rubalcava M. L., Hernández-Bautista B. E., et al., Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* **2008**, 69, p. 1185–1196.

<sup>105</sup> Li E., Jiang L., et al., Pestalachlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, p. 7894–7899.

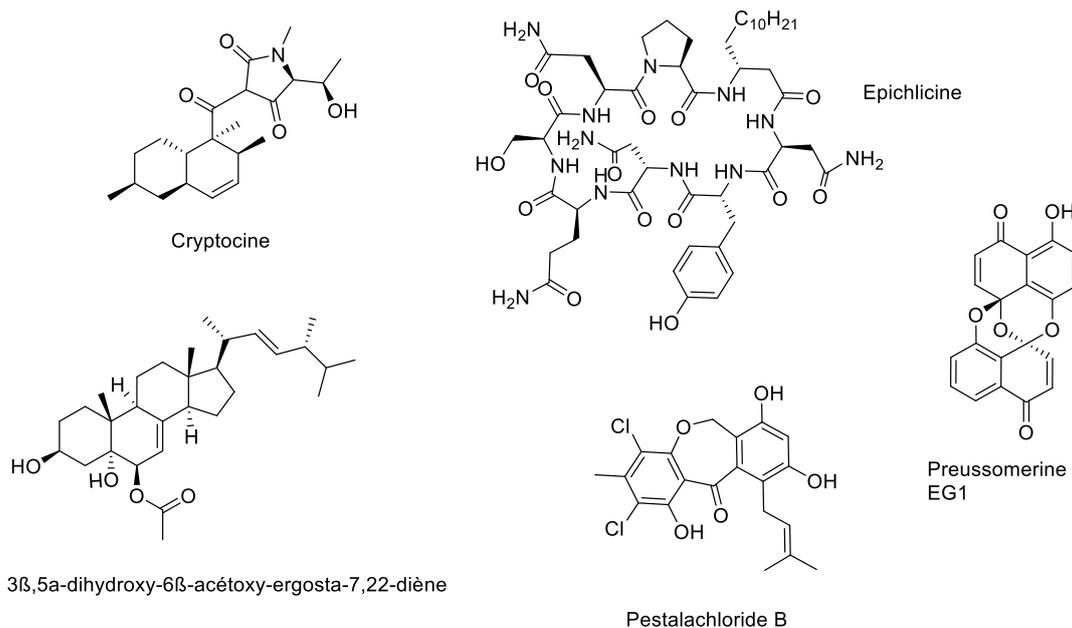


Figure II. 4. Métabolites secondaires produits par des endophytes possédant une activité contre divers phytopathogènes.

Les bactéries endophytes du groupe des Actinobacteria sont les plus étudiées pour leur production de métabolites antimicrobiens (Partie 1.1 p.18). En effet, de nombreux composés bioactifs ont été isolés à partir de ces souches. Castillo *et al.* ont isolé quatre nouveaux composés antimicrobiens nommés munumbicines A, B, C et D à partir de *Streptomyces* NRRL 30562, endophyte du bois de la vigne serpent tigre *Kennedia nigricans*.<sup>106</sup> Il s'est avéré plus tard que les munumbicines A et B soient identiques aux actinomycines X2 et D.<sup>107</sup> Ces peptides ont montré une activité à des concentrations de l'ordre du µg/mL contre de nombreux phytopathogènes.<sup>106</sup> D'autres peptides nommés coronamycines ont été isolés de *Streptomyces* sp. MSU 2110 provenant de l'hôte *Monstera* sp. et ont montré des activités contre le phytopathogène *Pythium ultimum*, genre fongique provoquant la fonte des semis dans les serres et les pépinières.<sup>108</sup>

Plusieurs micro-organismes endophytes produisent un mélange de composés organiques volatils (COV) possédant une activité antimicrobienne. Les COVs sont des composés carbonés de faible poids moléculaire pouvant appartenir à différentes classes chimiques comme des aldéhydes, cétones, alcools, terpénoïdes (ocimène, terpénoline), hydrocarbures aromatiques (naphtalène, azulène) et thioester (Figure II. 5).<sup>109,110</sup> Les COVs d'un micro-organisme sont extraits par solvants ou sur phase solide à partir de l'espace de tête du micro-organisme.<sup>111,112</sup> L'identification des COVs

<sup>106</sup> Castillo U. F., Strobel G. A., *et al.*, Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology* **2002**, *148*, p. 2675–2685.

<sup>107</sup> Castillo U. F., Strobel G. A., *et al.*, Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *255*, p. 296–300.

<sup>108</sup> Ezra D., Castillo U. F., *et al.*, Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* **2004**, *150*, p. 785–793.

<sup>109</sup> Ezra D., Hess W. M., *et al.*, New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology* **2004**, *150*, p. 4023–4031.

<sup>110</sup> Lemfack M. C., Gohlke B.-O., *et al.*, mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, p. D1261–D1265.

<sup>111</sup> Sheoran N., Valiya Nadakkakath A., *et al.*, Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemoprofiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiol. Res.* **2015**, *173*, p. 66–78.

<sup>112</sup> Wang Y., Li Y., *et al.*, Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *78*, p. 1–16.

se fait ensuite par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS).

Le genre fongique *Muscodor* est un des plus connu pour la production de COVs. A ce jour, une vingtaine d'espèces ont été recensés.<sup>113</sup> Il semblerait que la signature chimique volatile des *Muscodor* varie suivant l'espèce. Il a été montré que le site géographique où ces champignons ont été isolés joue sur leur composition en COVs : les isolats provenant d'Inde produisent tous le marqueur 4-octadecylmorpholine (Figure II. 5) qui n'est pas retrouvé chez les isolats provenant d'autres régions.<sup>114,115,116</sup> Ces mélanges de COVs ont montré des activités contre de nombreux phytopathogènes du genre *Rhizopus*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Colletotrichum* et *Penicillium* et aussi contre le nématode *Meloidogyne incognita* qui provoque la déformation des cellules racinaires des tomates.<sup>117,118</sup> Des espèces du genre *Hypoxyylon*<sup>119</sup>, *Diaporthe*<sup>120</sup> ou *Phomopsis*<sup>121</sup> ont également montré une capacité à produire des COVs antimicrobiens. La bactérie endophytique racinaire *Pseudomonas putida* BP25 s'est révélée, quant à elle, produire un mélange actif contre différents phytopathogènes, composé de dérivés de pyrazine (Figure II. 5) et de dérivés aromatiques comme l'heptaméthyl-1-nonène, dodécane,  $\beta$ -naphthol, et l'éthylhexanone.<sup>111</sup>

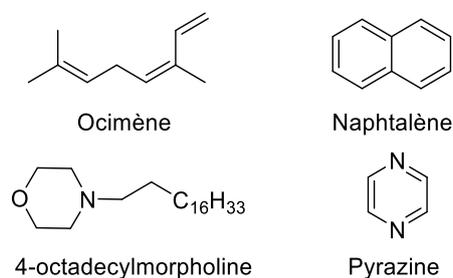


Figure II. 5. Composés organiques volatils (COVs) produits par des endophytes possédant une activité contre divers phytopathogènes.

#### 2.4.2.1.2. Herbivores

La présence des endophytes au sein d'une plante-hôte peut également améliorer sa protection contre des ravageurs de culture. De nombreux endophytes associés à des herbes fourragères ont la capacité de synthétiser des alcaloïdes de type amide ou pyrrolizidine.<sup>122</sup> Ces composés ont soit des propriétés toxiques soit un goût désagréable, leur conférant un effet protecteur face aux attaques d'insectes ou de mammifères herbivores. Les alcaloïdes de type indole diterpène comme le lolitrème B et la péramine (Figure II. 6) ont une activité toxique sur les insectes et neurotoxiques

<sup>113</sup> 'Muscodor', consulté sur <http://www.mycobank.org>, 2018.

<sup>114</sup> Meshram V., Kapoor N., et al., *Muscodor kashayum* sp. nov. - a new volatile anti-microbial producing endophytic fungus. *Mycology* 2013, 4, p. 196-204.

<sup>115</sup> Meshram V., Saxena S., et al., *Muscodor strobilii*, a new endophytic species from South India. *Mycotaxon* 2014, 128, p. 93-104.

<sup>116</sup> Saxena S., Meshram V., et al., *Muscodor tigerii* sp. nov.-volatile antibiotic producing endophytic fungus from the northeastern Himalayas. *Ann. Microbiol.* 2015, 65, p. 47-57.

<sup>117</sup> Mercier J., Jiménez J. I., Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biol. Technol.* 2004, 31, p. 1-8.

<sup>118</sup> Grimme E., Zidack N. K., et al., Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. *Plant Dis.* 2007, 91, p. 220-225.

<sup>119</sup> Ulloa-Benítez Á., Medina-Romero Y. M., et al., Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxyylon anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *J. Appl. Microbiol.* 2016, 121, p. 380-400.

<sup>120</sup> Yan D.-H., Song X., et al., Antifungal activities of volatile secondary metabolites of four diaporthe strains isolated from *Catharanthus roseus*. *J. Fungi* 2018, 4, p. 65.

<sup>121</sup> Singh S. K., Strobel G. A., et al., An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microb. Ecol.* 2011, 61, p. 729-739.

<sup>122</sup> Siegel M. R., Latch G. C., et al., Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.* 1990, 16, p. 3301-3315.

sur les mammifères qui les ingèrent.<sup>123</sup> Les champignons des genres *Epichloë* et *Neotyphodium* qui les produisent vivent en symbiose avec les graminées fourragères. De nombreux cas d'intoxications du bétail ont été recensés dus à la présence de ce champignon dans les prairies.

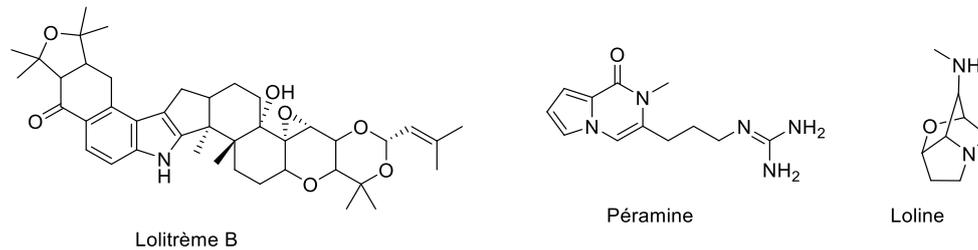


Figure II. 6. Métabolites secondaires produits par des endophytes possédant une activité toxiques sur les herbivores ou les insectes ravageurs.

Le champignon *Claviceps purpurea*, plus couramment appelé ergot, protège sa plante-hôte des herbivores par la production d'alcaloïdes ergoline comme l'acide lysergique. Pour autant, *Claviceps purpurea* est connu comme phytopathogène du seigle montrant ainsi des interactions plantes/endophytes mutualistes ou parasites suivant la plante colonisée.<sup>124</sup> De même, les COVs produits par les endophytes peuvent également avoir un effet repoussant sur les insectes, comme le naphthalène produit par les espèces du genre *Muscodor*.<sup>125</sup>

Depuis quelques années, il a été admis que les micro-organismes connus comme entomopathogènes peuvent, sous certaines conditions, coloniser sans symptômes les tissus végétaux et par conséquent être considérés comme des endophytes. Des micro-organismes comme *Beauveria bassiana*, *Metarhizium* sp. ou encore *Lecanicillium lecanii* ont été isolés en tant qu'endophytes dans plusieurs études.<sup>126</sup> Il s'est avéré qu'en présence de l'« endophyte » *B. bassiana*, les plants de maïs induisent une plus grande mortalité de leur principal ravageur, les larves d'*Ostrinia nubilalis* qui s'en sont nourrit.<sup>127</sup>

La colonisation des plantes par les endophytes peut leur provoquer des changements structuraux et augmenter leur protection face aux ravageurs. En effet, des études comparatives ont montré que les plantes contenant des endophytes avaient une concentration plus grande en cellulose formant ainsi des feuilles plus robustes donc plus difficiles à consommer pour les fourmis coupe-feuilles.<sup>128,129</sup>

Le second principal bénéfice à la présence d'endophytes au sein des plantes est l'augmentation de la résistance aux stress abiotiques.

<sup>123</sup> Gallagher R. T., Hawkes A. D., *et al.*, Tremorgenic neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorder of livestock: structure elucidation of Lolitrem B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 9, p. 614–616.

<sup>124</sup> Wäli P. P., Wäli P. R., *et al.*, Is the pathogenic ergot fungus a conditional defensive mutualist for its host grass? *PLoS ONE* **2013**, 8, p. e69249.

<sup>125</sup> Daisy B. H., Strobel G. A., *et al.*, Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **2002**, 148, p. 3737–3741.

<sup>126</sup> Vidal S. L. B., Jaber L. R., Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Curr. Sci.* **2015**, 109, p. 46–54.

<sup>127</sup> Bing L. A., Lewis L. C., Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Sci. Tech.* **1992**, 2, p. 39–47.

<sup>128</sup> Bael S. a. V., Seid M. A., *et al.*, Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecological Entomology* **2012**, 37, p. 318–321.

<sup>129</sup> Estrada C., Wcislo W. T., *et al.*, Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytol.* **2013**, 198, p. 241–251.

#### 2.4.2.2. Stress abiotiques

La sécheresse, les inondations, la salinité et la présence de métaux lourds sont des stress abiotiques majeurs auxquels est soumise une plante. Ces stress impactent son développement et sa physiologie en altérant la régulation génétique de voies cellulaires.<sup>87</sup> Des procédés biochimiques sont impactés et l'absorption de l'eau par la plante peut être réduite. La contamination des sols par les métaux lourds comme le cadmium, le plomb ou le mercure du fait des activités humaines est une préoccupation grandissante. Ces métaux sont toxiques pour les végétaux, altèrent l'activité enzymatique, l'absorption de nutriments et causent un retard de croissance voire leur nécrose.<sup>87</sup>

Au-delà d'être un outil intervenant dans la régulation des procédés de développement des plantes, les phytohormones comme l'acide abscissique, l'acide salicylique et l'acide jasmonique jouent un rôle critique dans la tolérance des plantes aux stress abiotiques.<sup>87</sup> Xlong *et al.* rapportent que l'inhibition de la biosynthèse des gibbérellines et l'augmentation du taux d'acide abscissique améliorent la résistance de la plante à la sécheresse.<sup>130</sup> Le niveau de production de l'acide abscissique engendre notamment la fermeture des stomates régulant ainsi la pression osmotique de la plante.<sup>131</sup> Il s'est avéré que le champignon endophyte *Phoma glomerata* ainsi que la bactérie *Penicillium* sp. LWL3 régulent les niveaux de phytohormones au sein de plants de concombre lors d'un stress salin ou de sécheresse.<sup>132</sup> Cette association symbiotique permet une tolérance de la plante face aux stress en réduisant les activités oxydatives de peroxydases et polyphénol oxydases.

Des études ont montré que la présence de bactéries contenant l'ACC deaminase augmente la résistance de la plante à des stress comme une crue, une haute salinité, une sécheresse ou encore la contamination du sol.<sup>56</sup> Ces stress occasionnent normalement une diminution de la croissance végétale et le début de la sénescence dû au taux d'éthylène produits.<sup>56</sup> La baisse des taux d'éthylène par l'ACC deaminase des endophytes protège ainsi la plante. Il a été reporté que des bactéries endophytes du genre *Pseudomonas* contenant une ACC-deaminase améliorent la résistance de la plante face à un sol possédant un fort niveau de sel.<sup>133</sup> De la même façon, une bactérie du genre *Achronobacter* endophyte de *Catharanthus roseus*, engendre une diminution de 11 à 23% du niveau d'éthylène dans la plante, lui permettant une tolérance de la salinité, ainsi qu'une augmentation du niveau d'enzymes antioxydantes.<sup>134</sup>

La présence d'endophytes permet également une résilience des plantes face à des conditions climatiques extrêmes. Par exemple, lors d'un stress occasionné par une sécheresse, la présence de *Burkholderia phytofirmans* PsJN permet une augmentation du taux de photosynthèse, de l'assimilation du CO<sub>2</sub> et du taux de chlorophylle par la plante inoculée.<sup>135</sup> Comme vu précédemment, le soutien qu'apporte les endophytes à l'absorption de nutriments par les végétaux peut leur permettre de se développer sur des terrains déficients en azote ou phosphore.<sup>85</sup>

<sup>130</sup> Xiong L., Schumaker K. S., *et al.*, Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **2002**, *14*, p. S165–S183.

<sup>131</sup> Munemasa S., Hauser F., *et al.*, Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *28*, p. 154–162.

<sup>132</sup> Waqas M., Khan A. L., *et al.*, Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* **2012**, *17*, p. 10754–10773.

<sup>133</sup> Ali S., Charles T. C., *et al.*, Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *80*, p. 160–167.

<sup>134</sup> Karthikeyan B., Joe M. M., *et al.*, ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis* **2012**, *56*, p. 77–86.

<sup>135</sup> Naveed M., Hussain M. B., *et al.*, Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regul.* **2014**, *73*, p. 121–131.

L'accumulation de métaux et la présence de contaminants organiques dans les sols engendrent une phytotoxicité de plus en plus importante avec le développement des activités anthropogéniques. Des endophytes bactériens peuvent protéger la plante de cet effet par précipitation extracellulaire, accumulation intracellulaire, séquestration ou biotransformation des ions métalliques toxiques.<sup>136</sup> Yamaji *et al.* ont montré que l'arbre *Clethra barbinervis* tolère de forte concentration de métaux lourds (cuivre, zinc et plomb) dans son sol grâce à la colonisation de ces racines par des endophytes comme *Phialocephala fortinii*, *Rhizoderma veluwensis* ou encore *Rhizoscyphus* sp.<sup>136</sup> Ces endophytes améliorent la croissance de l'arbre, l'absorption de nutriment et réduisent la concentration en métaux au sein de ses racines. De même, l'inoculation des bactéries *Methylobacterium orizae* et *Burkholderia* sp. réduit la toxicité et l'accumulation du nickel et du cadmium au sein de plants de tomates.<sup>137</sup>

Des protéobactéries ont montré une capacité à protéger les plantes des effets des herbicides en possédant des gènes de résistances ou de métabolisation.<sup>138</sup> Ainsi Germain *et al.* ont montré que l'inoculation d'un endophyte du genre *Pseudomonas*, évite l'accumulation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (molécule active contre les adventices dicotylédones) au sein des tissus de la plante.<sup>139</sup>

De nombreux endophytes peuvent ainsi être impliqués dans des phénomènes de phytoremédiation des sols contaminés par des métaux lourds.<sup>86</sup> Ma *et al.* rapportent que des endophytes de la plante hyperaccumulatrice *Sedum plumbizincicola*, notamment la souche *Bacillus pumilus* E2S2, améliorent sa capacité de phytoextraction tout en favorisant son développement.<sup>140</sup> *Enterobacter* sp. PDN3, une souche endophytique provoque la dégradation du contaminant trichloroéthylène, pouvant être un outil prometteur pour la bioremédiation des sols.<sup>141</sup> Les cultures agricoles pourraient également en profiter puisque l'utilisation de ces endophytes pourrait réduire l'utilisation de pesticides.

Par conséquent, un fort intérêt se porte sur la compréhension de ces diverses interactions plantes/micro-organismes. Cependant, ces interactions peuvent être complexes et difficiles à identifier. Par exemple, la plante *Dichanthelium lanuginosum* var. *thermale* monocotylédone est capable de se développer en conditions extrêmes, avec un sol d'une température jusqu'à 60°C et d'un pH inférieur à 3. La tolérance de ces conditions ne lui est possible que grâce à sa symbiose avec le champignon *Curvularia protuberata* lui-même colonisé par le virus CThTV.<sup>142</sup>

Au-delà de la production directe de métabolites bioactifs, les endophytes peuvent activer chez la plante des mécanismes de protection (Plant-induced Systemic Resistance ISR). Outre la production exogène de phytohormones par les endophytes (Partie 2.4.1.3 p.44), des éliciteurs produits par les micro-organismes lors d'un stress peuvent être détectés par la plante et induire

<sup>136</sup> Yamaji K., Watanabe Y., *et al.*, Root fungal endophytes enhance heavy-metal stress tolerance of *Clethra barbinervis* growing naturally at mining sites via growth enhancement, promotion of nutrient uptake and decrease of heavy-metal concentration. *PLOS ONE* **2016**, *11*.

<sup>137</sup> Madhaiyan M., Poonguzhali S., *et al.*, Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* **2007**, *69*, p. 220–228.

<sup>138</sup> Ngigi A. N., Getenga Z. M., *et al.*, Biodegradation of S-triazine herbicide Atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* sp. from long-term treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2012**, *47*, p. 769–778.

<sup>139</sup> Germaine K. J., Liu X., *et al.*, Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *57*, p. 302–310.

<sup>140</sup> Ma Y., Oliveira R. S., *et al.*, The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil. *J. Environ. Manage.* **2015**, *156*, p. 62–69.

<sup>141</sup> Kang J. W., Khan Z., *et al.*, Biodegradation of trichloroethylene by an endophyte of hybrid poplar. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, p. 3504–3507.

<sup>142</sup> Márquez L. M., Redman R. S., *et al.*, A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* **2007**, *315*, p. 513–515.

une réponse de cette dernière. Différents types de molécules ont été recensés, comme des antibiotiques tel que la pyocyanine, des *N*-acylhomosérine lactones, des sidérophores ou encore des lipopolysaccharides.<sup>143</sup> Également des structures bactériennes comme le flagelle et les pili peuvent être responsables d'une induction de la résistance systémique d'une plante. Les bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* sont considérées comme les groupes les plus communs induisant cette forme de réponse. Toutes ces machineries chimiques permettent aux endophytes de promouvoir la bonne santé de la plante face à des stress biotiques et abiotiques (Figure II. 7).

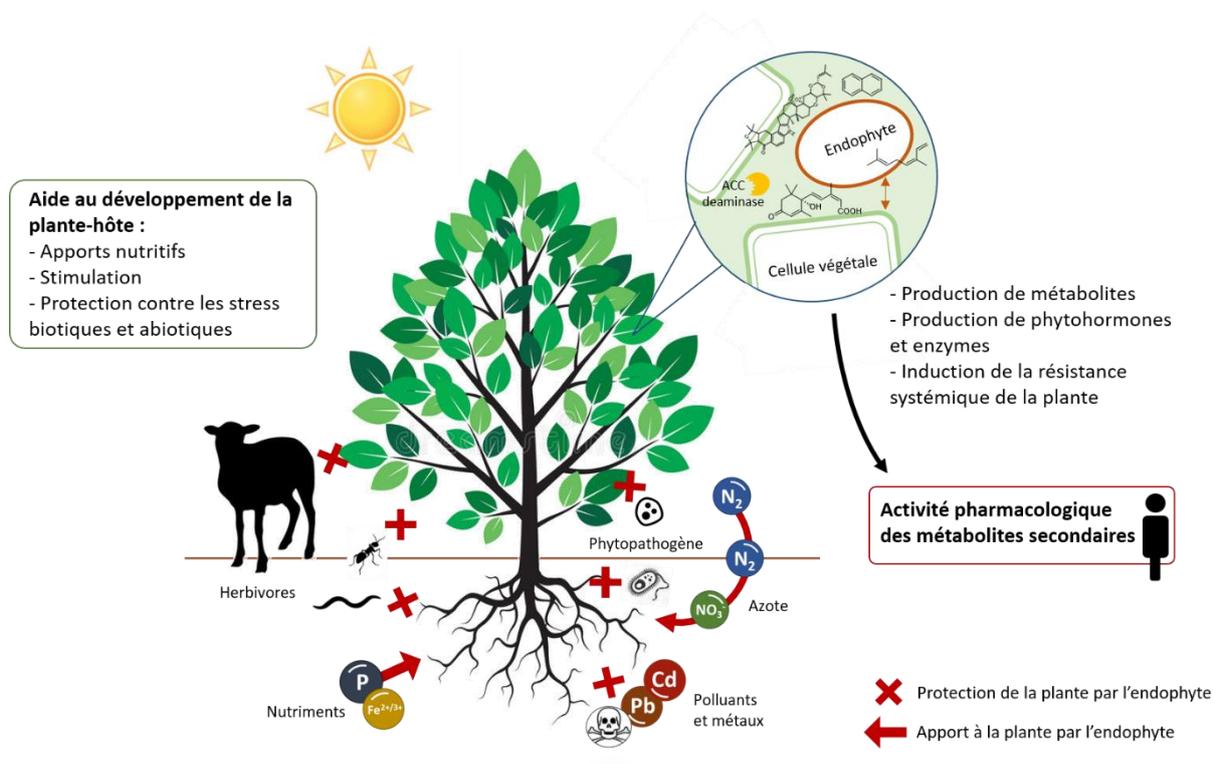


Figure II. 7. Rôle des endophytes au sein des systèmes végétaux

La colonisation par les endophytes permet d'améliorer le développement de la plante-hôte, entre autres par une stimulation de sa croissance ainsi que par une augmentation de sa résistance face aux différents stress. Cependant, d'autres fonctions peuvent être identifiées pour ces endophytes. Le rôle exact de nombreux métabolites produits par les endophytes n'a toujours pas été compris dans sa globalité au sein des interactions plantes/micro-organismes. Pour autant, cette diversité chimique semble valorisable en termes de santé humaine, comme détaillé ci-dessous.<sup>144,145</sup>

## 2.5. Activité pharmacologique des métabolites secondaires d'endophytes

Au vu de la diversité chimique produite par les endophytes, de nombreuses activités thérapeutiques de leurs métabolites secondaires ont été recensées. Les activités biologiques les plus souvent retrouvées sont les activités antimicrobiennes, antioxydantes et antitumorales. Mais

<sup>143</sup> De Vleeschauwer D., Höfte M., Chapter 6 Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. in *Advances in Botanical Research*, Academic Press, **2009**, pp. 223-281.

<sup>144</sup> Puri A., Padda K. P., et al., Nitrogen-fixation by endophytic bacteria in agricultural crops: recent advances. in *Nitrogen in Agriculture - Updates*, IntechOpen, **2017**.

<sup>145</sup> Kaddes A., Fauconnier M.-L., et al., Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules* **2019**, *24*, p. 1065.

des activités antivirales, antidiabétiques, immunosuppressantes ou encore d'autres actions pharmacologiques bénéfiques ont été rapportées.<sup>146</sup>

### 2.5.1. Activité antimicrobienne

De nombreux exemples de métabolites secondaires d'endophytes possédant une activité antimicrobienne ont été répertoriés.

De nombreux peptides produits par des endophytes sont recensés dans la littérature. Le genre *Streptomyces* est connu comme un des genres les plus producteurs en peptides antimicrobiens (Partie 1.1 p.18). Les munumbicines E-4 et E-5 isolés de *Streptomyces* NRRL 3052, endophyte de *Kennedia nigriscans*, possèdent une CMI de 4 à 8 µg/mL sur *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) et de 5 µg/mL sur *Bacillus subtilis*.<sup>107</sup> Ce même *Streptomyces* produit les actinomycines X2 et D possédant des activités antimicrobiennes sur divers pathogènes humains : *Cryptococcus neoformans* (CMI de 10 µg/mL), *Aspergillus fumigatus* (CMI de 20 µg/mL), SARM (CMI de 2,5 µg/mL) et *Mycobacterium tuberculosis* multirésistant (CMI de 10 µg/mL).<sup>107</sup> Une autre souche de *Streptomyces* sp., isolée de la plante *Monstera* sp. produit un ensemble de peptides appelé coronamycine montrant une activité antibiotique sur *C. neoformans* (CMI de 4 µg/mL) et diverses souches de *Candida* sp. (CMIs entre 16 et 32 µg/mL).<sup>108</sup> Chomcheon *et al.* rapportent la découverte d'un peptide-polycétide nommé curvularide B possédant une activité inhibitrice contre *C. albicans*. Cette molécule a été isolée du champignon endophyte *Curvularia geniculata*. L'action synergique de la curvularide B avec l'antibiotique fluconazole résulte en une CMI de 1 µg/mL contre le pathogène. De plus, la curvularide B ne possède pas de cytotoxicité.<sup>147</sup> La trtesin, un peptide de 52 acides aminés, a été identifiée par Tejesvi *et al.* à partir de l'endophyte *Fusarium tricinctum* de *Rhododendron tomentosum*. Ce peptide possède une activité contre *Staphylococcus carnosus*, *Candida albicans* et *C. utilis* (CMIs de 64 µg/mL).<sup>148</sup>

Outre les peptides, différents types de composés ont également montré une activité antimicrobienne. Cinq composés isolés d'*Edenia* sp., endophyte de *Petrea volubilis* nommés preussomerine EG1, palmarumycin CP2, CP17, CP18 et CJ-12,371, ont montré des activités ciblées sur le parasite *Leishmania donovani* avec des CI<sub>50</sub> de 0,12, 3,93, 1,34, 0,62 et 8,40 µM respectivement. Ces composés montrent une faible cytotoxicité sur des cellules Vero.<sup>149</sup> La phonoénamide isolée de *Phomopsis* sp. endophyte de *Garcinia dulcis*, a montré une activité contre *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (CMI de 6,25 µg/mL).<sup>150</sup> Des macrolides et des polyéthers ont été isolés de *Streptomyces* sp. à partir de la plante du riz *Oryza sativa*. Parmi eux, l'efomycine G (Figure II. 8) montre une activité antimicrobienne sur *Mycobacterium tuberculosis* (CMI de 12 µg/mL) et *Bacillus cereus* (CMI de 3,13 µg/mL).<sup>151</sup>

Les sesquiterpènes, diterpènes et triterpènes sont les terpénoïdes majoritaires produits par les endophytes et beaucoup d'entre eux possèdent une activité antimicrobienne. *Fusarium tricinctum* endophyte de *Salicornia bigelovii* produit un sesquiterpène nommé fusartricine (Figure II. 8). Ce

<sup>146</sup> Shukla S. T., Habbu P. V., *et al.*, Endophytic microbes: A novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. *Asian J. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *2*, p. 1–16.

<sup>147</sup> Chomcheon P., Wiyakrutta S., *et al.*, Curvularides A-E: antifungal hybrid peptide-polyketides from the endophytic fungus *Curvularia geniculata*. *Chemistry* **2010**, *16*, p. 11178–11185.

<sup>148</sup> Tejesvi M. V., Segura D. R., *et al.*, An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity* **2013**, *60*, p. 153–159.

<sup>149</sup> Martínez-Luis S., Della-Togna G., *et al.*, Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, p. 2011–2014.

<sup>150</sup> Rukachaisirikul V., Sommart U., *et al.*, Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry* **2008**, *69*, p. 783–787.

<sup>151</sup> Supong K., Thawai C., *et al.*, Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.). *Research in Microbiology* **2016**, *167*, p. 290–298.

composé affiche des CMI de 19 µg/mL sur les pathogènes humains *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus tetragenus* et *C. albicans*.<sup>152</sup>

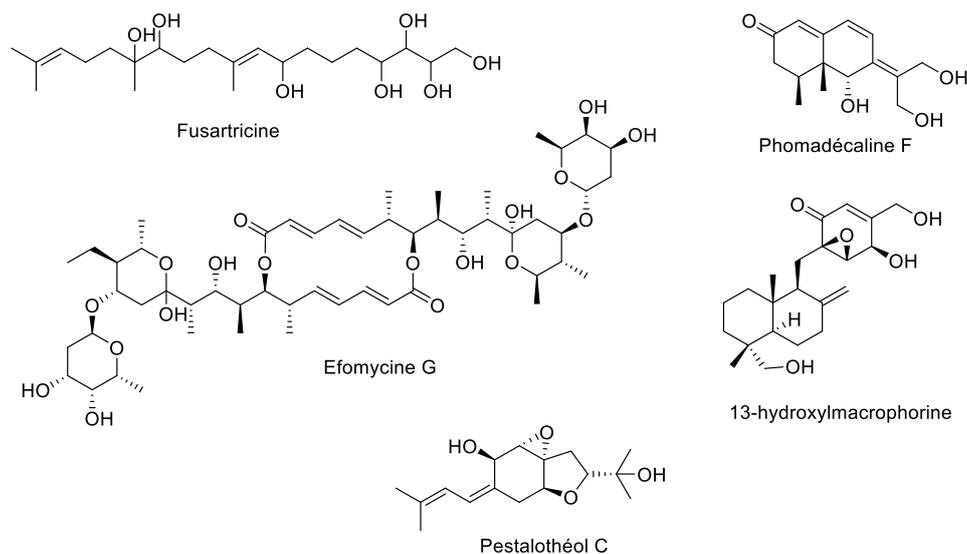


Figure II. 8. Métabolites secondaires produits par des endophytes possédant une activité antimicrobienne contre des pathogènes humains.

Quatre autres sesquiterpènes nommés phomadécaldine F (Figure II. 8), 8 $\alpha$ -monoacétoxyphomadécaldine D, 3-*epi*-phomadécaldine D et 13-hydroxylmacrophorine A ont montré une activité inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus*. Ces composés ont été isolés de *Microdiplodia* sp. endophyte du chêne *Quercus* sp.<sup>153</sup>

Des activités antivirales sont également rapportées, comme la production de pestalothéol C (Figure II. 8) possédant des activités anti-VIH à partir de l'endophyte *Pestalotiopsis theae* isolé d'une plante non identifiée.<sup>154</sup> De nombreux autres types de métabolites ont été isolés pour leur activité antimicrobienne, comme des polycétides, des lactones, des alcaloïdes (indolosesquiterpène)...<sup>155,156,157</sup>

### 2.5.2. Activité antitumorale

Plusieurs exemples montrent le potentiel de découverte d'agents antitumoraux à partir des endophytes.

La podophyllotoxine (Figure II. 9), une lignane aryltétraline, et ses analogues sont utilisés comme précurseurs de drogues antitumorales comme l'étoposide, la téniposide et l'étopophos

<sup>152</sup> Zhang J., Liu D., *et al.*, Fusartricin, a sesquiterpenoid ether produced by an endophytic fungus *Fusarium tricinctum* Salicorn 19. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *240*, p. 805–814.

<sup>153</sup> Shiono Y., Koyama H., *et al.*, New sesquiterpenes from the endophyte *Microdiplodia* sp. TT-12 and their antimicrobial activity. *Phytochem. Lett.* **2015**, *14*, p. 143–147.

<sup>154</sup> Li E., Tian R., *et al.*, Pestalothéols A–D, bioactive metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis theae*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, p. 664–668.

<sup>155</sup> Alvin A., Kalaitzis J. A., *et al.*, Combined genetic and bioactivity-based prioritization leads to the isolation of an endophyte-derived antimycobacterial compound. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *120*, p. 1229–1239.

<sup>156</sup> Ibrahim S. R. M., Elkhayat E. S., *et al.*, Aspernolides F and G, new butyrolactones from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Phytochem. Lett.* **2015**, *14*, p. 84–90.

<sup>157</sup> Ding L., Maier A., *et al.*, A family of multicyclic indolosesquiterpenes from a bacterial endophyte. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, p. 4029–4031.

phosphate.<sup>158</sup> Produite naturellement par la plante *Podophyllum* sp., des sources microbiennes se sont également avérées en produire, comme les champignons endophytes *Phialocephala fortinii* et *Fusarium oxysporum*.<sup>158,159</sup>

Deux épipolythiodioxopipérazines nommées gliocladicilline A et B (Figure II. 9) et isolées du champignon endophyte *Cordyceps* (connu comme entomopathogène), ont montré une activité antitumorale en inhibant la prolifération de cellules de mélanome B16.<sup>160</sup> Les ergochromes, xanthons dimériques, ont montré des activités antitumorales comme l'ergoflavine isolé d'un endophyte fongique non identifié de la plante *Mimosops elengi*.

Les cytochalasines (Figure II. 9) sont des composés produits fréquemment par les endophytes et existent sous de nombreuses formes dérivées. Ces molécules induisent l'apoptose des cellules en se liant aux filaments d'actine et en bloquant ainsi sa polymérisation et son élongation. Des procédés biologiques comme la division cellulaire sont alors perturbés.<sup>161</sup> De nombreux genres de champignons endophytes se sont révélés en produire : *Xylaria*<sup>162</sup>, *Rhinoctadiella*<sup>163</sup> et *Aspergillus*.<sup>164</sup>

Le taxol, un diterpénoïde, (Figure II. 9) a été isolé pour la première fois d'écorces d'arbres appartenant à la famille des *Taxus*.<sup>165</sup> Cependant, face à la quantité produite et à la rareté de ces arbres, d'autres sources de production du taxol ont été recherchées. En effet, le mode d'action unique de ce composé a permis son autorisation par la FDA comme traitement pour les cancers du sein, des poumons et des ovaires. Plusieurs endophytes associés ou non à des *Taxaceae* se sont montrés capables de produire ce composé : *Taxomyces andersoniae*<sup>166</sup>, *Pestalotiopsis guepinii*<sup>167</sup>, *Phyllosticta spinarum*<sup>168</sup> et *Botryodiplodia theobromae*.<sup>169</sup>

De la même façon, la camptothécine (Figure II. 9) et deux analogues (9-méthoxycamptothécine et 10-hydroxycamptothécine) sont produites par *Fusarium solani*, endophyte de *Camptotheca*

<sup>158</sup> Eyberger A. L., Dondapati R., et al., Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, p. 1121–1124.

<sup>159</sup> Kour A., Shawl A. S., et al., Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 24, p. 1115–1121.

<sup>160</sup> Chen Y., Guo H., et al., Ecology-based screen identifies new metabolites from a *Cordyceps*-colonizing fungus as cancer cell proliferation inhibitors and apoptosis inducers. *Cell Prolif.* **2009**, 42, p. 838–847.

<sup>161</sup> Casella J. F., Flanagan M. D., et al., Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* **1981**, 293, p. 302–305.

<sup>162</sup> Abate D., Abraham W.-R., et al., Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*. *Phytochemistry* **1997**, 44, p. 1443–1448.

<sup>163</sup> Wagenaar M. M., Corwin J., et al., Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinoctadiella*. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, p. 1692–1695.

<sup>164</sup> Feitosa A. de O., Dias A. C. S., et al., Lethality of Cytochalasin B and other compounds isolated from fungus *Aspergillus* sp. (Trichocomaceae) endophyte of *Bauhinia guianensis* (Fabaceae). *Rev. Argent. Microbiol.* **2016**, 48, p. 259–263.

<sup>165</sup> Wani M. C., Taylor H. L., et al., Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, p. 2325–2327.

<sup>166</sup> Stierle A., Strobel G., et al., Taxol and taxane production by *Taxomyces andersoniae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* **1993**, 260, p. 214–216.

<sup>167</sup> Strobel G. A., Hess W. M., et al., *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Aust. J. Bot.* **1997**, 45, p. 1073–1082.

<sup>168</sup> Kumaran R. S., Muthumary J., et al., Production of Taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Eng. Life Sci.* **2008**, 8, p. 438–446.

<sup>169</sup> Pandi M., Manikandan R., et al., Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Biomed. Pharmacother.* **2010**, 64, p. 48–53.

*acuminata*.<sup>170</sup> Précurseur des médicaments topotécan et irinotécan, cette production par le champignon évite son isolement à partir du bois de *Camptotheca acuminata*.<sup>171</sup>

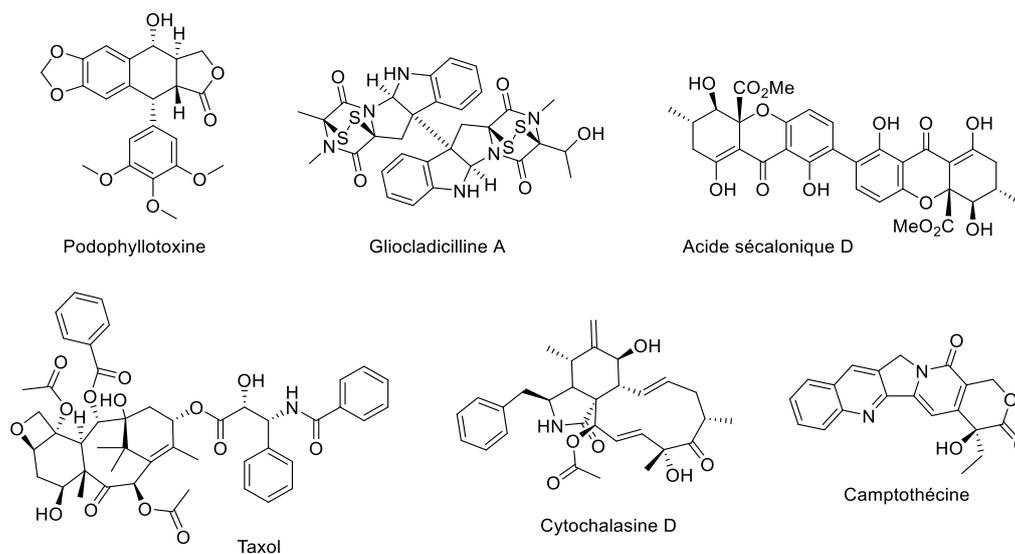


Figure II. 9. Exemples de métabolites secondaires produits par des endophytes possédant une activité cytotoxique contre différentes lignées cellulaires.

Divers autres composés comme les cytoskyrines, les phomoxanthes A et B ou les photinides A-F possèdent également des activités antitumorales sur différentes lignées cellulaires et prouvent là encore le potentiel de découverte en nouvel agent bioactif que représente les endophytes dans la lutte contre les cancers.<sup>172,173,174</sup>

### 2.5.3. Immunosuppresseurs

Le champignon endophyte *Fusarium subglutinans*, isolé de *Tripterygium wilfordii*, produit les deux composés de type diterpène pyrone : les subglutinol A et B, possédant des activités immunosuppressantes sans cytotoxicité.<sup>175</sup>

La ciclosporine, peptide cyclique microbien de onze acides aminés, a été rapportée produite par un endophyte du genre *Tolypocladium*.<sup>176</sup> L'utilisation thérapeutique de la ciclosporine a été initiée dès le début des années 1980 dans le domaine de la transplantation d'organes.

### 2.5.5. Autres activités pharmacologiques

Certains composés isolés d'endophytes montrent des activités antidiabétiques comme l'acide (S)-(+)-2-*cis*-4-*trans*-abscissique, l'acide 7'-hydroxy-abscissique et la 4-des-hydroxylaltersolanol

<sup>170</sup> Kusari S., Zühlke S., *et al.*, An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces Camptothecin and analogues. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, p. 2–7.

<sup>171</sup> Uma Shaanker R., Ramesha B. T., *et al.*, Chemical profiling of *Nothapodytes nimmoniana* for Camptothecin, an important anticancer alkaloid: towards the development of a sustainable production system. in *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (Curs.: K.G. Ramawat, J.M. Merillon), Springer, Berlin, Heidelberg, **2008**, pp. 197–213.

<sup>172</sup> Brady S. F., Singh M. P., *et al.*, Cytoskyrins A and B, new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus. *Org. Lett.* **2000**, *2*, p. 4047–4049.

<sup>173</sup> Isaka M., Jaturapat A., *et al.*, Phomoxanthes A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, p. 1015–1018.

<sup>174</sup> Ding G., Zheng Z., *et al.*, Photinides A-F, cytotoxic benzofuranone-derived gamma-lactones from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis photiniae*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, p. 942–945.

<sup>175</sup> Lee J. C., Lobkovsky E., *et al.*, Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, p. 7076–7077.

<sup>176</sup> Zabalgogea I., Alvarez A., *et al.*, Production of fumonisins by endophytic strains of *Tolypocladium cylindrosporium* and its relation to fungal virus infection. *Mycotoxin Res.* **2018**, *34*, p. 49–57.

A produits par *Nigrospora oryzae*.<sup>177</sup> La deméthylasterriquinone B1 L-783,281 mimant les effets de l'insuline, a été isolée de *Pseudomassaria* sp., endophyte d'un arbre de la forêt tropicale congolaise. L'administration orale de L-783,281 provoque une diminution des niveaux de sucre dans le sang et n'est pas détruite par le système digestif.<sup>178</sup>

De nombreux antioxydants ont pu être isolés d'endophytes, notamment des composés de type flavonoïde. Par exemple, la pestacine et l'isopestacine ont montré une activité antioxydante onze fois supérieure au troxol, analogue de la vitamine E.<sup>179</sup>

Au-delà de la production directe de métabolites par les endophytes, il est également à noter que leur présence au sein des plantes permet d'élucider la production des métabolites secondaires bioactifs de celles-ci. Par exemple, les gènes impliqués dans la production d'artémisinine par la plante *Artemisia annua* sont régulés positivement lors de l'inoculation de l'endophyte *Pseudonocardia* sp. au sein de la plante. La présence de l'actinobactérie semble stimuler ses défenses et entraîne une augmentation de la production de l'antipaludique.<sup>180</sup>

## 2.6. Perspectives sur l'isolement d'endophytes et la caractérisation de métabolites bioactifs

Un frein à la découverte de nouveaux agents thérapeutiques à partir de micro-organismes reste leur culture sur des milieux synthétiques en conditions de laboratoire. La fraction de souches fongiques isolées par les méthodes contemporaines de culture n'est pas clairement définie, mais on estime que seulement 1% de la diversité bactérienne est retenue dans les conditions normales de laboratoire.<sup>181</sup> De récentes avancées dans les méthodes de culture ont permis l'isolement de micro-organismes précédemment non-isolables entraînant la découverte de la teixobactine (Figure II. 10), un analogue de peptide représentant une nouvelle classe prometteuse d'antibiotique.<sup>182</sup>

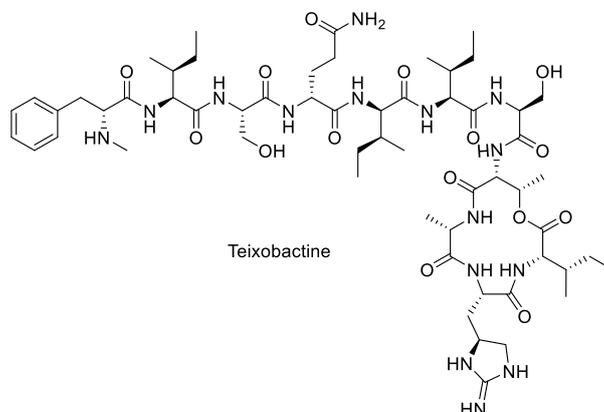


Figure II. 10. Teixobactine, peptide isolé d'une bactérie *Eleftheria terrae* cultivée selon une méthode innovante.

<sup>177</sup> Uzor P. F., Osadebe P. O., et al., Antidiabetic activity of extract and compounds from an endophytic fungus *Nigrospora oryzae*. *Drug Res.* **2017**, *67*, p. 308–311.

<sup>178</sup> Zhang B., Salituro G., et al., Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* **1999**, *284*, p. 974–977.

<sup>179</sup> Harper J. K., Arif A. M., et al., Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* **2003**, *59*, p. 2471–2476.

<sup>180</sup> Li J., Zhao G.-Z., et al., An endophytic *Pseudonocardia* species induces the production of artemisinin in *Artemisia annua*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, p. e51410.

<sup>181</sup> Walsh C. T., Tang Y., Natural products isolation and characterization. in *Natural Product Biosynthesis*, **2017**, pp. 635–689.

<sup>182</sup> Ling L. L., Schneider T., et al., A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **2015**, *517*, p. 455–459.

Au-delà de la capacité de culture, il est apparu que les conditions de culture ont un impact également sur la quantité et/ou la composition en produits naturels produits par les micro-organismes. Certaines voies de biosynthèses de métabolites secondaires sont ainsi éteintes dans les conditions de laboratoire et peuvent être réactivées par des stimulations. Zeeck *et al.* définissent ainsi le terme OSMAC (One Strain Many Compounds) pour formaliser l'hypothèse qu'une souche peut biosynthétiser différentes molécules et ainsi posséder différents profils chimiques selon les paramètres de culture utilisés.<sup>183</sup> Ces variations incluent l'agitation (dissolution d'oxygène), le pH, le milieu solide ou liquide ainsi que sa composition ou encore la température.<sup>181</sup> Par exemple, la souche endophytique *Pestalotiopsis fici*, isolé de *Camellia sinensis* montre une production différente de métabolites secondaires lorsqu'elle est mise à pousser sur un milieu de riz.<sup>184</sup> Trois nouveaux métabolites dérivés de cyclopropane sont produits lors de sa culture en milieu liquide.<sup>185</sup>

Les méthodes de co-culture entre deux souches (ou plus) ont généralement un effet positif sur la production et l'accumulation de métabolites. Des relations de compétition ou d'antagonisme peuvent se produire et ainsi stimuler la production de métabolites cryptiques. Des compétitions entre champignons et/ou bactéries ont été rapportées. La co-culture entre le champignon endophyte *Aspergillus austroafricanus* avec la bactérie *B. subtilis* ou *Streptomyces lividans* a permis l'identification de plusieurs éthers diphényle ainsi qu'un nouvel austramide.<sup>186</sup>

A ce jour, il est estimé que 10 à 15% des capacités biosynthétiques des micro-organismes sont exprimés sous des conditions normales de laboratoire.<sup>181</sup> Les méthodes OSMAC sont ainsi avantageuses pour éliciter une plus grande quantité et variabilité de composés biosynthétiques. L'avènement de l'ère génomique, avec la compréhension des clusters de biosynthèse permet également la prédiction de nombreux métabolites.<sup>181</sup>

C'est dans le contexte de problème de résistance aux antibiotiques que nous avons cherché dans le cadre du projet ANR SECIL, de nouvelles molécules et/ou des composés ayant un mode d'action original. Ce projet s'est focalisé sur l'exploration de la diversité chimique des endophytes au vu des potentialités, précédemment énoncées, qu'ils présentent.

---

<sup>183</sup> Bode H. B., Bethe B., *et al.*, Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **2002**, *3*, p. 619–627.

<sup>184</sup> Liu L., Bruhn T., *et al.*, Chloropupukeanolides C-E: cytotoxic pupukeanane chlorides with a spiroketal skeleton from *Pestalotiopsis fici*. *Chemistry* **2011**, *17*, p. 2604–2613.

<sup>185</sup> Liu L., Tian R., *et al.*, Pestaloficiols A-E, bioactive cyclopropane derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, p. 6021–6026.

<sup>186</sup> Ebrahim W., El-Neketi M., *et al.*, Metabolites from the fungal endophyte *Aspergillus austroafricanus* in axenic culture and in fungal-bacterial mixed cultures. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, p. 914–922.

### III. Study of leaf endophytic fungi : Exploration and valorization of biosourced Innovative antibacterial metabolites : Projet SECIL

#### 3.1. Objectifs et organisation du projet

L'objectif du projet SECIL (ANR internationale, ANR-15-CE21-0016) est d'explorer et de valoriser une source innovante de métabolites antibactériens provenant d'endophytes de feuilles. Les questions et verrous scientifiques qui se sont posés lors de l'élaboration de ce projet sont les suivants:

- Quelle est la diversité et l'identité des communautés endophytiques foliaires des plantes sélectionnées? Est-ce que ces écosystèmes sélectionnent des lignées fongiques spécifiques et jusqu'où la compétition entre les endophytes modèle la communauté globale?
- Quels sont les métabolites bioactifs produits par ces communautés et est-ce que ces métabolites sont actifs contre les cibles biologiques sélectionnées?
- En utilisant des approches de métabolomique et de génomique, est-ce que la biosynthèse de ces métabolites bioactifs peut être reconstituée?

Ce projet rassemble plusieurs équipes scientifiques en France et en Suisse dans les domaines de recherche en génomique (EDB – Toulouse, France ; LBBM – Banyuls/Mer, France), en métabolomique (PNBP – Université de Genève, Suisse ; LBBM – Banyuls/Mer, France), en essais antibactériens (LBBM – Banyuls/Mer, France ; Unité de Microbiologie – Université de Genève, Suisse) et en chimie des substances naturelles (Institut de Chimie des Substances Naturelles – Gif/Yvette, France ; PNBP – Université de Genève, Suisse).

#### 3.2. Organisation des communautés endophytiques

Ce projet s'intéresse aux endophytes comme source de métabolites secondaires bioactifs. Comme mentionné précédemment (Partie 2.2 p.40), les communautés d'endophytes présentent des différences écologiques suivant leurs environnements et leurs évolutions dans ces milieux. Les endophytes des milieux tropicaux sont notamment très diversifiés et subissent une pression importante de leur environnement. Les endophytes des milieux marins ont été quant à eux peu étudiés. L'étude de ces deux habitats permet d'élargir la découverte de nouveaux composés antimicrobiens car les métabolites secondaires retrouvés sont très différents entre ces deux milieux.

Très peu de données sont à ce jour disponibles sur l'agencement des communautés endophytiques au cours du temps chez une plante. Vendan *et al.* et Andreolli *et al.* ont analysé la communauté endophytique bactérienne des écorces d'individus d'âge différent de *Panax ginseng* et de vigne *Vitis vinifera*.<sup>187,188</sup> Des différences de communauté apparaissent suivant l'âge des individus. Entre des plants de vigne de trois et quinze ans, la diversité endophytique de l'écorce est différente, avec la prévalence de souches Bacilli et Actinobacteria isolées d'échantillons de trois ans, contre une majorité d'alpha et gammaproteobactéries isolées de ceux de quinze ans.<sup>188</sup> De la même façon, le

<sup>187</sup> Vendan R. T., Yu Y. J., *et al.*, Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *J. Microbiol.* **2010**, *48*, p. 559–565.

<sup>188</sup> Andreolli M., Lampis S., *et al.*, Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. *Corvina* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiol. Res.* **2016**, *183*, p. 42–52.

genre *Bacillus* est majoritairement isolé de plant de ginseng âgé d'un an alors que le genre *Staphylococcus* semble dominer dans l'écorce des plants de quatre ans.<sup>187</sup>

D'après le peu d'études concernant l'isolement des endophytes à partir de feuilles différentes d'un même individu, il semblerait que l'abondance et la diversité des endophytes fongiques serait plus importante au sein des feuilles les plus matures. Nascimento *et al.* ont étudié les communautés fongiques isolées de feuilles de différents stades de développement (première feuille distale à feuille sénescence) situées sur la même branche de *Calotropis procera*.<sup>189</sup> La diversité et le nombre d'isolats endophytes se sont révélés plus importants à partir des feuilles les plus âgées. De plus, les isolats montrant le plus d'activité antibactérienne ont été retrouvés dans les feuilles sénescences. Le stade de développement de la feuille pourrait affecter la production de métabolites des endophytes.

Ces études semblent corroborer l'idée que lors du vieillissement d'une feuille, une sélection de certaines lignées endophytiques s'effectue. Cette sélection pourrait être occasionnée entre les endophytes déjà présents au sein de la feuille, ou alors venir de l'environnement lors d'agressions microbiennes extérieures, notamment de phytopathogènes. La corrélation entre l'activité biologique des endophytes et leur répartition suivant l'âge des feuilles permettrait de mettre en évidence une sélection liée à leur compétitivité. Le projet SECIL a ainsi proposé d'étudier la colonisation endophytique foliaire de deux plantes modèles : une terrestre *Astrocaryum sciophilum* et une marine *Posidonia oceanica*.

*P. oceanicae* est un angiosperme marin endémique de la mer Méditerranée. Cette plante est une espèce protégée qui pousse de manière très lente. Elle a été choisie dans cette étude de par son incroyable longévité pouvant atteindre plusieurs dizaines de milliers d'années. Des études ont déjà été menées sur la diversité de sa communauté d'endophyte bactérien mais peu de choses sont connues au niveau de sa communauté d'endophyte fongique.<sup>190,191</sup> Au sein de ce projet ANR, elle a été le sujet d'étude des équipes à Banyuls/Mer et à Genève.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier la seconde plante choisie comme modèle, à savoir le palmier *Astrocaryum sciophilum* (Miq.) Pulle. *A. sciophilum* est un large palmier de sous-bois des forêts primaires de Guyane française (Figure III. 1).<sup>192</sup> Cette plante pousse lentement avec un âge de maturation estimé à  $170 \pm 70$  ans.<sup>193</sup> Elle a été choisie de par la longévité ainsi que de la pousse périodique de ses feuilles (en moyenne une tous les 16 mois). L'âge des feuilles peut être estimé car elles poussent tour à tour par le milieu du tronc, et se répartissent le long du stipe par ordre d'apparition (Figure III. 2). Ainsi il est possible de dater des feuilles de zéro à une vingtaine d'années puisqu'en moyenne 10 à 15 feuilles se retrouvent sur un spécimen. Les feuilles commencent leur pousse par le milieu du tronc en étant fermées, et s'ouvrent ultérieurement. Sa petite taille au sein des forêts tropicales fait de lui un récepteur de la matière végétale des arbres environnants qui se piège entre ses feuilles. Ainsi ce palmier est au contact d'une source

---

<sup>189</sup> Nascimento T. L., Oki Y., *et al.*, Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecol.* **2015**, *14*, p. 79–86.

<sup>190</sup> Garcias-Bonet N., Arrieta J. M., *et al.*, Endophytic bacterial community of a Mediterranean marine angiosperm (*Posidonia oceanica*). *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, p. 342.

<sup>191</sup> Vohník M., Borovec O., *et al.*, Communities of cultivable root mycobionts of the seagrass *Posidonia oceanica* in the northwest Mediterranean sea are dominated by a hitherto undescribed pleosporalean dark septate endophyte. *Microb. Ecol.* **2016**, *71*, p. 442–451.

<sup>192</sup> Charles-dominique P., Chave J., *et al.*, Colonization front of the understory palm *Astrocaryum sciophilum* in a pristine rain forest of French Guiana. *Global Ecol. Biogeogr.* **2003**, *12*, p. 237–248.

<sup>193</sup> Charles-Dominique P., Chave J., *et al.*, Growth strategy of the understory palm *Astrocaryum sciophilum* in the rainforest of French Guiana. in *Life forms and dynamics in tropical forests*, G. Gottsberger And S. Liede, Berlin/Stuttgart, **2001**.

importante de nutriments mais est certainement très exposé à des spores de micro-organismes provenant de l'environnement.<sup>194</sup>



Figure III. 1. Palmier *Astrocaryum sciophilum* (octobre 2018, ©Morgane Barthélemy).

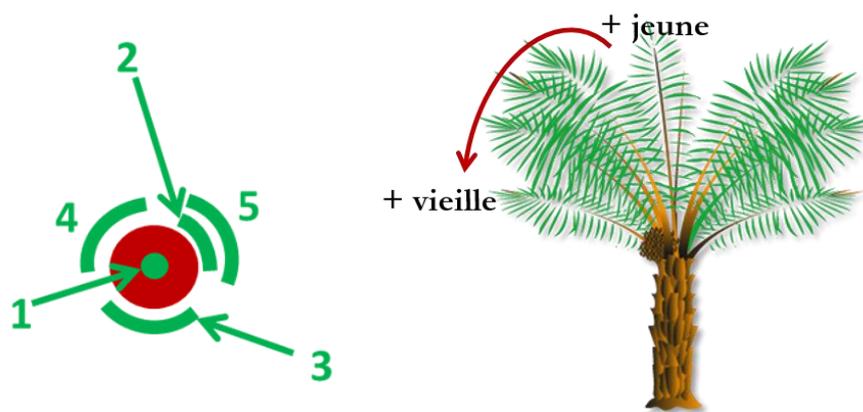


Figure III. 2. Diagramme foliaire d'*Astrocaryum sciophilum*. Le tronc est schématisé en rouge et les feuilles en vert. Suivant le décalage des feuilles au fur et à mesure de leur pousse par le milieu du tronc, la feuille 1 au milieu du tronc est la feuille la plus jeune et la feuille 5 la plus âgée.

Avec un tel modèle, il est alors possible d'étudier les différentes communautés d'endophyte suivant l'âge de la feuille d'un même individu et de voir si la compétition microbienne module leur diversité. En effet, des endophytes isolés d'une feuille âgée sont supposés être plus compétitifs car, soit ils luttent pour garder leur place au sein de la feuille face à des agressions internes ou externes, soit ils se sont implantés en passant outre les défenses des micro-organismes déjà en place. Ces endophytes seraient donc susceptibles de produire des métabolites secondaires antimicrobiens. Afin d'étudier cette communauté microbienne, plusieurs types de technologie ont été usités.

<sup>194</sup> Alvarez-Sanchez J., Barajas-Guzman G., *et al.*, Inorganic nitrogen and phosphorus in stemflow of the palm *Astrocaryum mexicanum* Liebm. located in Los Tuxtlas, Mexico. *Trop. Ecol.* **2106**, 57, p. 45-55.

### 3.3. Technologies appliquées

#### 3.3.1. Séquençage

Les endophytes sont isolés à partir de matériel végétal stérilisé en surface et mis sur un milieu de culture. Ils sont ensuite classiquement identifiés par des analyses morphologiques ou moléculaires (séquençage de Sanger). Cette méthode est limitante lorsqu'on souhaite étudier l'ensemble d'une communauté endophytique puisqu'elle implique une capacité de l'endophyte à se développer dans des conditions de laboratoire. Certains micro-organismes ne poussent pas sur des milieux de culture artificiels ou alors poussent lentement et sont dissimulés par la croissance rapide des autres. Récemment, la diversité microbienne de plantes vivantes est devenue plus accessible de par l'application de méthodes moléculaires indépendante de leur culture.

Le séquençage de nouvelle génération permet d'accéder à la diversité microbienne d'un échantillon, sans passer par une méthode de culture.<sup>195</sup> Ces méthodes rendent mieux compte de la diversité des endophytes au sein des plantes en évitant la sélection des souches selon leur capacité à croître sur des milieux de culture. Barnabas *et al.* utilisent cette technique pour accéder à la communauté endophytique de plantes sèches présente dans des herbiers.<sup>196</sup> Alors que la mise en culture du matériel végétal sec n'a permis l'isolement que d'un endophyte, plusieurs milliers d'OTUs (Unité taxonomique opérationnelle) ont été obtenus par le séquençage Illumina MiSeq.

L'étude de la communauté endophytique au sein du projet SECIL se fait selon ces deux approches : une méthode d'isolement et de culture sur milieu permettant notamment l'étude de leur métabolites secondaires et une méthode d'analyse par séquençage MiSeq afin de mieux appréhender la diversité microbienne entre les différents spécimens et entre les différents types de feuilles hôtes (suivant leur âge). Un parallèle entre la communauté isolée et la communauté identifiée directement au sein des feuilles pourra ainsi être effectué.

#### 3.3.2. Avancées dans la recherche en produits naturels : les réseaux moléculaires

La complexité de la composition des extraits naturels ainsi que l'isolement récurrent de molécules déjà connues sont des freins à la recherche de nouveaux candidats thérapeutiques naturels. Cependant, à l'heure du développement des technologies « omiques », de nombreuses avancées ont été faites dans l'analyse des profils métaboliques des extraits naturels, apportant un nouvel élan dans la découverte de médicaments d'origine naturelle.<sup>47</sup> La métabolomique propose une analyse qualitative de la composition en métabolites d'un organisme selon des conditions spécifiques.

L'identification de métabolites déjà connus en amont du travail d'isolement dans un extrait, aussi appelé déréplication, permet alors un gain de temps, d'effort et de coût.<sup>197</sup> La chromatographie liquide (LC) couplée à de la spectrométrie de masse (HPLC-MS) ou de la RMN (HPLC-RMN) sont les stratégies de déréplication les plus courantes.<sup>198</sup> Ces stratégies reposent sur les caractéristiques physiques que partagent des molécules structurellement proches, qui entraînent par exemple des profils d'absorptions UV-visible similaires. Les données UV-visible permettent la déréplication de métabolites comprenant des chromophores spécifiques. Les données de RMN ou de MS peuvent aussi conduire à l'identification de certains composés d'après la présence de

<sup>195</sup> Kraková L., Šoltys K., *et al.*, Investigation of bacterial and archaeal communities: novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional DGGE-cloning. *Extremophiles* **2016**, *20*, p. 795–808.

<sup>196</sup> Daru Barnabas H., Bowman Elizabeth A., *et al.*, A novel proof of concept for capturing the diversity of endophytic fungi preserved in herbarium specimens. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* **2019**, *374*, p. 20170395.

<sup>197</sup> Yang J. Y., Sanchez L. M., *et al.*, Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, p. 1686–1699.

<sup>198</sup> Hubert J., Nuzillard J.-M., *et al.*, Dereplication strategies in natural product research: how many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, p. 55–95.

signaux de déplacement caractéristiques ou bien d'après la formule brute proposée de l'ion précurseur. La RMN apporte notamment des données quantitatives sur la proportion des métabolites dans un extrait brut.

Cependant, même si les techniques MS sont plus sensibles que les techniques de RMN et peuvent accéder aux composés minoritaires, la déréplication d'un composé peut être difficile suivant cette seule donnée. En effet, la masse d'un ion précurseur peut correspondre à plusieurs formules brutes référencées dans des bases de données comme le Dictionnaire des Produits Naturels (DPN), SciFinder ou Reaxys. Toutes ces approches sont donc complémentaires pour l'annotation de métabolites au sein d'un extrait brut.<sup>197</sup> Mais à ce stade, cette méthode de déréplication requiert un effort d'annotation au cas par cas dans des analyses pouvant comporter plusieurs centaines de composants (définis comme un ion possédant un temps de rétention et un  $m/z$  unique). Cela ne peut raisonnablement pas s'appliquer dans le cadre de collection entière de micro-organismes.

L'analyse des données de fragmentation MS/MS ou spectrométrie de masse en tandem ont permis une avancée majeure dans les stratégies de déréplication. La fragmentation d'une molécule se fait selon sa structure tridimensionnelle et sa stabilité chimique. Des molécules de la même famille chimique, possédant des squelettes similaires vont ainsi se fragmenter de la même façon et donner des fragments ou des pertes de neutres identiques. L'identification de molécules déjà connue peut se faire par la comparaison des spectres MS/MS de façon plus fiable. De plus, des molécules ne donnant lieu à aucune identification peuvent se montrer structurellement proches d'analogues connus sur la base de ces spectres de fragmentation.

Un réseau moléculaire (Molecular Network, MN) offre une vue d'ensemble des ions de toutes les molécules d'un extrait ayant été détectés et fragmentés lors d'expériences combinées MS et MS/MS. En effet, le spectre MS/MS de chaque ion fragmenté est représenté sous la forme d'un vecteur à  $n$  dimensions,  $n$  étant le nombre de pics MS/MS détectés. Les coordonnées du vecteur dans ce repère à  $n$  dimensions sont ainsi l'intensité des pics MS/MS détectés (Figure III. 3). Le cosinus score rend compte du degré de similarité spectrale entre les spectres, c'est à dire entre les vecteurs. En effet, deux vecteurs équivalents auront un cosinus score de 1 tandis que plus les vecteurs sont éloignés, plus le cosinus score s'approchera de 0.

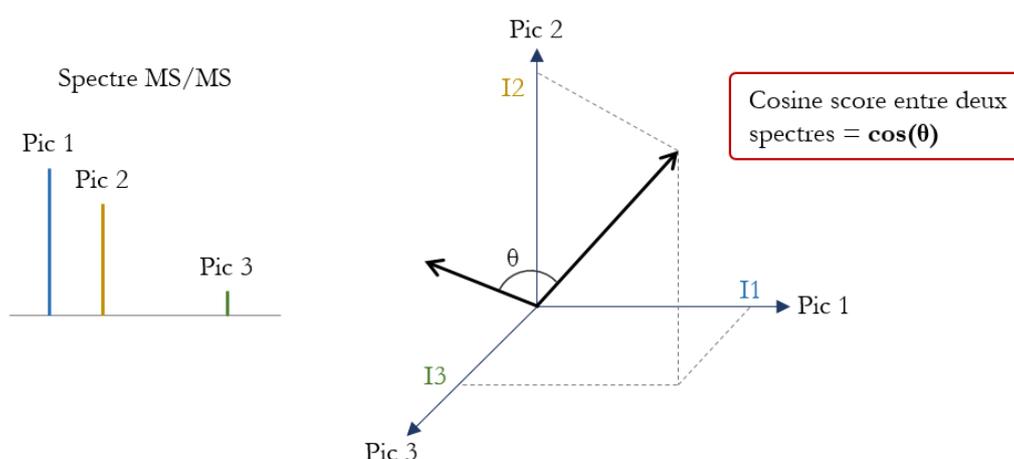


Figure III. 3. Exemple de représentation vectoriel d'un spectre MS/MS avec trois pics détectés. Pour un spectre MS/MS à  $n$  pics, la représentation vectorielle se fait sur  $n$  dimensions.

Plusieurs paramètres peuvent être pris en compte pour le calcul du cosinus score, comme le nombre minimum de fragments en commun et la tolérance sur la mesure de  $m/z$  qui dépend du

spectromètre de masse utilisé. La visualisation de ces comparaisons entre vecteurs se fait par la création du réseau moléculaire. Chaque nœud correspond aux spectres de fragmentation d'un ion précurseur et la liaison entre ces nœuds indique le degré de similarité entre les spectres (Figure III. 4). L'établissement de ces liens structuraux permet de regrouper des molécules d'une même famille chimique au sein d'un « cluster » ou groupe.<sup>197</sup> La déréplication des métabolites se fait par la comparaison du spectre de fragmentation de chaque nœud avec les spectres MS/MS disponibles des molécules standards renseignées dans des bases de données (NIST, METLIN, MassBank...),<sup>199,200</sup>

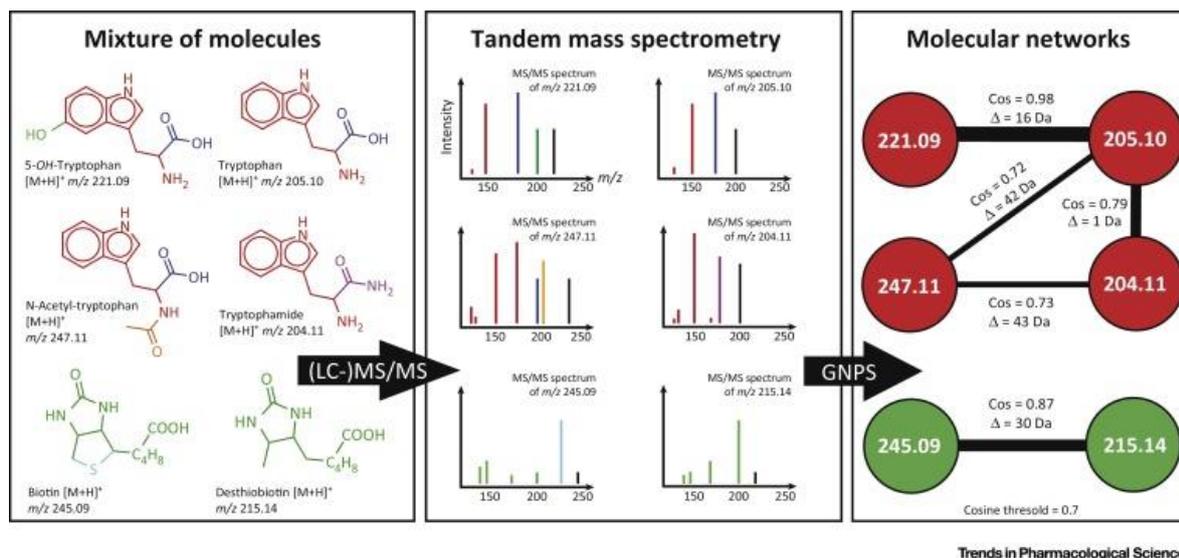


Figure III. 4. Exemple de réseau moléculaire créée à partir des données LC-MS/MS de dérivés de tryptophane et de dérivés de biotine.<sup>201</sup>

Les limites de cette approche sont inhérentes aux limites de la spectrométrie de masse c'est à dire la capacité d'ionisation et de fragmentation d'une molécule. La spectrométrie de masse n'apporte également aucune donnée sur la stéréochimie de la molécule.<sup>197</sup>

La création de réseau moléculaire peut se faire avec les différentes techniques d'ionisation (ESI, APCI, APPI...) tant que les spectres MS/MS comparés sont acquis avec les mêmes méthodes de fragmentation (CID, HCD, ECD...), la même polarité (positif ou négatif) et les mêmes énergies de collision. Yang *et al.* ont ainsi généré un réseau moléculaire avec les analyses MS/MS d'extraits bactériens par ESI, nanoESI et infusion nanoESI.<sup>197</sup>

Les méthodes bioinformatiques ont rapidement évoluées pour permettre une accessibilité avec la mise en place de plate-formes en ligne. XCMS Online (<https://xcmsonline.scripps.edu>) est la première plate-forme permettant l'analyse de données de métabolomiques, la visualisation de ces données ainsi que l'obtention de statistiques.<sup>202</sup> En 2016, la plate-forme GNPS (Global Natural

<sup>199</sup> Toropov O. V., 'Tandem Mass Spectral Library', consulté sur <https://www.nist.gov/programs-projects/tandem-mass-spectral-library>, **2012**.

<sup>200</sup> Guijas C., Montenegro-Burke J. R., *et al.*, METLIN: a technology platform for identifying knowns and unknowns. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, p. 3156–3164.

<sup>201</sup> Quinn R. A., Nothias L.-F., *et al.*, Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, p. 143–154.

<sup>202</sup> Tautenhahn R., Patti G. J., *et al.*, XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, p. 5035–5039.

Products Social Molecular Networking – <http://gnps.ucsd.edu>) a été développée et est entièrement dédiée à l'analyse de données spectrales pour la réalisation de réseaux moléculaires.<sup>203</sup> Récemment, le logiciel MetGem a été créé par une équipe de l'ICSN afin de proposer une alternative aux versions en ligne.<sup>204</sup> De plus, MetGem propose une visualisation des réseaux par l'algorithme t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding), permettant de rapprocher les différents clusters du réseau moléculaire suivant leur similarité chimique.

Les logiciels en libre accès comme MZmine2 et XCMS ou de constructeur comme Mass Profiler Pro (Agilent®) et Metabolic Profiler (Bruker®) sont utilisés comme outils de prétraitement des données MS/MS. Ces logiciels permettent une meilleure comparaison entre les échantillons, notamment en permettant de réaligner les temps de rétention pouvant varier légèrement d'une injection sur l'autre dû aux dégradations de la colonne, fluctuations de la température, de pH...<sup>202</sup> De plus, en l'absence de prétraitement, les spectres MS/MS d'isomères sont regroupés au sein d'un même nœud dans les réseaux moléculaires indépendamment de leur différence de temps de rétention. Le pré-traitement des données permet une séparation des isomères en plusieurs nœuds et rend mieux compte de la composition chimique d'un mélange.<sup>205</sup>

Enfin, une bonne déréplication des données ne peut se faire que par la qualité et la diversité des bases de données spectrales. La plate-forme GNPS regroupe ainsi une vingtaine de bibliothèques différentes. De plus, elle propose à tous les utilisateurs de contribuer au développement de cette diversité, en implémentant ses propres données MS/MS ou en créant des bases de données sur la base des métabolites présents dans chaque laboratoire.<sup>203</sup> Également, face au manque de données MS/MS disponibles comparé au nombre de molécules naturelles déjà identifiées, il est possible de comparer les données obtenues avec des spectres de fragmentation *in silico*, provenant de la fragmentation théorique de molécules : ISDB-MN, Dereplicator, ... De nombreux efforts ont ainsi récemment été faits pour l'amélioration de cette méthodologie.<sup>206</sup>

L'application de cette stratégie permet de prioriser l'étude des organismes car elle permet de rendre compte de l'originalité chimique. Dans le cadre de l'étude de la chimiodiversité des micro-organismes, des études mettent en avant l'intérêt des réseaux moléculaires pour cibler une diversité chimique dans un extrait pouvant être relié à une activité biologique. Ces réseaux moléculaires peuvent être faits sur la comparaison de données MS/MS de souches proches taxonomiquement ou bien de souches très diverses (Figure III. 5).

---

<sup>203</sup> Wang M., Carver J. J., *et al.*, Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, p. 828–837.

<sup>204</sup> Olivon F., Elie N., *et al.*, Metgem software for the generation of molecular networks based on the t-SNE algorithm. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, p. 13900–13908.

<sup>205</sup> Olivon F., Grelier G., *et al.*, MZmine 2 Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, p. 7836–7840.

<sup>206</sup> Ramos A. E. F., Evanno L., *et al.*, Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, p. 960–980.

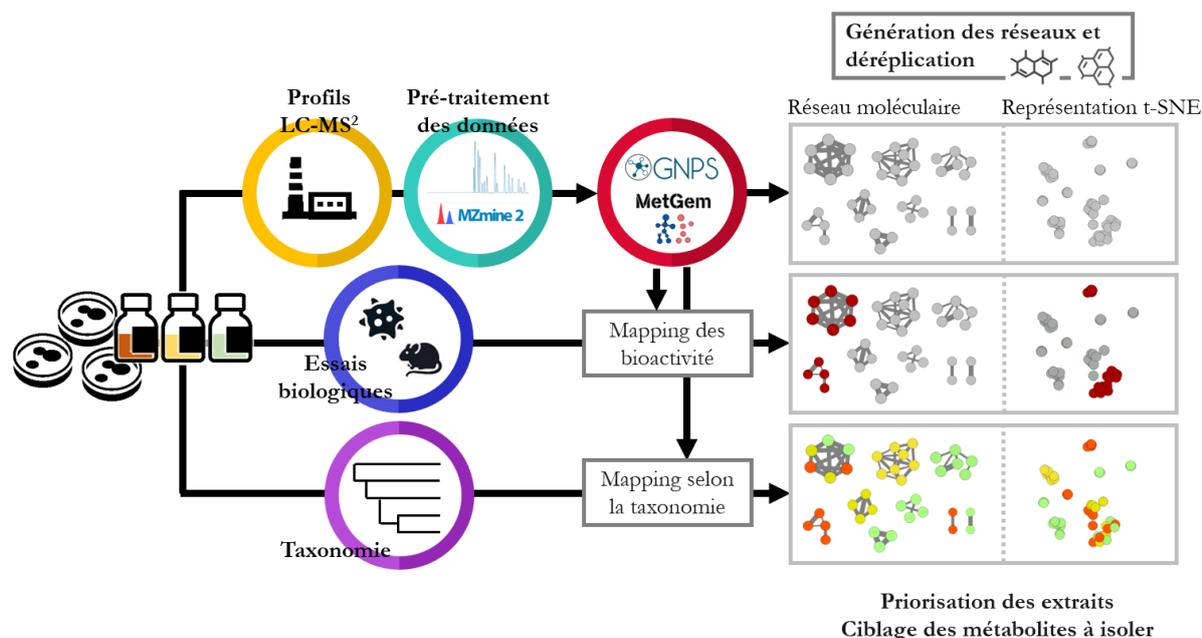


Figure III. 5. Méthodologie pour la priorisation des extraits à travailler. Les extraits des endophytes sont testés sur différentes cibles biologiques et les endophytes sont identifiés génétiquement en parallèle de l'analyse LC-MS/MS de leurs extraits. Ces informations taxonomiques et les activités biologiques peuvent être mises en évidence par des couleurs sur les réseaux moléculaires afin de cibler des clusters de molécules d'intérêts. Adapté de F. Olivon *et al.*<sup>207</sup>

Ainsi, 3000 extraits dérivés d'une collection de 1000 micro-organismes marins ont été analysés par UPLC-MS/MS (ESI-Q-TOF) et l'étude du réseau moléculaire généré a permis de cibler l'isolement de deux nouveaux polymères d'acide décanoïque dihydroxylé, les acides maridriques A et B.<sup>208</sup> L'application d'un réseau moléculaire sur les extraits de 256 micro-organismes marins a permis de sélectionner la souche *Vibrio* sp. QWI-06 pour sa diversité chimique et son activité contre le pathogène *Acinetobacter baumannii*. Les vitroprocines, une série de dérivés polycétides possédant une activité antibactérienne, ont été identifiées.<sup>209</sup>

Également, les réseaux moléculaires permettent de comparer visuellement les différences de production en métabolites d'une même souche suivant des conditions de cultures différentes (milieu, température...) et l'application de la méthode OSMAC (One Strain Many Compounds). Crüsemann *et al.* montrent avec l'analyse de 603 échantillons de souches de *Salinispora* et *Streptomyces* que les protocoles de culture et d'extraction influencent la production en métabolites.<sup>210</sup> Un réseau moléculaire formé à partir de l'analyse MS/MS d'extraits réalisés suivant différentes conditions de température de culture de *Streptomyces coelicolor* M145 a permis de cibler l'isolement de nouveaux sidérophores produit par la bactérie en condition de stress à 37°C.<sup>211</sup> La comparaison de l'extrait d'une éponge avec l'extrait de son micro-organisme

<sup>207</sup> Olivon F., Remy S., *et al.*, Antiviral compounds from *Codiaeum peltatum* targeted by a multi-informative molecular networks approach. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, p. 330–340.

<sup>208</sup> Floros D. J., Jensen P. R., *et al.*, A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. *Metabolomics* **2016**, *12*, p. 145.

<sup>209</sup> Liaw C.-C., Chen P.-C., *et al.*, Vitroprocines, new antibiotics against *Acinetobacter baumannii*, discovered from marine *Vibrio* sp. QWI-06 using mass-spectrometry-based metabolomics approach. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, p. 12856.

<sup>210</sup> Crüsemann M., O'Neill E. C., *et al.*, Prioritizing natural product diversity in a collection of 146 bacterial strains based on growth and extraction protocols. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, p. 588–597.

<sup>211</sup> Sidebottom A. M., Johnson A. R., *et al.*, Integrated metabolomics approach facilitates discovery of an unpredicted natural product suite from *Streptomyces coelicolor* M145. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, p. 2009–2016.

associé *Vibrio harveyi* montre une production par les deux organismes de spongosine, un composé avec des propriétés anti-inflammatoire.<sup>212</sup>

Comme vu précédemment, différentes stimulations permettent de mimer un environnement plus naturel pour le micro-organisme. Des métabolites secondaires peuvent ainsi être produits sous ces conditions lors du réveil de voies de biosynthèse cryptique.<sup>4</sup> L'exploration des génomes microbiens et leur manipulation combinée à la détection des produits naturels par les réseaux moléculaires accélère la compréhension du potentiel de biosynthèse.<sup>213</sup> En utilisant conjointement une approche génomique et métabolomique, Duncan *et al.* ont identifié un cluster de gènes de biosynthèse et isolé ainsi la rétimycine A, nouveau membre de la famille des quinomycines.<sup>214</sup>

Cette méthodologie connaît de nombreux succès et le nombre de publication indiquant son utilisation augmente clairement chaque année (Figure III. 6).

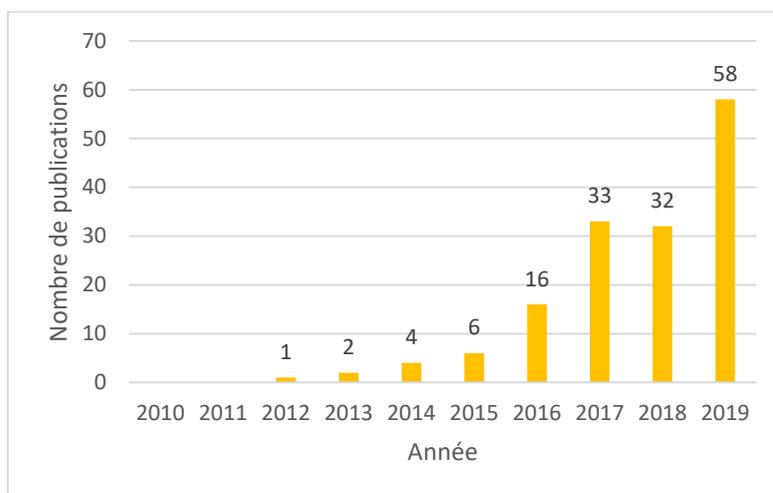


Figure III. 6. Evolution du nombre de publications portant sur les réseaux moléculaires par an. Source : site PubMed par la recherche du terme "Molecular Networking" réalisé en août 2019.

Ces avancées technologiques en chemo-informatique permettent une exploration de l'espace chimique et profitent à l'approche traditionnelle de l'isolement de métabolites par fractionnement bio-guidé. La combinaison de données d'activités biologiques avec les profils métaboliques a montré au travers des différentes études son potentiel pour la découverte de nouveaux produits naturels bioactifs.

### 3.4. Contexte et cible biologique du projet

Face à la rapidité de la mise en place des mécanismes de résistances, une priorité en santé publique est la recherche de molécules antibiotiques possédant de nouveaux mécanismes d'actions, ou bien le développement de nouveaux moyens de lutte contre les maladies infectieuses (Partie 1.3 p.31).

<sup>212</sup> Bertin M. J., Schwartz S. L., *et al.*, Spongosine production by a *Vibrio harveyi* strain associated with the sponge *Tectitethya crypta*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, p. 493–499.

<sup>213</sup> Kleigrew K., Almaliti J., *et al.*, Combining mass spectrometric metabolic profiling with genomic analysis: a powerful approach for discovering natural products from Cyanobacteria. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, p. 1671–1682.

<sup>214</sup> Duncan K. R., Crüseemann M., *et al.*, Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, p. 460–471.

Les produits naturels ont été le point de départ à l'utilisation de la majorité des classes d'antibiotiques (Partie 1.1 p.18). Entre 2000 et fin 2015, parmi les 30 nouveaux antibactériens et les deux nouvelles associations  $\beta$ -lactame/inhibiteur de  $\beta$ -lactamase commercialisés autour du monde, seize sont des produits naturels ou en sont dérivés.<sup>215</sup> Des cinq nouvelles familles d'antibiotiques identifiées parmi ces 30 molécules, trois sont issus de ressources naturelles : la daptomycine (lipopeptide d'Actinomycetes actif contre les bactéries à Gram positif), la retapamuline (famille des pleuromutiline isolé du champignon *Clitopilus passeckerianus*) et la fixadomycine (famille des tiacumicine isolé d'Actinomycetes).<sup>216,217,218</sup>

Le projet ANR SECIL a pour cible biologique deux bactéries nosocomiales *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Pseudomonas aeruginosa* (Gram négatif). En effet, les cinq nouvelles classes d'antibiotiques approuvés entre 2000 et 2015 ne ciblent que des bactéries à Gram-Positif.<sup>215</sup> Devant la recrudescence des infections causées par *P. aeruginosa*, il semble important de s'attacher à identifier de nouvelles familles d'antibiotiques actives contre les bactéries à Gram négatif.<sup>219</sup>

La gestion des souches *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) est une préoccupation mondiale majeure.<sup>219</sup> Avec le temps, des souches de *S. aureus* sont devenues résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques :  $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones, macrolides, aminoglycosides et clindamycine.<sup>220</sup> *S. aureus* est ainsi considéré comme le premier pathogène multi-résistant (MDR multidrug resistant). A l'heure actuelle, la vancomycine et la daptomycine sont les deux seuls antibiotiques approuvés par la FDA pour lutter contre le SARM.<sup>221</sup> Retrouvé principalement lors d'infections nosocomiales dans les milieux hospitaliers, SARM s'est répandu depuis deux décennies dans les communautés à travers le monde.<sup>222</sup> C'est le cas de l'isolat hypervirulent et multi-résistant ST8/USA300, d'abord cantonné à l'Amérique du Nord qui s'est répandu aux régions de l'Amérique du Sud, de l'Europe et même d'Afrique sub-saharienne.<sup>223</sup>

Afin de lutter contre ces deux pathogènes, le but du projet SECIL est d'explorer la diversité chimique d'endophytes afin d'isoler des métabolites possédant des activités antibiotiques ou quorum quenching. Entre ces deux cibles bactériennes, ce projet de thèse s'est initialement investi dans la lutte contre *S. aureus*.

---

<sup>215</sup> Butler M. S., Blaskovich M. A., *et al.*, Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, p. 3–24.

<sup>216</sup> Miao V., Coëffet-Legal M.-F., *et al.*, Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **2005**, *151*, p. 1507–1523.

<sup>217</sup> Bailey A. M., Alberti F., *et al.*, Identification and manipulation of the pleuromutilin gene cluster from *Clitopilus passeckerianus* for increased rapid antibiotic production. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, p. 25202.

<sup>218</sup> Erb W., Zhu J., From natural product to marketed drug: the Tiacumicin odyssey. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, p. 161–174.

<sup>219</sup> Davies J., Davies D., Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, p. 417–433.

<sup>220</sup> Kaur D. C., Chate S. S., Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to newer antibiotic. *J. Global Infect. Dis.* **2015**, *7*, p. 78.

<sup>221</sup> Tong S. Y. C., Davis J. S., *et al.*, *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, p. 603–661.

<sup>222</sup> Enright M. C., Robinson D. A., *et al.*, The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, p. 7687–7692.

<sup>223</sup> Strauß L., Stegger M., *et al.*, Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8. *PNAS* **2017**, *114*, p. E10596–E10604.

# Résultats

---

## IV. Biodiversité des micro-organismes endophytes : isolement et identification

### 4.1. Récolte et isolement des endophytes

Les feuilles de six spécimens d'*Astrocaryum sciophilum* ont été collectées en 2014 dans une zone en bordure de la piste de Sainte-Elie, proche de la ville de Sinnamary en Guyane française (Figure IV. 1). Les spécimens sont éloignés de quelques mètres les uns des autres.



Figure IV. 1. Carte de la Guyane et localisation des spécimens d'*Astrocaryum sciophilum*.

Sur chaque spécimen, une foliole de la feuille fermée, une foliole d'une feuille jeune (< 2 ans d'âge) et une foliole d'une feuille vieille (> 2 ans d'âge) ont été prélevées. Ces feuilles ont été choisies saines et sans signe extérieur de contamination ou attaque par les herbivores.

La foliole a été désinfectée en surface suivant une procédure décrite par Weber *et al.* légèrement modifiée.<sup>224</sup> Une fois la foliole rincée, plusieurs morceaux de 0,5 à 1 cm<sup>2</sup> sont découpés et placés sur des boîtes de Pétri. Ces boîtes sont mises en culture à 28°C pendant plusieurs jours. La Guyane étant soumise à un climat tropical, cette température semble adéquate pour la culture des micro-organismes qui en sont originaires. Cette méthode permet aux endophytes, situés à l'intérieur de la feuille, de sortir tout en évitant la culture de micro-organismes environnementaux présents à la surface de la feuille. Les endophytes poussant sur le milieu gélosé sont prélevés au fur et à mesure de leur apparition et isolés (Figure IV. 2).

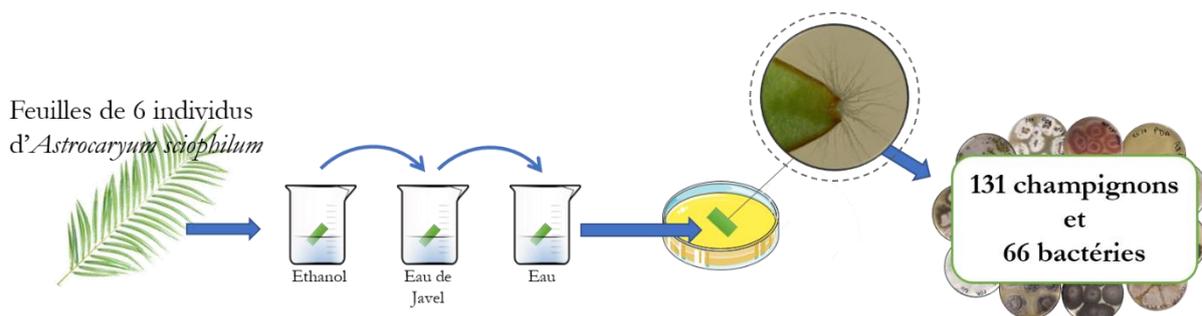


Figure IV. 2. Procédure pour l'isolement des endophytes à partir de feuille d'*A. sciophilum*.

<sup>224</sup> Weber R. W. S., Stenger E., *et al.*, Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? *Mycol. Res.* **2004**, *108*, p. 662–671.

À partir de six spécimens d'*A. sciophilum*, 197 micro-organismes endophytes ont été isolés : 131 champignons et 66 bactéries. Ces souches ont été par la suite identifiées par séquençage génétique.

## 4.2. Identification des micro-organismes isolées

### 4.2.1. Identification génétique des micro-organismes

#### 4.2.1.1. Séquençage et analyse de l'ARN ribosomique

L'identification génétique des micro-organismes a été effectuée par séquençage de la région 16S ARN ribosomique (ARNr) pour les bactéries, et des régions ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Spacer) pour les champignons.

L'ARNr 16S constitue la petite sous-unité des ribosomes des procaryotes. Ce gène codant a été de loin la région la plus utilisée pour l'étude des phylogénies bactériennes. En effet, sa présence est universelle à toutes les bactéries et cette séquence n'a pas beaucoup évolué au cours du temps de par sa fonction de structure, permettant d'utiliser ce gène comme « horloge moléculaire » : les changements aléatoires de cette séquence donnent une mesure de l'évolution des bactéries dans le temps.<sup>225</sup> La région ITS a été adoptée comme principal marqueur pour l'identification de champignons par un consortium international (Consortium for the Barcode of Life). Cette région est la plus utilisée car les variations interspécifiques (entre différentes espèces) sont plus importantes que les variations intraspécifiques (au sein d'une même espèce) et elle donne souvent une séquence de nucléotides unique et constante pour une espèce donnée.<sup>226</sup>

Dans un premier temps, les séquences génomiques obtenues sont comparées avec celles disponibles dans les banques de données génomiques (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) par l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, [www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)). Cela permet de rapprocher les séquences obtenues des séquences de souches déjà caractérisées et de proposer une première identification selon le pourcentage d'identité et de recouvrement entre ces séquences. Afin d'affiner l'identification, des arbres phylogénétiques sont réalisés avec des séquences de souches voisines issues de la banque de données GenBank. La répartition des souches suivant ces arbres phylogénétiques adaptés de la littérature permet de proposer une identification des endophytes.

#### 4.2.1.2. Résultats des identifications génétiques

L'ARN a été extrait des souches isolées puis a été amplifié par polymérisation en chaîne (PCR). Les résultats d'identification pour chaque endophyte isolé sont présentés en Annexe S1. Les séquences bactériennes et fongiques ont été analysées séparément.

##### 4.2.1.2.1. Endophytes bactériens

L'analyse par BLAST et la réalisation d'arbres phylogénétiques des séquences du gène ARNr 16S a permis l'identification au niveau du genre de 58 bactéries. Quatre bactéries sont quant à elles identifiées au rang de l'espèce (Tableau IV. 1). L'ensemble des souches bactériennes identifiées est représenté au sein d'un arbre phylogénétique global ci-dessous (Figure IV. 3). Quatre bactéries n'ont pas pu être amplifiées ou séquencées (BSNB-0560, BSNB-0570, BSNB-0548 et BSNB-0634).

<sup>225</sup> Janda J. M., Abbott S. L., 16s rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, 45, p. 2761-2764.

<sup>226</sup> Schoch C. L., Seifert K. A., *et al.*, Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* **2012**, 109, p. 6241-6246.

Tableau IV. 1. Identification proposée pour les endophytes bactériens de la communauté. L'identification a été réalisée par comparaison avec l'outil BLAST du NCBI et par la réalisation d'arbres phylogénétiques.

BSNB-0	Nombre d'isolats	Meilleur résultat de recherche BLAST (GenBank Numéro d'accèsion)	Recouvrement (%)	Identité (%)	Nombre de paire de bases analysées	Identification proposée
673	14	<i>Enterobacter mori</i> (MH101421)	100	100	848	<i>Enterobacter</i> sp.
519	12	<i>Burkholderia tropica</i> (EU723241)	100	99	868	<i>Paraburkholderia</i> sp.
566	10	<i>Bacillus subtilis</i> (MH168998)	100	100	862	<i>Bacillus</i> sp.
562	4	Uncultured bacterium (KM023847)	100	99	844	<i>Paraburkholderia</i> sp.
636	3	<i>Burkholderia</i> sp. (AB299588)	100	98	850	<i>Paraburkholderia</i> sp.
719	2	<i>Luteibacter</i> sp. (JQ723723)	100	99	855	<i>Luteibacter</i> sp.
671	2	<i>Pantoea stewartii</i> (MG517424)	100	100	720	<i>Pantoea stewartii</i>
677	2	<i>Serratia</i> sp. (MK431393)	100	99	734	<i>Serratia</i> sp.
561	1	<i>Bacillus cereus</i> (MK430529)	100	100	846	<i>Bacillus</i> sp.
618	1	<i>Bacillus</i> sp. (MG851719)	100	100	620	<i>Bacillus</i> sp.
521	1	<i>Burkholderia nodosa</i> (AY773192)	100	98	828	<i>Paraburkholderia</i> sp.
619	1	<i>Burkholderia novacaledonica</i> (FR872404)	99	99	790	<i>Caballeronia</i> sp.
635	1	<i>Burkholderia</i> sp. (AF364859)	100	98	680	<i>Paraburkholderia</i> sp.
616	1	<i>Burkholderia</i> sp. (KC555535)	100	99	768	<i>Caballeronia</i> sp.
545	1	<i>Burkholderia tropica</i> (KT390912)	100	99	667	<i>Paraburkholderia</i> sp.
617	1	<i>Caballeronia arvi</i> (NR_145594)	100	99	826	<i>Caballeronia</i> sp.
517	1	<i>Enterobacter</i> sp. (CP034769)	100	100	798	<i>Enterobacter</i> sp.
724	1	<i>Enterobacter</i> sp. (KR709226)	100	99	748	<i>Enterobacter</i> sp.
643	1	<i>Paenibacillus gluconolyticus</i> (MH734924)	100	99	863	<i>Paenibacillus gluconolyticus</i>
569	1	<i>Pantoea dispersa</i> (LC389372)	100	100	838	<i>Pantoea dispersa</i>
704	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (MF139567)	100	99	712	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Bien que 100% d'identité et de recouvrement avec des séquences connues soient retrouvés pour certaines souches, nous avons toutefois émis des réserves sur leur identification précise. Par exemple, une phylogénie de nos souches du genre *Bacillus* a été établie (Annexe S2) à partir de modèles précédemment publiés dans la littérature.<sup>227,228</sup> Ainsi, il apparaît que la souche BSNB-0643 s'insère parfaitement au sein d'un clade de *Paenibacillus gluconolyticus*. Douze séquences bactériennes correspondent à des souches du genre *Bacillus*. Cependant l'arbre réalisé à partir des séquences 16S ne permet pas de distinguer des clades suivant les différentes espèces : *B. thurigiensis*, *B. subtilis*, *B. anthracis* et *B. cereus*. Ainsi, il n'est pas possible à ce stade d'identifier les espèces de ces souches, qui sont alors identifiées uniquement au niveau du genre *Bacillus* sp.

<sup>227</sup> Wang A., Ash G. J., Whole genome phylogeny of *Bacillus* by feature frequency profiles (FFP). *Sci. Rep.* **2015**, 5, p. 13644.

<sup>228</sup> Xu D., Côté J.-C., Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, 53, p. 695-704.

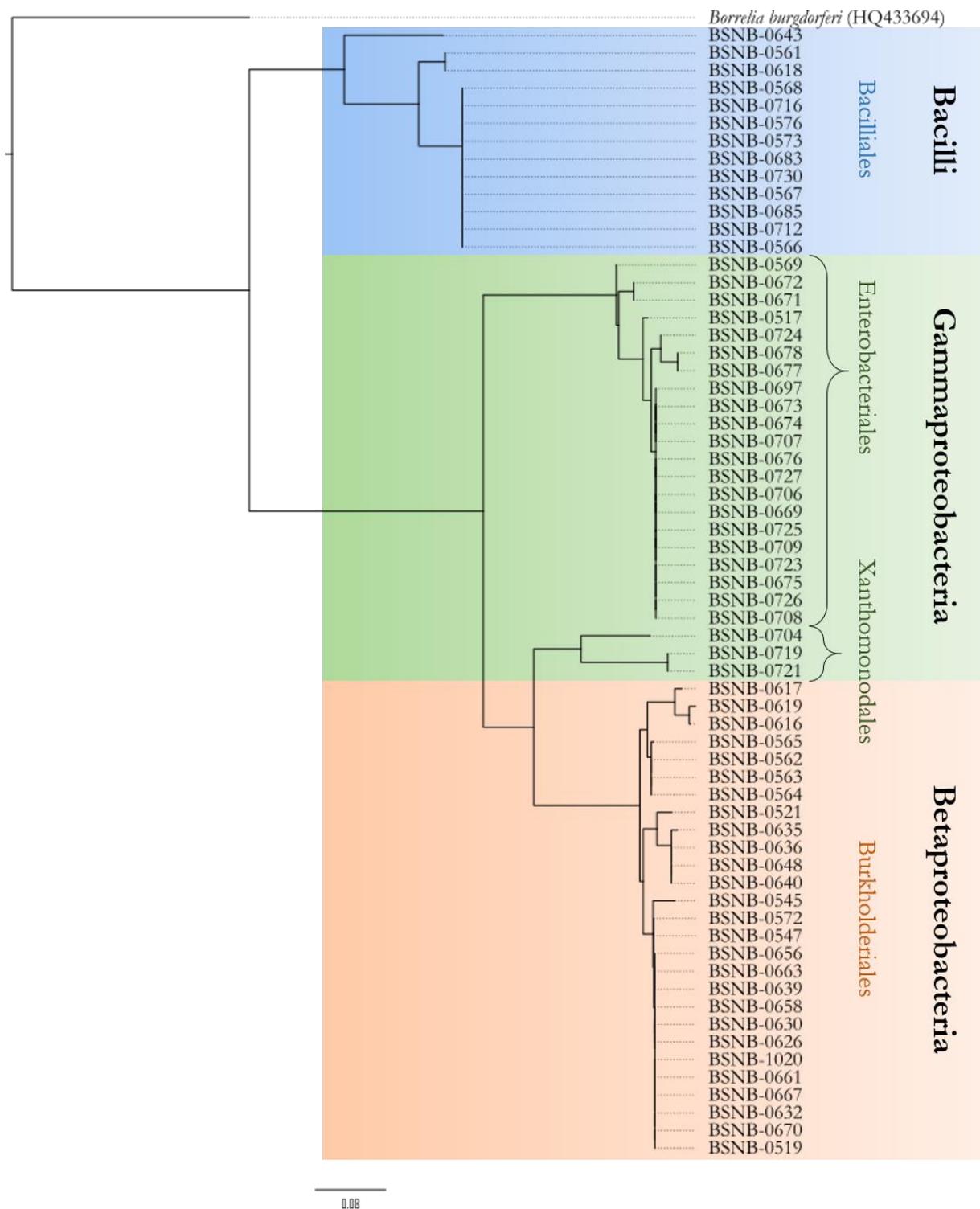


Figure IV. 3. Ensemble des bactéries de la communauté. Arbre phylogénétique dérivé d'une analyse par maximum de vraisemblance d'un alignement de séquences codant l'ARNr 16S. *Borrelia burgdorferi* est utilisé comme groupe externe.

Nous pouvons constater que quinze bactéries endophytiques appartiennent au genre *Enterobacter*, trois souches au genre *Serratia* (BSNB-0724, -0677 et -0678) et trois souches au genre *Pantoea* (BSNB-0569, -0671, -0672) (Annexe S3) grâce à l'établissement d'une phylogénie sur la famille des Enterobacteriaceae.<sup>229,230</sup> Ces souches forment la branche des Enterobacteriales de notre communauté (Figure IV. 3).

Les souches BSNB-0719 et -0721 appartiennent au genre *Luteibacter* après comparaison par BLAST de leur séquence 16S, de même BSNB-0704 correspondrait à une souche de *Stenotrophomonas maltophilia*. L'identification de ces trois souches a été confirmée en établissant une phylogénie de gammaproteobactéries (Annexe S5).<sup>231</sup>

D'après les résultats du BLAST et la construction d'une phylogénie sur la famille des Burkholderiaceae, vingt-cinq souches semblent apparentées au genre des *Paraburkholderia* et trois souches au genre *Caballeronia* (BSNB-0616, -0617 et -0619) (Annexe S4).<sup>232</sup>

#### 4.2.1.2.2. Endophytes fongiques

Nous avons choisi de suivre les critères suivants afin d'interpréter le résultat de la comparaison par BLAST de nos séquences ITS :

- pour un recouvrement et une identité  $\geq 98\%$  entre deux séquences, le genre est accepté et l'espèce peut aussi l'être,
- pour un recouvrement et une identité de séquences entre 95 et 97%, seul le genre peut être accepté,
- pour un recouvrement et une identité de séquence  $\leq 95\%$ , les souches sont identifiées à un rang supérieur (ordre, famille ou classe).

La réalisation d'arbres phylogénétiques a permis d'affiner les résultats, notamment sur l'identification de l'espèce. Ainsi 28 souches fongiques ont été identifiées au rang de l'espèce, 73 au rang du genre, 15 au rang de la famille, 4 au rang de l'ordre et 8 au rang de la classe (

Tableau IV. 2). Trois champignons (BSNB-0543, BSNB-0713 et BSNB-0722) n'ont pas été identifiés.

D'après le BLAST de nos séquences, treize souches possèdent des séquences ITS analogues de souches du genre *Endomelanconiopsis*. L'insertion de ces séquences dans une phylogénie montre qu'elles se répartissent entre deux espèces (*E. endophytica* et *E. freycinetiae*) sur des branches bien supportées (Annexe S6).

Les séquences ITS des champignons ont souvent manqué de précision pour identifier l'espèce des champignons de notre communauté. Par exemple, les cinq souches proches du genre *Stereum* d'après le résultat du BLAST, se retrouvent sur une branche partagée avec des espèces différentes du genre. Une identification de l'espèce n'est donc pas possible pour ces souches (Annexe S7).

<sup>229</sup> Paradis S., Boissinot M., et al., Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, p. 2013–2025.

<sup>230</sup> Duan Y.-Q., Zhou X.-K., et al., *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2015**, *108*, p. 1161–1169.

<sup>231</sup> Johansen J. E., Binnerup S. J., et al., *Luteibacter rhizovicinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, p. 2285–2291.

<sup>232</sup> Dobritsa A. P., Linardopoulou E. V., et al., Transfer of 13 species of the genus *Burkholderia* to the genus *Caballeronia* and reclassification of *Burkholderia jirisanensis* as *Paraburkholderia jirisanensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, p. 3846–3853.

Tableau IV. 2. Identification proposée pour les endophytes fongiques de la communauté. L'identification s'est faite d'après les résultats de comparaison par l'outil BLAST du NCBI et par la réalisation d'arbres phylogénétiques.

BSNB-0	Nb d'isolats	Meilleur résultat de recherche BLAST (GenBank Numéro d'accèsion)	Recouvrement (%)	Identité (%)	Nombre de paire de bases analysées	Identification proposée
538	14	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (MH865232)	100	100	544	<i>Colletotrichum</i> sp.
530	12	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KR995714)	100	99	556	<i>Colletotrichum</i> sp.
528	7	<i>Endomelanconiopsis</i> sp. (MH267931)	98	100	564	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i>
582	5	<i>Encomelanconiopsis endophytica</i> (MH863083)	98	100	564	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>
523	5	<i>Stereum gausapatum</i> (FN539048)	99	100	614	<i>Stereum</i> sp.
667	4	<i>Apioclypea</i> sp. (KU747601)	99	99	540	<i>Xylariales</i> sp.
641	4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (KT004429)	100	99	571	<i>Colletotrichum</i> sp.
551	4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (MH864569)	100	99	541	<i>Colletotrichum</i> sp.
575	4	<i>Fusarium</i> sp. (MK307656)	100	99	501	<i>Fusarium polyphialidicum</i>
296	3	<i>Bjerkandera adusta</i> (MF475997)	99	99	590	<i>Bjerkandera adusta</i>
579	3	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (MF475952)	100	100	519	<i>Cladosporium</i> sp.
623	3	<i>Colletotrichum</i> sp. (MG976389)	100	99	531	<i>Colletotrichum</i> sp.
687	3	<i>Diaporthe</i> sp. (MH267910)	100	98	543	<i>Diaporthe</i> sp.
301	3	<i>Fusarium decemcellulare</i> (MH857667)	100	99	527	<i>Fusarium decemcellulare</i>
291	3	<i>Penicillium brevicompactum</i> (MK267558)	98	100	486	<i>Penicillium</i> sp.
294	3	<i>Xylaria</i> sp. (JX436805)	100	99	545	<i>Xylariaceae</i> sp.
645	2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (MH866036)	100	99	537	<i>Colletotrichum</i> sp.
295	2	<i>Chaetomium</i> sp. (KM979989)	99	93	526	<i>Sordariomycetes</i> sp.
686	2	<i>Fusarium avenaceum</i> (LT821409)	99	100	543	<i>Fusarium avenaceum</i>
631	2	<i>Hypoxyylon investiens</i> (MH865186)	98	99	632	<i>Xylariaceae</i> sp.
284	2	<i>Ochroconis gamsii</i> (HQ667520)	85	84	717	<i>Ochroconis</i> sp.
577	2	<i>Phomopsis</i> sp. (FJ798595)	98	99	556	<i>Diaporthe</i> sp.
555	2	<i>Xylaria</i> sp. (JQ341065)	99	99	542	<i>Xylariaceae</i> sp.
283	1	<i>Acrodactys</i> sp. (MH267821)	97	93	542	<i>Sordariomycetes</i> sp.
304	1	<i>Ascomycota</i> sp. (KM513599)	56	85	503	<i>Sordariomycetes</i> sp.
665	1	<i>Aspergillus vitricola</i> (MH424908)	100	100	441	<i>Aspergillus vitricola</i>
305	1	<i>Chaetomium cuprem</i> (KU204551)	100	93	514	<i>Sordariomycetes</i> sp.
542	1	<i>Cladosporium antarcticum</i> (MH481703)	100	100	454	<i>Cladosporium</i> sp.
668	1	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (EU622927)	100	99	458	<i>Cladosporium</i> sp.
546	1	<i>Clonostachys rosea</i> (KT323182)	98	100	472	<i>Clonostachys rosea</i>
615	1	<i>Colletotrichum fructicola</i> (MK330023)	99	99	531	<i>Colletotrichum</i> sp.
734	1	<i>Colletotrichum</i> sp. (MH267883)	100	99	541	<i>Colletotrichum</i> sp.
583	1	<i>Colletotrichum</i> sp. (MH267867)	99	99	536	<i>Colletotrichum</i> sp.
557	1	<i>Colletotrichum vietnamense</i> (MH863700)	98	100	547	<i>Colletotrichum</i> sp.
535	1	<i>Corioloopsis rigida</i> (KR812261)	99	99	548	<i>Diaporthe</i> sp.
541	1	<i>Diaporthe</i> sp. (FJ799941)	99	99	556	<i>Diaporthe</i> sp.
547	1	<i>Endomelanconiopsis</i> sp. (MH267931)	100	99	506	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i>
533	1	<i>Entonaema</i> sp. (MH267933)	99	99	549	<i>Xylariaceae</i> sp.
664	1	<i>Fusarium</i> sp. (MH305475)	100	100	129	<i>Fusarium</i> sp.
690	1	<i>Fusarium</i> sp. (MK307656)	100	98	502	<i>Fusarium polyphialidicum</i>
717	1	<i>Harknessia australiensis</i> (JQ706084)	99	89	601	<i>Cryphonectriaceae</i> sp.
732	1	<i>Lecanicillium muscarium</i> (MF872370)	99	99	565	<i>Akanthomyces</i> sp.
299	1	<i>Muscodor</i> sp. (KF229762)	68	98	476	<i>Muscodor</i> sp.
586	1	<i>Nemania</i> sp. (KY250390)	99	99	545	<i>Xylariaceae</i> sp.
556	1	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i> (MH374594)	100	100	514	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
666	1	<i>Nodulisporium</i> sp. (AF201755)	95	99	568	<i>Xylariaceae</i> sp.
534	1	<i>Nodulisporium</i> sp. (AF201760)	94	99	580	<i>Xylariaceae</i> sp.
720	1	<i>Oxydothis</i> sp. (KU747715)	100	99	437	<i>Oxydothis</i> sp.
289	1	<i>Paramicrothyrium</i> sp. (KU747678)	92	99	491	<i>Sordariomycetes</i> sp.
691	1	<i>Penicillium hirsutum</i> var. <i>allii</i> (KF240719)	99	100	491	<i>Penicillium</i> sp.
526	1	<i>Pestalotia elastica</i> (MH860475)	100	100	521	<i>Pseudopestalotiopsis</i> sp.
288	1	<i>Sordariales</i> sp. (MH268093)	100	87	521	<i>Sordariomycetes</i> sp.
287	1	<i>Sordariomycetes</i> sp. (KU747821)	100	98	441	<i>Sordariomycetes</i> sp.
520	1	<i>Stenocarpella maydis</i> (MF076624)	99	99	540	<i>Diaporthe</i> sp.
718	1	<i>Xylaria</i> cf. <i>heliscus</i> (JQ760466)	100	99	902	<i>Xylariaceae</i> sp.
585	1	<i>Xylariaceae</i> sp. (MH727629)	100	100	542	<i>Xylariaceae</i> sp.
300	1	<i>Xylariales</i> sp. (KU747598)	99	98	505	<i>Xylariaceae</i> sp.



La réalisation d'arbres phylogénétiques sur le genre *Colletotrichum* (Annexe S8) et les familles Agaricomycetes (Annexe S7), Dothideomycetes (Annexe S9), Eurotiomycetes (Annexe S10), Diaporthales (Annexe S11), et Hypocreales (Annexe S12) selon des modèles de la littérature a permis de confirmer ou de revoir les résultats du BLAST et de proposer une identification du genre des souches endophytiques.<sup>233,234,235,236,237,238</sup>

Pour trente de nos souches, l'identification ne peut se faire qu'au niveau de la famille voire à un taxon supérieur. Par exemple, la séquence ITS de la souche BSNB-0717 forme une branche non supportée, voisine du taxon des genres *Chrysofolia* et *Harknessia*, et ne permet pas d'inclure cette souche au sein de ces genres. Cependant, comme cette branche se situe au sein du clade des Cryphonectriaceae, BSNB-0717 est donc identifiée comme Cryphonectriaceae sp. (Annexe S11).

L'arbre réalisé à partir de l'analyse de séquence ITS de souches de Xylariaceae issues de GenBank, montre que les genres de cette famille (*Nemania*, *Xylaria*, *Entonaema*, *Hypoxylon*, *Annulohypoxylon*, *Nodulisporium*...) ne forment pas des clades distincts les uns des autres (Annexe S13). Nos souches endophytiques s'insérant dans ces clades restent donc identifiées au rang de la famille dû à ce manque de précision fourni par comparaison du gène ITS. En outre, quatre souches (BSNB-0667, -0292, -0700 et -0286) forment une branche voisine aux genres connus des Xylariaceae. Ces souches semblent proches des genres *Apioclypea* et *Lanceispora* d'après les résultats du BLAST mais au vu du peu de souches identifiées dans ces genres, nous avons choisi de les identifier selon le taxon supérieur. L'arbre phylogénétique global de nos souches fongiques (Figure IV. 4) place ces quatre souches au sein du clade des Xylariales, elles sont donc identifiées comme telles.

L'analyse par BLAST de la séquence ITS de plusieurs souches montre de faible identité avec des séquences répertoriées sur GenBank. Par exemple, le genre le plus proche des souches BSNB-0288, -0295, -0305, -0282, -0287 est le genre *Chaetomium*. Cependant ces souches forment un taxon totalement extérieur à ce clade après construction d'une phylogénie des Sordariomycetes (Annexe S14). De la même façon, les micro-organismes BSNB-0304, -0283 et -0289 ne peuvent pas être assimilés à des taxons déjà connus. Ces huit souches sont donc identifiées au rang de l'ordre et par conséquent Sordariomycetes sp.

---

<sup>233</sup> Samerpitak K., Gerrits van den Ende A. H. G., *et al.*, Three new species of the genus *Ochroconis*. *Mycopathologia* **2015**, *180*, p. 7–17.

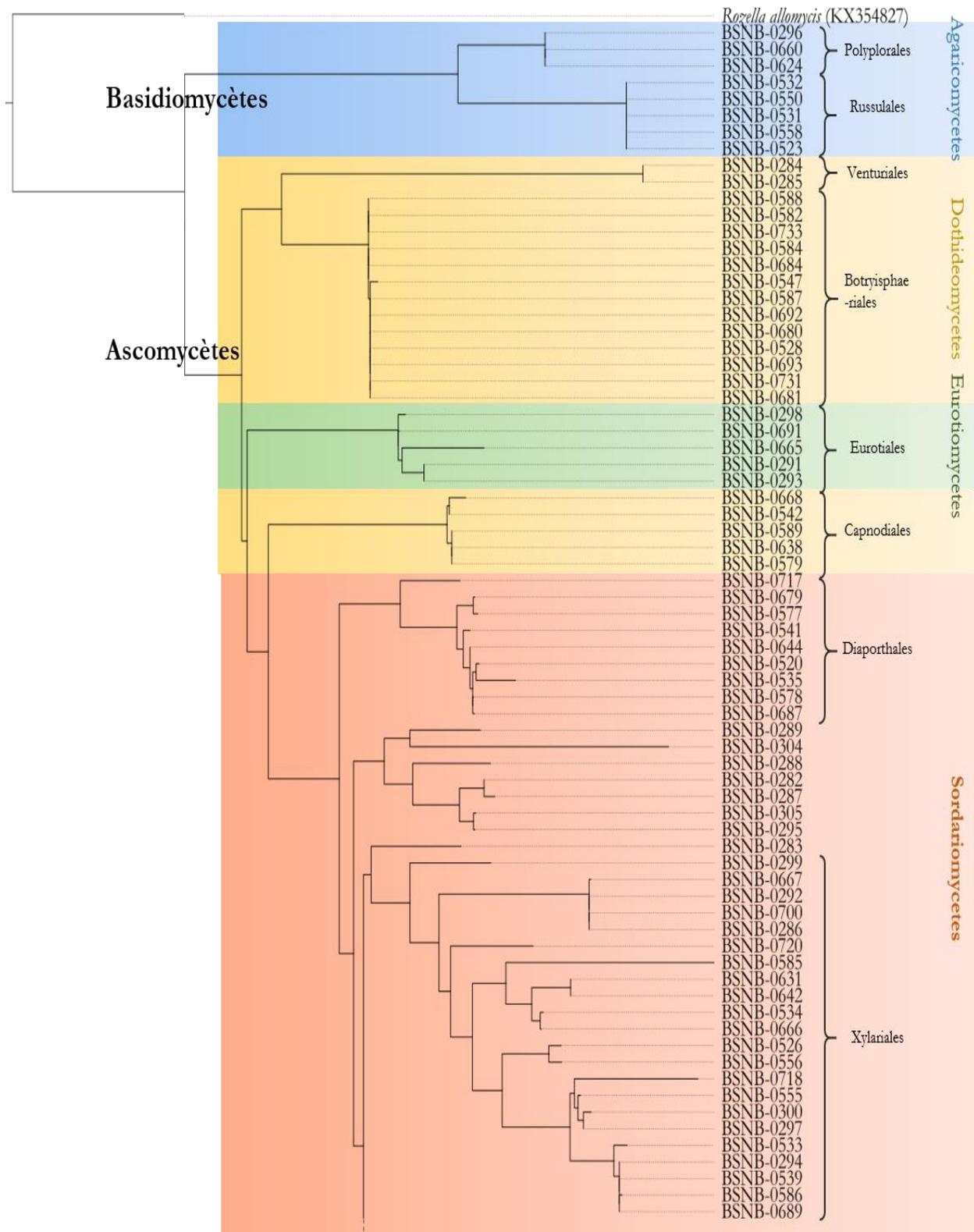
<sup>234</sup> Braun U., Crous P. W., *et al.*, Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycol. Progress* **2003**, *2*, p. 3–18.

<sup>235</sup> Yoon S. I., Kim S. Y., *et al.*, Phylogenetic evaluation of stereoid fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *13*, p. 406–414.

<sup>236</sup> Samson R. A., Visagie C. M., *et al.*, Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **2014**, *78*, p. 141–173.

<sup>237</sup> Rehner S. A., Samuels G. J., Molecular systematics of the Hypocreales: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Can. J. Bot.* **2011**, *75*, p. 816–823.

<sup>238</sup> Watanabe M., Yonezawa T., *et al.*, Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evol. Biol.* **2011**, *11*, p. 322.



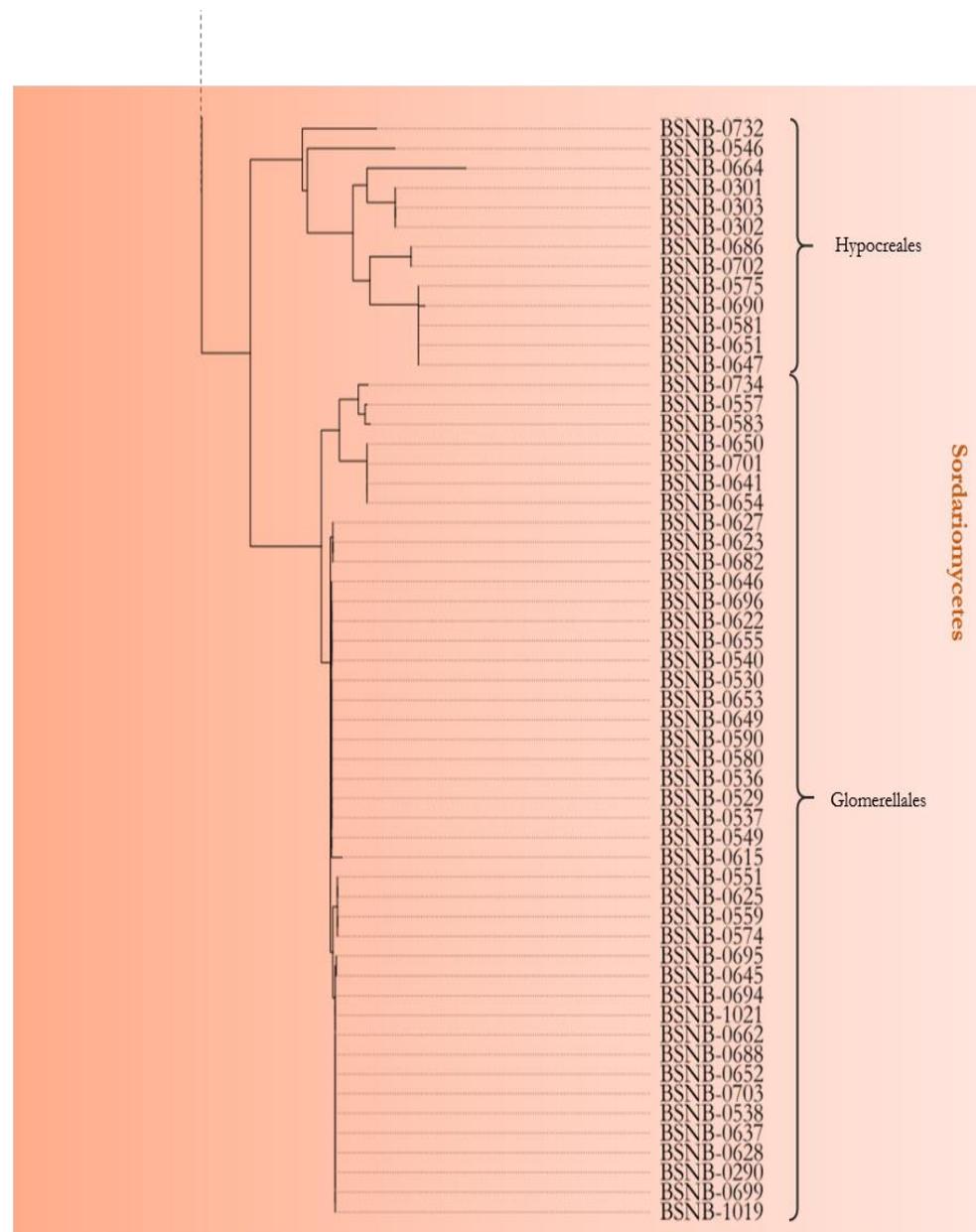


Figure IV. 4. Ensemble des champignons de la communauté. Arbre phylogénétique dérivé d'une analyse par maximum de vraisemblance d'un alignement de séquences ITS. *Rozella allomycis* est utilisé comme groupe externe.

#### 4.2.1.3. Discussion

L'identification des 62 bactéries endophytes s'est majoritairement faite au rang du genre car l'unique séquençage de la région 16S peut manquer de précision pour une identification de l'espèce. En effet, même 99% de recouvrement et d'identité entre des séquences peuvent être insuffisants pour garantir une identification précise du fait de la très grande conservation de la

région 16S entre des espèces proches.<sup>225</sup> Cette difficulté au niveau des identifications a déjà été référencée pour les genres *Bacillus*<sup>239</sup>, *Enterobacter*<sup>229</sup> et *Pseudomonas*.<sup>240</sup>

De même, suivant les souches, l'analyse de la séquence d'ITS permet ou non une identification précise. Ces différences observées au niveau des identifications renvoient à la diversité et à l'ancienneté du groupe des champignons. Les chiffres sont sujets à controverses mais le nombre d'espèces fongiques a été estimé entre 1,5 million et 5 millions.<sup>241,242</sup> Taylor *et al.* estiment avec leurs analyses, qu'à peine 2% des champignons ont été formellement décrits.<sup>243</sup> Il n'est donc pas étonnant de retrouver au sein de notre communauté, des spécimens donnant des séquences ITS extérieures aux taxons déjà référencés.

En outre, la région ITS, choisie comme code-barre universel, est satisfaisante dans de nombreux cas mais au vu de la diversité fongique, il n'est pas possible qu'un seul marqueur puisse identifier chaque spécimen au rang de l'espèce. Des séquences ITS identiques ont déjà été référencées parmi les espèces de genre *Cladosporium*<sup>244</sup>, *Penicillium*<sup>245</sup> et *Fusarium*.<sup>246</sup> De même, l'analyse du seul gène ITS s'est avérée insuffisante pour résoudre des liens phylogénétiques dans l'ordre des Xylariales, ce que nous remarquons également dans l'étude de nos souches.<sup>247</sup>

De ce fait, les mycologues se basent sur des analyses complémentaires pour apporter une identification précise. Des études morphologiques peuvent apporter des informations taxonomiques, mais nécessitent un savoir-faire et une connaissance du domaine. Le plus souvent, les analyses de plusieurs gènes sur différents loci sont combinées afin de clarifier les relations de parentés entre les souches. Dans le cadre de l'identification de procaryotes, les gènes codant pour la gyrase ( $\beta$ -sous-unité ; *gyrB*), la recombinaison A (*recA*) ou l'ARN polymérase ( $\beta$ -sous-unité ; *rpoB*) sont couramment utilisés.<sup>248</sup> Suivant les souches fongiques, le séquençage d'autres gènes que l'ITS peut s'avérer plus adéquate pour une identification plus précise.

Dans les articles concernant les produits naturels issus de champignons parus entre 2000 et 2015 dans la revue *Journal of Natural Products*, il a été estimé qu'environ 31% des identifications fongiques ont été faites sur la base de leur morphologie, 27% par des méthodes moléculaires (principalement le séquençage de l'ITS) et 14% par une combinaison de données morphologiques et moléculaires pour l'identification des champignons. 28% de ces études ne proposent pas d'identification du champignon à partir duquel des molécules sont isolées.<sup>249</sup>

---

<sup>239</sup> Bavykin S. G., Lysov Y. P., *et al.*, Use of 16s rRNA, 23s rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, p. 3711–3730.

<sup>240</sup> Gomila M., Peña A., *et al.*, Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, p. 214–226.

<sup>241</sup> Hawksworth D. L., The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* **1991**, *95*, p. 641–655.

<sup>242</sup> O'Brien H. E., Parrent J. L., *et al.*, Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, p. 5544–5550.

<sup>243</sup> Taylor D. L., Hollingsworth T. N., *et al.*, A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecol. Monogr.* **2014**, *84*, p. 3–20.

<sup>244</sup> Schubert K., Groenewald J. Z., *et al.*, Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud. Mycol.* **2007**, *58*, p. 105–156.

<sup>245</sup> Skouboe P., Frisvad J. C., *et al.*, Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol. Res.* **1999**, *103*, p. 873–881.

<sup>246</sup> O'Donnell K., Cigelnik E., Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1997**, *7*, p. 103–116.

<sup>247</sup> Bahl J., Jeewon R., *et al.*, Phylogeny of *Rosellinia capetribulensis* sp. nov. and its allies (Xylariaceae). *Mycologia* **2005**, *97*, p. 1102–1110.

<sup>248</sup> Glaeser S. P., Kämpfer P., Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* **2015**, *38*, p. 237–245.

<sup>249</sup> Raja H. A., Miller A. N., *et al.*, Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, p. 756–770.

L'identification taxonomique est un point clé pour assurer la reproductibilité d'une étude. Dans le domaine des produits naturels, une identification précise permet également d'apporter des renseignements d'un point de vue chimique et biochimique et ainsi de cibler plus facilement une souche pour la découverte de nouveaux produits naturels. À défaut d'avoir un mycologue expérimenté dans le laboratoire ou de pouvoir séquencer nos souches sur plusieurs sites de l'ADN, nous avons pris le parti d'utiliser une approche d'analyse chimique par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time of Flight) pour différencier les endophytes de notre communauté.

## 4.2.2. Discrimination des endophytes par spectrométrie de masse MALDI-TOF

### 4.2.2.1. Principe général du MALDI-TOF MS

Le principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF repose sur l'ionisation de molécules lesquelles, soumises à un champ électrique, vont se déplacer (Figure IV. 5). La distance parcourue par ces molécules en un temps donné est liée à leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ), les plus petites molécules se déplaçant plus rapidement. En atteignant le détecteur, leur temps de vol est mesuré puis converti en valeur de  $m/z$ . L'ensemble des signaux ainsi enregistré sera représenté sous la forme d'un spectre de masse avec pour abscisse les valeurs de  $m/z$  et en ordonnée les intensités. Cette méthode requiert une préparation de l'échantillon à analyser avec une matrice adéquate. Ce mélange est déposé sur un support, puis l'évaporation du solvant va permettre une co-cristallisation de la matrice avec l'échantillon. Ce dépôt est ensuite analysé : l'impact du rayon laser UV vaporise la matrice qui absorbe l'énergie du laser et libère ainsi les molécules de l'échantillon. Un transfert de protons aux molécules d'intérêt s'effectue alors, permettant leur ionisation.<sup>250</sup> Le MALDI-TOF est particulièrement bien adapté pour l'analyse de biomolécules comme les peptides ou les protéines, car il permet d'ioniser des molécules de grandes tailles, peu volatiles, sans les dégrader.

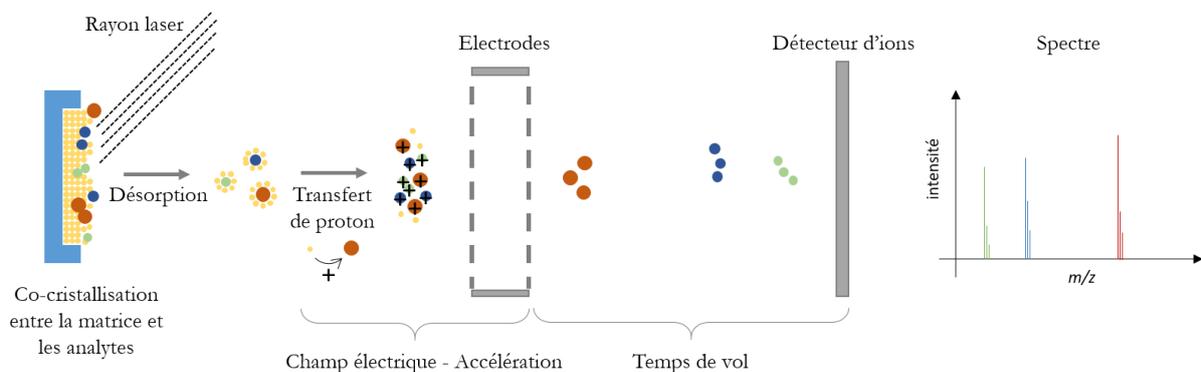


Figure IV. 5. Principe du MALDI-TOF MS pour l'obtention d'un spectre.

### 4.2.2.2. Identification de micro-organismes par analyse d'extrait protéique

#### 4.2.2.2.1. Avancée de la recherche

Lors de pathologies infectieuses microbiennes, l'agent pathogène et sa sensibilité aux différentes molécules antimicrobiennes doivent être diagnostiqués de manière urgente. Les techniques actuelles d'identification (étude des caractéristiques phénotypiques) nécessitent des

<sup>250</sup> Singhal N., Kumar M., *et al.*, MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, p. 791.

manipulations laborieuses et difficiles à appliquer en routine : culture sur différents milieux, examen microscopique, colorations, morphologie des colonies ... Dans les meilleures conditions de culture, le résultat d'identification peut s'établir entre 24 et 72h ce qui est un délai important pour la prise en charge thérapeutique du patient. Si la biologie moléculaire avec l'utilisation de la PCR permet une identification plus rapide, l'identification peut manquer de précision, comme constaté lors de l'identification de nos micro-organismes endophytes, et cette technique reste coûteuse.<sup>250</sup>

Le gain de temps pour l'identification d'agent pathogène est un verrou technologique que l'emploi du MALDI-TOF MS tente de lever. L'identification de bactéries par spectrométrie de masse a été proposée dès 1975, mais c'est avec le développement des spectrométries de masse à ionisation douce, comme le MALDI-TOF, que cette technique s'est développée.<sup>251</sup> Des appareils MALDI-TOF MS simplifiés et spécifiques ont même été développés permettant une utilisation routinière en microbiologie médicale.<sup>252</sup>

Le MALDI-TOF MS a été appliqué à l'identification des micro-organismes car il a été constaté que l'empreinte spectrale des protéines d'un micro-organisme est spécifique d'une espèce à une autre. En effet, la variation biologique qui se produit entre deux espèces est suffisante pour produire des biomarqueurs uniques, comme les protéines. Ainsi en comparant avec des profils de référence de souches parfaitement identifiées venant de bases de données constructeurs, il est possible d'identifier rapidement et de manière très fiable un micro-organisme d'après son empreinte par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS.

Cette méthode a d'abord été appliquée pour l'identification de bactéries, en déposant directement les colonies entières sur une plaque MALDI (whole cell/intact cell MS). Dans les années 2000, cette technique a également été menée sur des champignons, par exemple sur le genre *Aspergillus*, pour lesquels les spores ont été analysées (Intact spore MS).<sup>253</sup> Cependant, à cause de la rigidité de leur membrane cellulaire, un prétraitement des cellules fongiques ou des spores peut être introduit afin d'améliorer le rendement d'extraction des protéines de surface.<sup>254</sup> Ce prétraitement peut être de nature mécanique ou chimique. La préparation de l'échantillon introduit une étape supplémentaire comparé à l'analyse direct de cellules ou de spores, mais est bénéfique en termes de quantité de protéines extraites. De plus, la standardisation d'un protocole permet d'optimiser l'identification et d'augmenter la reproductibilité de ces analyses. Le protocole le plus couramment utilisé consiste à ajouter de l'éthanol (EtOH) sur le micro-organisme afin de réduire l'agrégation cellulaire, puis de traiter les cellules à l'acide formique (AF) à 70%. De l'acétonitrile (ACN) est ensuite ajouté afin d'augmenter la solubilité des protéines, et cet extrait est directement analysé par MALDI-TOF MS. Ce protocole est celui préconisé par Bruker® pour l'utilisation de sa base de données Bruker Biotyper®.

Même si son développement a été plus tardif, l'identification de champignons par MALDI-TOF MS a fait également ses preuves sur plusieurs genres retrouvés communément dans les infections

---

<sup>251</sup> Anhalt J. P., Fenselau Catherine., Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, p. 219–225.

<sup>252</sup> Lévesque S., Dufresne P. J., *et al.*, A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLoS ONE* **2015**, *10*, p. e0144878.

<sup>253</sup> Li T. Y., Liu B. H., *et al.*, Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, p. 2393–2400.

<sup>254</sup> Paul S., Singh P., *et al.*, Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: protocol standardization and database expansion for rapid identification of clinically important molds. *Future Microbiol.* **2017**, *12*, p. 1457–1466.

fongiques : *Aspergillus*<sup>255</sup>, *Penicillium*<sup>256</sup>, *Fusarium*<sup>257</sup>, plusieurs levures du genre *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Geotrichum* et *Blastoschizomyces*<sup>258</sup> ainsi que d'autres champignons dermatophytes.<sup>259,260</sup>

Plusieurs études appliquent cette méthode afin d'identifier des souches pathogènes possédant des résistances. La susceptibilité d'une bactérie pathogène aux antibiotiques se mesure traditionnellement en regardant sa croissance au contact dudit antibiotique (dilution en gélose ou bouillon de culture, gradient de diffusion comme le E-test, diffusion par disque...). Encore une fois, ces méthodes nécessitent entre 24 et 48h supplémentaires avant la mise en place d'une thérapie adaptée. Des méthodes d'amplification d'ADN ont été introduites afin de détecter la présence ou l'absence de gènes de résistances mais cela nécessite la connaissance des mécanismes de résistance de la bactérie. L'utilisation du MALDI-TOF MS propose des alternatives à ces méthodes pour la détection de résistance. En effet, il a été montré que certaines souches résistantes affichent une empreinte caractéristique, permettant leur identification d'après leur spectre protéique comme *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et à la teicoplanine et des entérocoques résistant à la vancomycine.<sup>261,262,263</sup> Des méthodes équivalentes aux tests conventionnels de susceptibilité ont également été mises en place, comme la détection dans la bactérie de produits d'hydrolyse de  $\beta$ -lactamines ou de carbapénèmes.<sup>264,265,266</sup> Ces méthodes prometteuses nécessitent néanmoins d'être étendues à plus de pathogènes et plus d'antibiotiques afin de proposer une alternative robuste aux méthodes classiques.

Au-delà du domaine clinique, le MALDI-TOF MS peut également apporter une contribution significative à la microbiologie environnementale. Stets *et al.* ont comparé les résultats de séquençage de bactéries isolées de racines de blé avec la discrimination de ces isolats suivant les empreintes protéiques par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'étude montre ainsi le potentiel des analyses par MALDI-TOF pour la différenciation au rang de l'espèce de micro-organismes

<sup>255</sup> Vidal-Acuña M. R., Ruiz-Pérez de Pipaón M., *et al.*, Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med. Mycol.* **2018**, *56*, p. 838–846.

<sup>256</sup> Lau S. K. P., Lam C. S. K., *et al.*, Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of mold and yeast cultures of *Penicillium marneffeii*. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, p. 36.

<sup>257</sup> Marinach-Patrice C., Lethuillier A., *et al.*, Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, p. 634–642.

<sup>258</sup> Marklein G., Josten M., *et al.*, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, p. 2912–2917.

<sup>259</sup> Theel E. S., Hall L., *et al.*, Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, p. 4067–4071.

<sup>260</sup> Packeu A., Hendrickx M., *et al.*, Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med. Mycol.* **2013**, *51*, p. 580–585.

<sup>261</sup> Du Z., Yang R., *et al.*, Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, p. 5487–5491.

<sup>262</sup> Majcherczyk P. A., McKenna T., *et al.*, The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *255*, p. 233–239.

<sup>263</sup> Griffin P. M., Price G. R., *et al.*, Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant Enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, p. 2918–2931.

<sup>264</sup> Jung J. S., Popp C., *et al.*, Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of  $\beta$ -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, p. 924–930.

<sup>265</sup> Hrabák J., Studentová V., *et al.*, Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, p. 2441–2443.

<sup>266</sup> Sakarikou C., Ciotti M., *et al.*, Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, p. 54.

environnementaux.<sup>267</sup> L'application du MALDI-TOF s'est également faite sur des communautés de micro-organismes isolés d'éponges, ou entre plusieurs souches environnementales de la famille des Rhizobiaceae.<sup>268,269</sup>

À notre connaissance, cette méthode n'a jamais été utilisée pour identifier ou différencier des souches dans le cadre de la recherche de produits naturels bioactifs.

#### 4.2.2.2. Travaux personnels : empreintes protéiques des endophytes

Les extraits protéiques des 197 micro-organismes endophytes ont été réalisés suivant la procédure d'extraction décrite par le constructeur Bruker® et analysés par MALDI-TOF MS (Parties 10.1.4 p.183 et 10.4.1.1.1 p.189).<sup>270</sup> Les spectres obtenus ne sont pas tous présentés dans ce manuscrit, seulement quelques exemples. La comparaison des empreintes protéiques des souches de notre communauté confirme la discrimination taxonomique des souches faite par l'identification génétique ou alors l'affine dans le cas du manque de précision du séquençage génétique.

##### i. Analyse des souches bactériennes

L'analyse des extraits protéiques des trois souches bactériennes BSNB-0616, -0617, -0619 identifiées génétiquement dans le genre *Caballeronia* a montré deux empreintes différentes : une première issue de BSNB-0617 et la deuxième partagée par BSNB-0616 et -0619 (Figure IV. 6). La présence de deux espèces différentes de *Caballeronia* est donc présumée, ce qui est corrélé à l'identification génétique qui sépare ces souches en deux branches distinctes (Annexe S4).

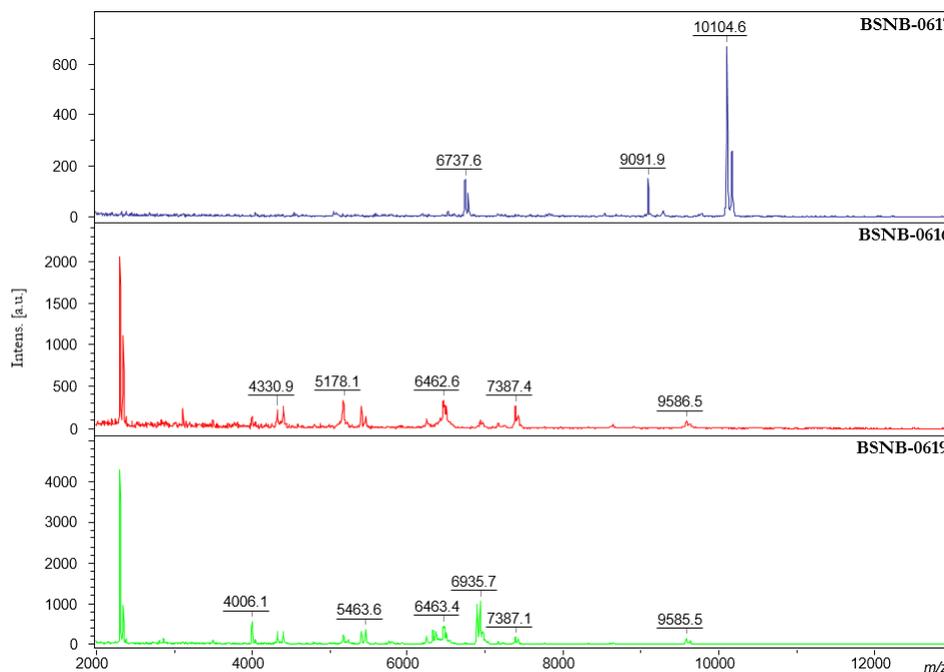


Figure IV. 6. Empreintes protéiques des trois souches du genre *Caballeronia* (BSNB-0617, -0616 et -0619).

<sup>267</sup> Stets M. I., Pinto A. S., *et al.*, Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *J. Biotechnol.* **2013**, *165*, p. 167–174.

<sup>268</sup> Dieckmann R., Graeber I., *et al.*, Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, p. 539–548.

<sup>269</sup> Ferreira L., Sánchez-Juanes F., *et al.*, MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PLOS ONE* **2011**, *6*, p. e20223.

<sup>270</sup> Bruker Daltonik GmbH, Instructions for Use MALDI Biotarget 48. **2011**.

En revanche, alors que les régions ARNr 16S de BSNB-0671 et BSNB-0672 sont identiques d'après le séquençage, nous avons obtenu pour ces deux souches des empreintes protéiques différentes (Figure IV. 7). Notre communauté semble composée de trois espèces/sous-espèces différentes de *Pantoea* (BSNB-0569, BSNB-0671 et BSNB-0672).

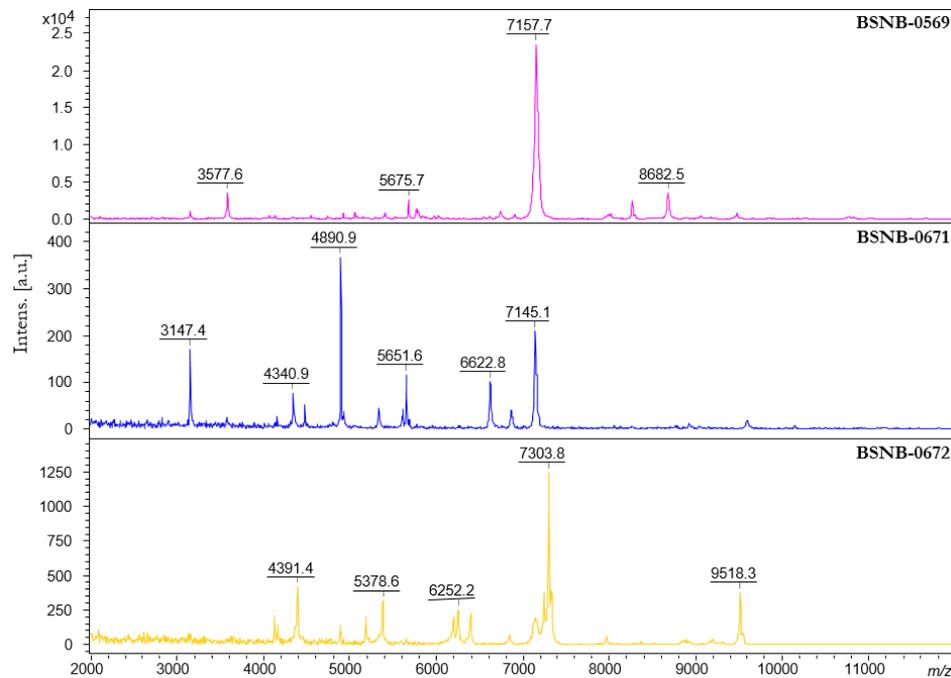


Figure IV. 7. Empreintes protéiques des trois souches du genre *Pantoea* (BSNB-0569, -0671 et -0672).

#### ii. Analyse des souches fongiques

Les empreintes protéiques obtenues pour les souches fongiques informent également de la diversité des souches. Par exemple, les trois souches identifiées dans le genre *Bjerkandera* possèdent le même ITS : BSNB-0296, -0624 et -0660. En revanche, leurs extraits protéiques montrent deux empreintes spectrales. De plus, BSNB-0296 donne une empreinte de faible intensité caractéristique de la présence de protéines difficiles à extraire (Figure IV. 8). Ces souches du genre *Bjerkandera* se répartiraient en deux espèces/sous-espèces, confirmé par l'observation morphologique des souches.

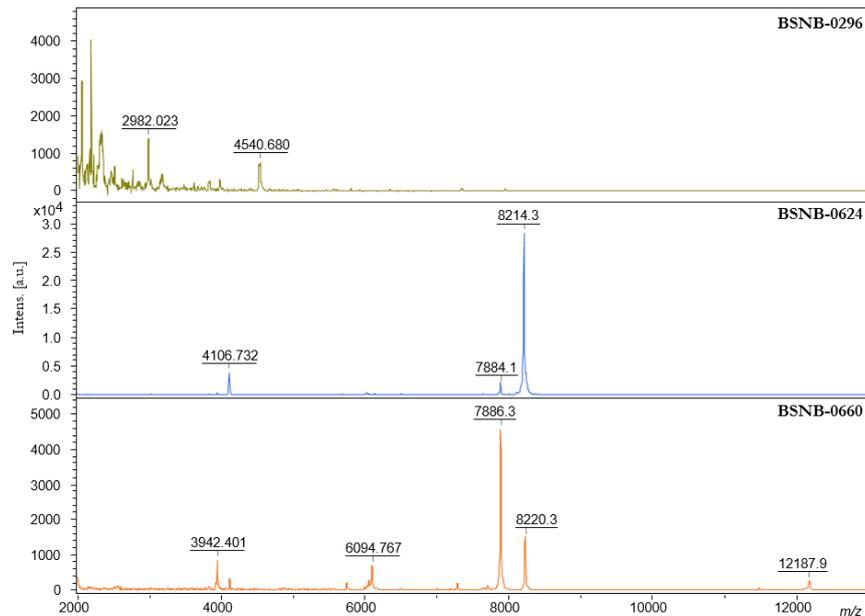


Figure IV. 8. Empreintes protéiques des trois souches du genre *Bjerkandera* (BSNB-0296, -0624 et -0660).

L'analyse des empreintes protéiques des cinq souches appartenant au genre *Stereum* indique aussi la présence de cinq espèces/sous-espèces différentes (Figure IV. 9). Comparé au résultat du séquençage de la région ITS qui place ces cinq souches dans un même clade, l'analyse protéique propose une vraie distinction entre ces souches du genre *Stereum*.

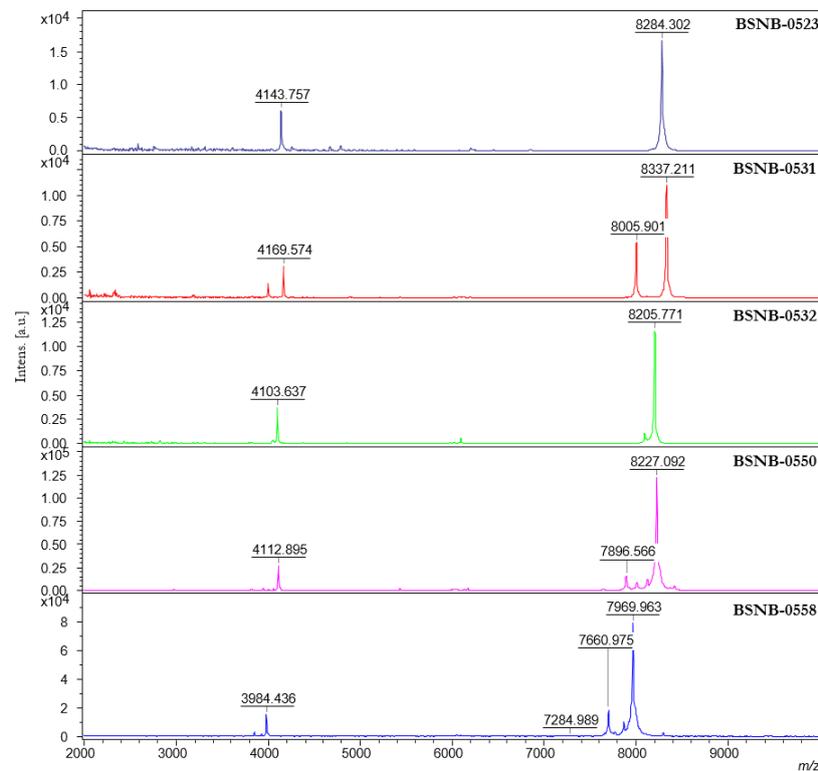


Figure IV. 9. Empreintes protéiques des cinq souches du genre *Stereum* (BSNB-0523, -0531, -0532, -0550 et -0558).

Pour chaque clade, nous pouvons ainsi proposer une différenciation entre des souches très proches génétiquement et avoir une idée de la redondance de leur isolement dans la communauté. Cependant, l'extraction protéique s'est montrée difficile pour certaines souches fongiques de la classe des Sordariomycetes. Dans la littérature, plusieurs protocoles ont été proposés pour l'améliorer mais des difficultés persistent et peuvent aboutir à une mauvaise identification des champignons. Une méthode complémentaire a alors été envisagée dans notre étude, basée sur l'analyse d'autres composants cellulaires. Les lipides étant des composants importants de la membrane cellulaire, il est intéressant de savoir si leur composition permet aussi une identification de l'espèce du micro-organisme.

#### 4.2.2.3. Identification de micro-organismes par analyse d'extrait lipidique

##### 4.2.2.3.1. Avancée de la recherche

Plusieurs études ont montré des corrélations entre la taxonomie et la composition lipidique d'une souche, notamment par l'analyse de sa composition en acide gras par chromatographie en phase gazeuse (GC) après dérivatisation.<sup>271,272,273</sup> La dérivatisation sous forme d'esters méthylés (Fatty acid methyl ester FAMES) est la technique utilisée par la plateforme commerciale MIDI™ Sherlock permettant l'identification de bactéries.<sup>274</sup>

De la même façon que précédemment, l'obtention d'une empreinte spectrale de l'extrait lipidique d'un micro-organisme par spectrométrie de masse MALDI-TOF serait un moyen rapide de proposer une identification. Voorhees *et al.* ont ainsi publié une méthode utilisant l'oxyde de calcium (CaO) pour obtenir un profil d'acide gras par MALDI-TOF MS de différentes bactéries. En effet, le CaO catalyse la fragmentation des lipides en adduits Ca d'acide gras. La composition en acides gras de bactéries à Gram positif et à Gram négatif étant spécifique suivant les espèces, leur étude a permis de regrouper des isolats suivant les différentes espèces.<sup>275</sup> La composition en acide gras d'une centaine de champignons filamenteux a été étudiée et ces analyses ont montré qu'une différenciation des souches est possible d'après cette composition.<sup>276</sup> De plus, il a été montré que de minimes variations de température ou de temps de culture influent sur cette composition.

Ces précédentes études se sont basées uniquement sur la composition en acide gras. Stübiger *et al.* ont été les seuls à ce jour à proposer une analyse par MALDI-TOF MS de la composition lipidique (principalement des phospholipides membranaires) de micro-organismes fongiques, permettant une différenciation à l'espèce de plusieurs groupes de levures (*Saccharomyces*) et de genres de champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Trichoderma*).<sup>277</sup> Par conséquent, afin de proposer une différenciation toujours plus précise des souches isolées, nous avons également appliqué cette technique d'analyse.

##### 4.2.2.3.2. Travaux personnels : empreintes lipidiques des endophytes

Pour chaque endophyte, un extrait lipidique a été réalisé par un mélange MTBE/MeOH et analysé en MALDI-TOF MS en mode d'ionisation positif et négatif (Parties 10.1.5 p.183 et 10.4.1.1.2 p.189).

---

<sup>271</sup> Kaneda T., Fatty acids in the genus *Bacillus* I. iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *J. Bacteriol.* **1967**, 93, p. 894–903.

<sup>272</sup> Lambert M. A., Hickman-Brenner F. W., *et al.*, Differentiation of Vibionaceae species by their cellular fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1983**, 33, p. 777–792.

<sup>273</sup> Canonica F. P., Pisano M. A., Gas-liquid chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae*. *J. Clin. Microbiol.* **1988**, 26, p. 681–685.

<sup>274</sup> 'Soil Microbiology | Fatty Acid Analysis | PLFA Analysis | MIDI, Inc.', consulté sur <http://midi-inc.com/>, **2019**.

<sup>275</sup> Voorhees K. J., Jensen K. R., *et al.*, Modified MALDI MS fatty acid profiling for bacterial identification. *J. Mass Spectrom.* **2013**, 48, p. 850–855.

<sup>276</sup> Stahl P. D., Klug M. J., Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, p. 4136–4146.

<sup>277</sup> Stübiger G., Wuczkowski M., *et al.*, Characterization of yeasts and filamentous fungi using MALDI lipid phenotyping. *J. Microbiol. Methods* **2016**, 130, p. 27–37.

Les empreintes lipidiques réalisées en mode négatif n'ont pas permis d'apporter des informations sur la taxonomie des souches car peu de signaux sont observés. En revanche, les empreintes lipidiques en mode positif peuvent permettre une différenciation entre nos souches.

#### i. Analyses des souches bactériennes

Si nous reprenons les exemples présentés précédemment, la même répartition en espèce/sous-espèces est observée : les trois souches de *Caballeronia* se répartissent en deux empreintes lipidiques (Figure IV. 10) et les trois souches de *Pantoea* en trois empreintes (Figure IV. 11). La présence d'un polymère apparaît au sein des extraits lipidiques des souches BSNB-0616 et BSNB-0619 d'après l'observation d'un ensemble de massifs entre  $m/z$  1100 et 2500 (Figure IV. 10).

Cependant, si la présence de pics spécifiques permet de différencier ces bactéries ( $m/z$  673,564 et 623,347), un massif de pics autour de  $m/z$  748,526 est présent chez toutes les souches d'Enterobacteriaceae. Cette méthode ne permet pas de discriminer les souches du genre *Enterobacter* aussi précisément que les empreintes protéiques.

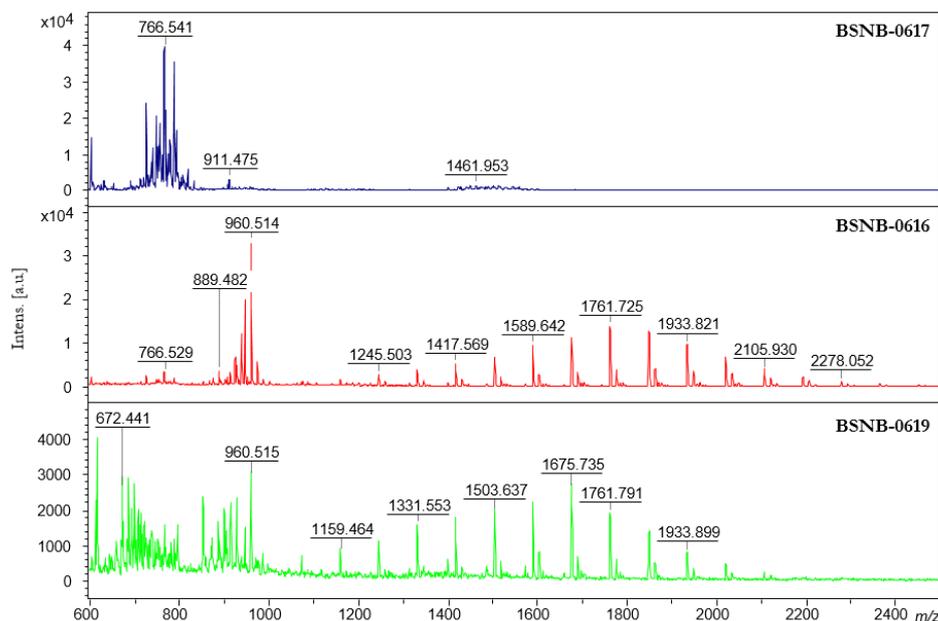


Figure IV. 10. Empreintes lipidiques des trois souches du genre *Caballeronia* (BSNB-0617, -0616 et -0619).

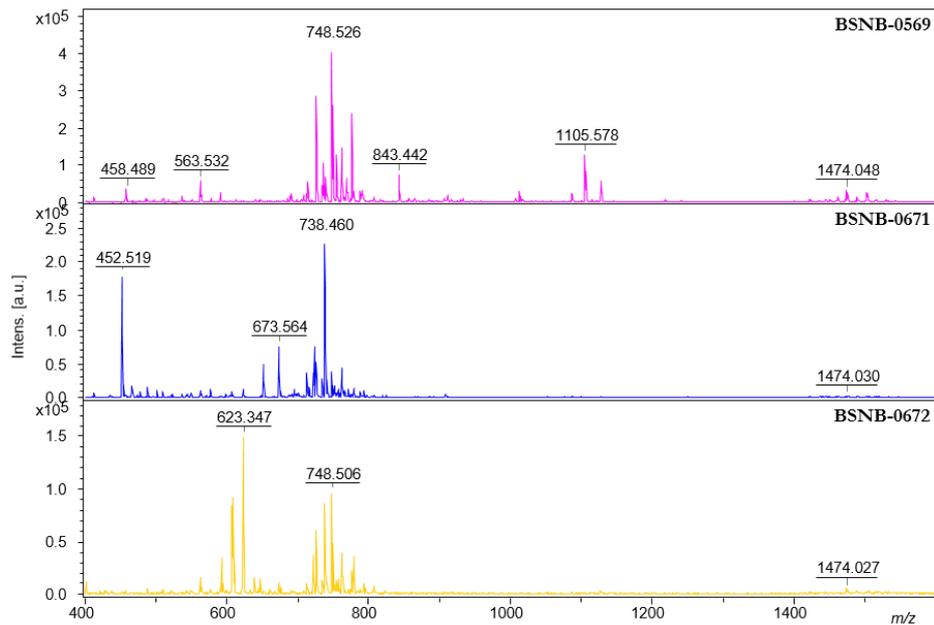


Figure IV. 11. Empreintes lipidiques des trois souches du genre *Pantoea* (BSNB-0569, -0671 et -0672).

En revanche, l'extraction lipidique permet d'extraire des métabolites connus de certaines souches. C'est le cas des souches *Bacillus*, dont les extraits lipidiques présentent des signaux dans les régions entre  $m/z$  900 et 1050 (Figure IV. 12). D'après la littérature, ces signaux peuvent être caractéristiques de lipopeptides, notamment les signaux à  $m/z$  1030,61, 1044,62 et 1058,63.<sup>278</sup>

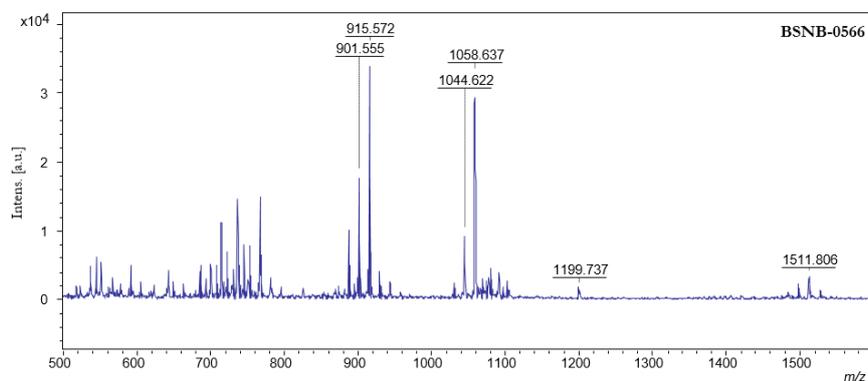


Figure IV. 12. Empreinte lipidique d'une souche de *Bacillus* sp. BSNB-0566.

#### ii. Analyse des souches fongiques

L'extraction protéique de la souche BSNB-0296 identifiée dans le genre *Bjerkandera* donne une empreinte de faible intensité avec peu de signaux. L'extraction lipidique s'avère beaucoup plus facile et la qualité du signal de l'empreinte lipidique de la souche augmente (Figure IV. 13). Comme précédemment, deux empreintes différentes ont été observées parmi les trois souches du genre *Bjerkandera* permettant d'estimer que nous avons deux espèces/sous-espèces différentes.

<sup>278</sup> Price N. P. J., Rooney A. P., *et al.*, Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 271, p. 83–89.

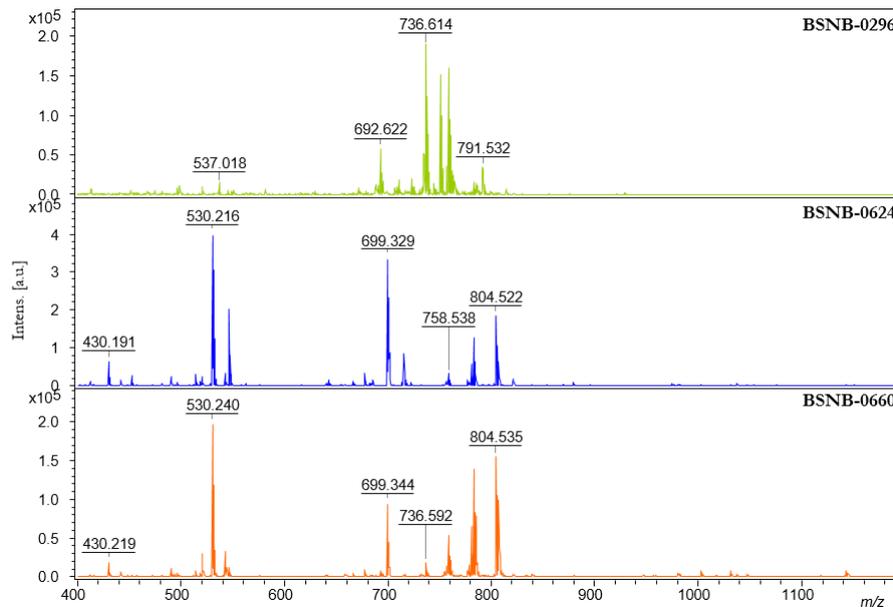


Figure IV. 13. Empreintes lipidiques des trois souches du genre *Bjerkandera* (BSNB-0296, -0624 et -0660).

En revanche, les extraits lipidiques des cinq souches du genre *Stereum* se partagent en deux empreintes différentes (une empreinte par BSNB-0523 et -0532 et la deuxième par BSNB-0531, -0550 et -0558) (Figure IV. 14). Cette discrimination entre les souches est moins précise que celle obtenue avec l'analyse de leur empreinte protéique.

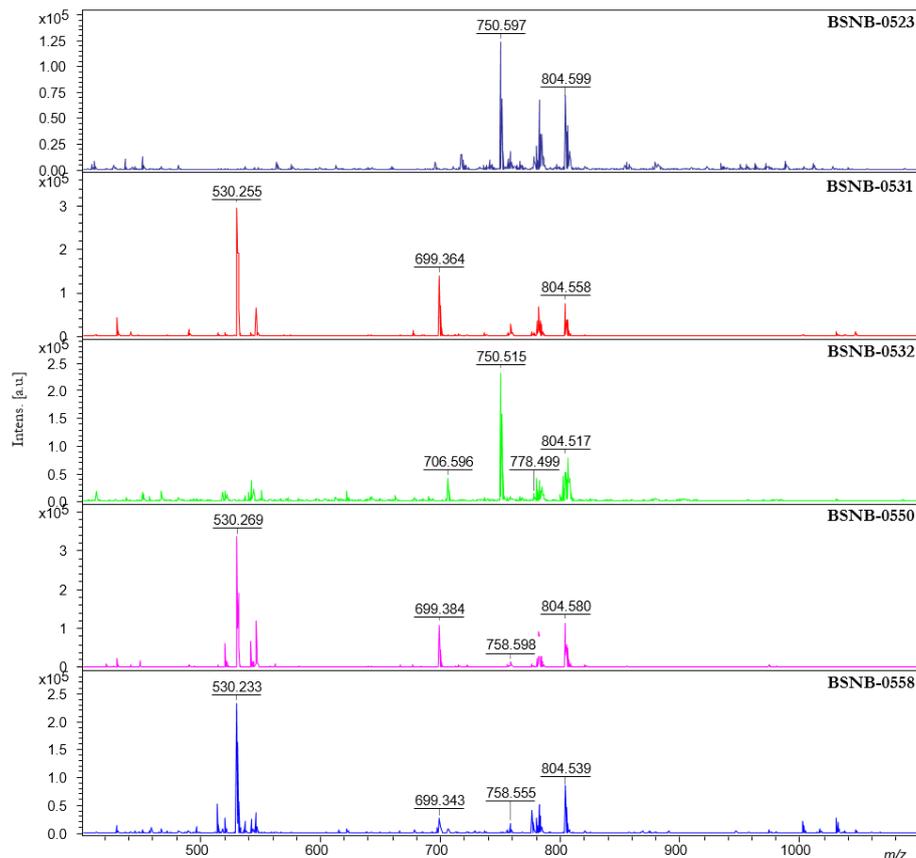


Figure IV. 14. Empreintes lipidiques des cinq souches du genre *Stereum* (BSNB-0523, -0531, -0532, -0550 et -0558).

#### 4.2.2.4. Discussion

Les analyses par MALDI-TOF MS des extraits protéiques et lipidiques de chaque souche ont été effectuées afin d'apporter une information sur la discrimination entre nos endophytes. En effet, nous avons vu précédemment (Partie 4.2 p.71) que suivant les souches, l'unique séquençage de ces régions ne permet pas toujours d'identifier précisément un micro-organisme.

L'utilisation du MALDI-TOF MS pour l'identification de micro-organismes se développe de plus en plus par la rapidité d'exécution et la finesse de l'identification taxonomique pouvant en découler. Ne possédant pas de bases de données spectrales pour comparer les empreintes obtenues, cette méthode ne nous a pas permis d'apporter une identification plus précise mais plutôt d'effectuer une comparaison entre les souches. Il a ainsi été possible de différencier les endophytes comme suit :

- des empreintes protéiques identiques indiquent qu'il y a eu une redondance au niveau de l'isolement des endophytes, que ce soit d'une même feuille, d'un même individu ou bien d'individus de palmiers différents,
- des empreintes protéiques différentes entre des souches identifiées d'un même taxon sur la base du séquençage 16S ou ITS, indiquent des taxons différents.

Cette méthode a permis d'avoir un aperçu de la diversité en espèces (ou sous-espèces) des souches isolées dans notre communauté.

L'analyse des empreintes lipidiques ne donne pas un résultat généralisable : suivant les genres, la discrimination des souches en espèces/sous-espèces proposée par ces empreintes rejoint celle donnée par les empreintes protéiques ou sont parfois moins discriminantes (notamment dans le cas des bactéries). Cependant, nous pouvons retrouver certains métabolites caractéristiques d'un genre dans ces extraits comme pour les *Bacillus*, où des signaux de  $m/z$  correspondants aux lipopeptides sont retrouvés.<sup>278</sup> Ces métabolites caractéristiques sont des informations supplémentaires pour améliorer l'identification taxonomique de micro-organismes.

Ces deux types d'analyses (empreintes protéiques et lipidiques) sont complémentaires. Les empreintes protéiques, si elles sont très spécifiques, sont difficiles à obtenir pour certains champignons selon un protocole unique. Les empreintes lipidiques peuvent remédier à cette difficulté tout en proposant un résultat équivalent. Mais les empreintes lipidiques apparaissent moins discriminantes sur certaines souches. Néanmoins, cela apporte un intérêt pour palier la très grande spécificité des empreintes protéiques : une souche nouvellement isolée au laboratoire, sans identification génétique et avec une empreinte protéique unique pourra potentiellement être identifiée au niveau du genre grâce à son empreinte lipidique (en comparaison avec celles déjà analysées).

Cette méthodologie paraît prometteuse pour l'identification rapide de souches environnementales récoltées au sein du laboratoire. Il serait ainsi possible dans un premier temps d'identifier des endophytes sans passer par une identification génétique. Cependant, cette méthode repose sur l'établissement d'une base de données adéquate avec une identification précise des micro-organismes, ce qui fait partie des projets en développement dans l'équipe.

### 4.3. Diversité écologique de la communauté étudiée

Pour rappel, la récolte de feuilles de six spécimens d'*A. sciophilum* a permis l'isolement et l'identification de 197 endophytes (131 champignons et 66 bactéries).

#### 4.3.1. Diversité des genres bactériens

Neuf genres différents parmi les 66 souches bactériennes ont été isolés et identifiés : *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Caballeronia*, *Paraburkholderia*, *Luteibacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea* et *Stenotrophomonas*. Des souches des ordres Bacilliales et Burkholderiales sont couramment isolées lors de la recherche d'endophytes et de nombreuses associations plantes/bactéries ont été observées. Il a été montré que leur présence chez une plante-hôte pouvait prévenir de maladies, promouvoir le développement de la plante ou encore stimuler ses défenses.<sup>279,280</sup> Parmi le genre *Paraburkholderia*, l'espèce *phytofirmans* a été décrite comme étant un endophyte aidant au développement de la plante hôte : elle permet notamment de réduire la susceptibilité de la plante aux maladies et d'améliorer sa résistance à des stress abiotiques.<sup>135,281,282</sup>

Le genre *Luteibacter* a été isolé pour la première fois en 2005 de la rhizosphère d'orge (*Hordeum vulgare*).<sup>231</sup> A ce jour, trois espèces ont été décrites : *L. anthropi*, *L. yeojuensis* et *L. rhizovicinus*.<sup>283</sup>

La présence dans notre communauté de souches Enterobacterales (*Enterobacter*, *Serratia* et *Pantoea*) questionne sur une possible contamination. Cependant, ces genres ont précédemment été isolés en tant qu'endophytes et ont montré des bénéfices au développement de plantes.<sup>284,285,286,287</sup> Par exemple, *Pantoea agglomerans* E325 a été utilisé en tant qu'agent de biocontrôle contre le feu bactérien, maladie des poiriers et pommiers causée par la bactérie phytopathogène *Erwinia amylovora*.<sup>288</sup>

La souche *Stenotrophomonas maltophilia* a souvent été isolée dans et sur des plantes, et sa présence a montré induire une production d'antibiotiques et la mise en place de mécanismes permettant la protection et le développement de leurs hôtes.<sup>289,290,291</sup>

<sup>279</sup> Choudhary D. K., Johri B. N., Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* **2009**, *164*, p. 493–513.

<sup>280</sup> Depoorter E., Bull M. J., et al., *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, p. 5215–5229.

<sup>281</sup> Miotto-Vilanova L., Jacquard C., et al., *Burkholderia phytofirmans* PsJN confers grapevine resistance against *Botrytis cinerea* via a direct antimicrobial effect combined with a better resource mobilization. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, p. 1236.

<sup>282</sup> Pinedo I., Ledger T., et al., *Burkholderia phytofirmans* PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in *Arabidopsis thaliana* salt tolerance. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, p. 466.

<sup>283</sup> Kämpfer P., Lodders N., et al., *Luteibacter anthropi* sp. nov., isolated from human blood, and reclassification of *Dyella yeojuensis* Kim et al. 2006 as *Luteibacter yeojuensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, p. 2884–2887.

<sup>284</sup> Naveed M., Mitter B., et al., The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biol. Fertil. Soils* **2014**, *50*, p. 249–262.

<sup>285</sup> Sandhiya G. S., Sugitha T. C. K., et al., Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *Indian J. Exp. Biol.* **2005**, *43*, p. 802–807.

<sup>286</sup> Quecine M. C., Araújo W. L., et al., Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, p. 7511–7518.

<sup>287</sup> Dutkiewicz J., Mackiewicz B., et al., *Pantoea agglomerans* : a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Ann Agric Environ Med.* **2016**, *23*, p. 206–222.

<sup>288</sup> Kim I.-Y., Pusey P. L., et al., Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, p. 109–115.

<sup>289</sup> Nakayama T., Homma Y., et al., Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, p. 4334–4339.

<sup>290</sup> Zhang Z., Yuen G. Y., et al., Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology* **2001**, *91*, p. 204–211.

<sup>291</sup> Messiha N. A. S., van Diepeningen A. D., et al., *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *Eur. J. Plant Pathol.* **2007**, *118*, p. 211–225.

### 4.3.2. Diversité des genres fongiques

Nous pouvons rapidement constater que la diversité fongique est plus importante que la diversité bactérienne dans notre communauté d'endophytes isolés. Ce résultat peut être expliqué par l'utilisation d'un milieu nutritif Potato Dextrose Agar (PDA) pour l'isolement des endophytes, plus adéquate à la culture des champignons que des bactéries.

Les 128 endophytes fongiques identifiés se répartissent en quatre classes de deux divisions (Ascomycota et Basidiomycota). La classe prédominante est celle des Sordariomycetes (74% des isolats), suivi des Dothideomycetes (16% des isolats), des Agaricomycetes (6% des isolats) et des Eurotiomycetes (4% des isolats) (Figure IV. 15).

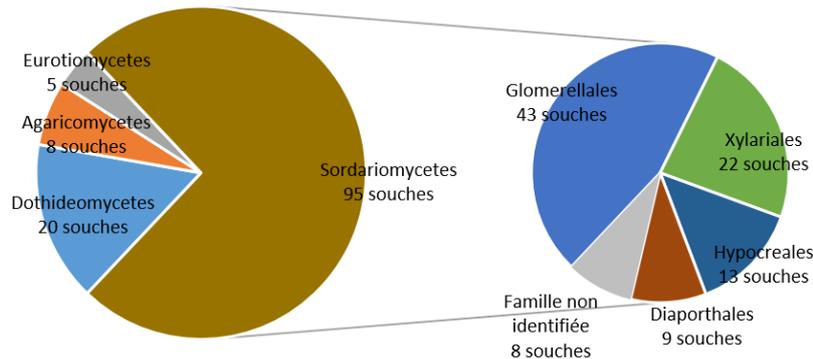


Figure IV. 15. Répartition des endophytes isolés suivant leur appartenance à différents taxons.

La division Glomeromycota, regroupant des micro-organismes spécifiques de la rhizosphère, n'est pas représentée dans notre communauté étant donné que nous travaillons sur des endophytes de feuilles.<sup>56</sup> Hardoim *et al.* ont montré chez les Ascomycota une prédominance de la classe des Dothideomycetes devant les Sordariomycetes alors que la très grande majorité de nos endophytes proviennent de la classe des Sordariomycetes (Figure IV. 15). En accord avec leur étude, la classe Eurotiomycetes est bien retrouvée comme une classe minoritaire des Ascomycota et la classe Agaricomycetes est bien majoritaire de la division Basidiomycota dans notre échantillonnage.<sup>56</sup>

La plupart des genres de notre communauté sont des genres classiquement retrouvés lors de l'isolement d'endophytes : *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium* (Sordariomycetes), *Endomelanconiopsis*, *Cladosporium*, *Ochroconis* (Dothideomycetes), *Aspergillus*, *Penicillium* (Eurotiomycetes), *Bjerkandera* et *Stereum* (Agaricomycetes).<sup>292</sup> De nombreuses études chimiques ont été menées sur des extraits d'isolats de ces genres, et des métabolites secondaires possédant des activités biologiques ont été précédemment isolés et identifiés.

Dans notre communauté, la classe des Sordariomycetes semble être la plus diversifiée. Vingt-cinq souches de cette classe n'ont pas pu être identifiées et semblent appartenir à de nouveaux genres. La famille des Xylariales semble être composée de beaucoup d'espèces différentes souvent représentées par un seul isolat. Le genre *Oxydothis* (BSNB-0720) a précédemment été isolé de monocotylédone.<sup>293,294</sup> Fröhlich et Hyde suggèrent qu'*Oxydothis* est le genre le plus couramment retrouvé sur les palmiers.<sup>293</sup> Cependant, il n'a été isolé qu'une seule fois dans notre étude. Les Hypocreales sont représentés dans notre communauté par les genres *Fusarium* et *Akanthomyces*.

<sup>292</sup> Martin R., Gazis R., *et al.*, Unexpected diversity of basidiomycetous endophytes in sapwood and leaves of *Hevea*. *Mycologia* **2015**, *107*, p. 284-297.

<sup>293</sup> Fröhlich J., Hyde K. D., New *Oxydothis* species associated with palm leaf spots in north Queensland, Australia. *Mycol. Res.* **1994**, *98*, p. 213-218.

<sup>294</sup> Shenoy B. D., Jeewon R., *et al.*, *Oxydothis bambusicola*, a new Ascomycete with a huge subapical ascus ring found on bamboo in Hong Kong. *Nova Hedwigia* **2005**, *80*, p. 511-518.

Cet ordre regroupe beaucoup d'espèces pathogènes de plantes et d'insectes. Le genre *Akanthomyces* a été majoritairement isolé comme entomopathogène de Lepidoptera mais aussi comme endophyte.<sup>295</sup> La famille des Glomerellales est quant à elle la plus représentée dans notre échantillonnage avec quarante-deux isolats mais appartenant au seul genre *Colletotrichum*.

#### 4.3.3. Diversité des endophytes suivant les spécimens *A. sciophilum* récolté

Les communautés cultivables d'endophytes peuvent être comparées suivant le spécimen *A. sciophilum* récolté, noté A1 à A6 (Figure IV. 16). Certains genres ne sont retrouvés que sur un spécimen : *Clonostachys* et *Stereum* (A1), *Ochroconis* et *Caballeronia* (A3), *Aspergillus*, *Muscodor* et *Paenibacillus* (A4), *Serratia* (A5), *Akanthomyces*, *Cryphonectriaceae*, *Oxydothis*, *Luteibacter* et *Stenotrophomonas* (A6). Tous ces genres sont retrouvés en très peu d'isolats dans notre communauté.

Le genre prédominant est *Colletotrichum* et a été retrouvé sur chaque spécimen. La récolte sur le spécimen A6 n'a permis l'isolement que d'un *Colletotrichum* sp. alors que plusieurs isolats ont été retrouvés sur les autres spécimens.

Les autres genres fongiques (*Cladosporium*, *Diaporthe*, *Endomelanconiopsis*, *Fusarium* et *Penicillium*), les souches non identifiées de la classe des Sordariomycetes ainsi que la plupart des genres bactériens se répartissent de manière aléatoire sur les spécimens d'*A. sciophilum*.

Le spécimen A6 est le seul palmier à présenter une communauté d'endophyte un peu différente, notamment sur les genres majoritaires : seulement un isolat de *Colletotrichum* y a été isolé mais aucune *Paraburkholderia* alors que c'est le genre bactérien prédominant de tous les autres spécimens.

#### 4.3.1. Diversité des endophytes suivant l'âge des feuilles

Etant donné que l'isolement des endophytes s'est fait sur trois types de feuilles (feuille fermée, feuilles jeunes et feuilles vieilles), les différences de communauté suivant l'âge de ces feuilles peuvent également être analysées (Figure IV. 17). Il serait ainsi intéressant de voir si certains genres se détachent et se retrouvent spécifiquement sur des feuilles vieilles. De telles souches pourrait indiquer une compétitivité et une capacité à se défendre au sein de la feuille contre d'autres micro-organismes rejoignant le postulat de départ du projet SECIL (Partie 3.2 p.59).

Quelques genres spécifiques à l'âge des feuilles ont été identifiés mais là encore ne concernent que des genres isolés minoritairement : *Ochroconis* et *Paenibacillus* (feuilles fermées), *Cryphonectriaceae*, *Muscodor*, *Oxydothis* et *Luteibacter* (feuilles jeunes), *Akanthomyces*, *Aspergillus* et *Clonostachys* (feuilles vieilles).

Les genres isolés en plus grande quantité se retrouvent dans chaque type de feuille, hormis le genre *Diaporthe* qui n'a jamais été isolé de feuilles âgées. Le genre *Stereum* spécifique au spécimen A1 est le seul genre retrouvé à tous les âges de feuilles au sein d'un même spécimen.

Aucune tendance taxonomique ne se détache clairement suivant les spécimens récoltés ou l'âge de feuilles dans cette communauté. De manière générale, la diversité fongique est plus importante sur les feuilles jeunes et vieilles et diminue au sein des feuilles fermées.

---

<sup>295</sup> Vinit K., Doilom M., et al., Phylogenetic placement of *Akanthomyces muscarius*, a new endophyte record from *Nypa fruticans* in Thailand. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* **2018**, 8, p. 404–417.



Figure IV. 16. Répartition des genres endophytiques retrouvés suivant les spécimens *A. sciophilum* prélevés. Les portions de couleurs unies correspondent à des genres fongiques et les portions striées à des genres bactériens.

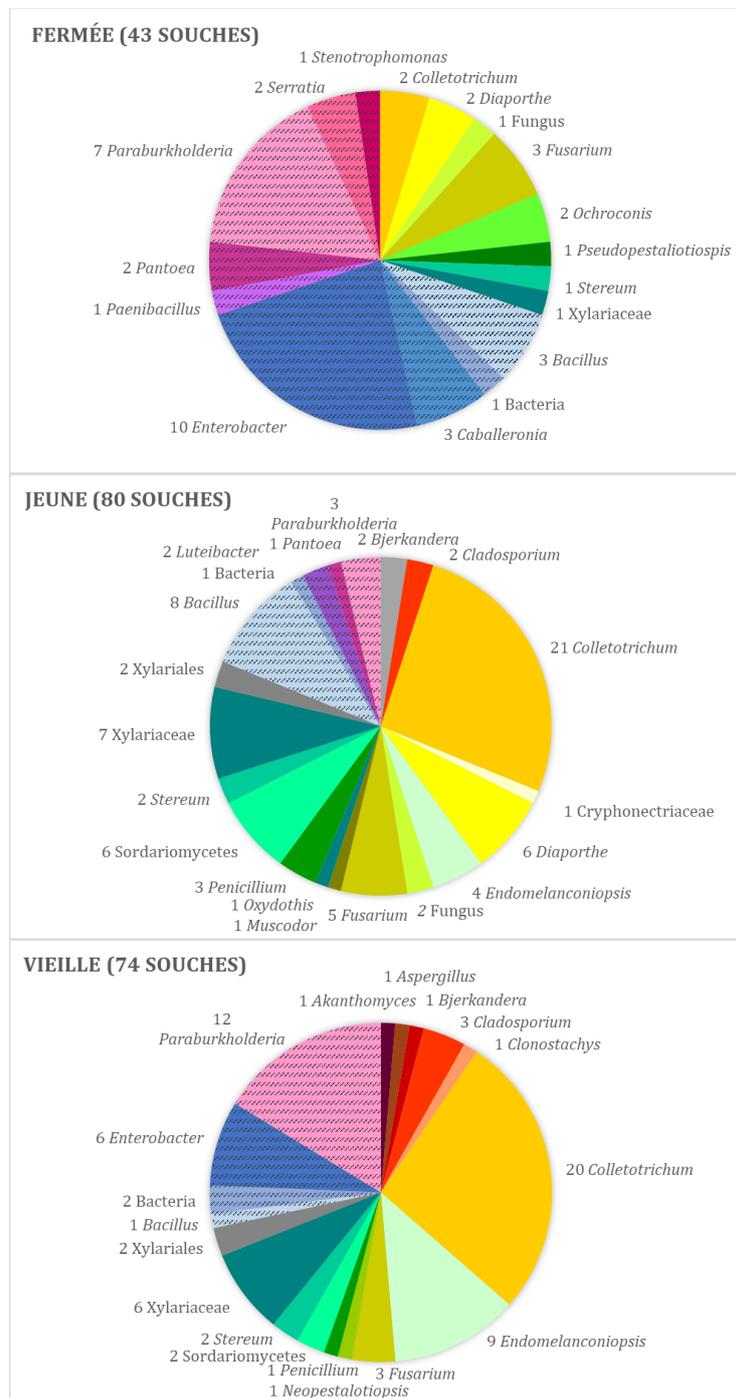


Figure IV. 17. Répartition des genres endophytiques retrouvés suivant le type de feuilles prélevées. Les portions de couleurs unies correspondent à des genres fongiques et les portions striées à des genres bactériens.

#### 4.4. Conclusion

La récolte de folioles de six spécimens d'*Astrocaryum sciophilum* a permis l'isolement de 131 champignons et 66 bactéries endophytes. Par le séquençage des régions génomique ITS et 16S, 132 souches endophytiques ont été identifiées au genre ou à l'espèce. Les genres identifiés se retrouvent classiquement lors de l'isolement d'endophytes d'après les données de la littérature. En revanche, 59 souches fongiques n'ont pas pu être identifiées dans des genres connus : soit ces souches formaient des clades distincts et méconnus lors de l'établissement d'arbres phylogénétiques, soit le séquençage de la seule région ITS ne permet pas l'identification claire du genre. Ces souches sont alors identifiées au niveau d'un taxon supérieur.

Concernant les souches cultivables, il n'y a apparemment pas de différences significatives de communauté d'endophytes entre les six spécimens d'*A. sciophilum* ou des feuilles d'âges différents. La classe Sordariomycetes est la plus représentée avec beaucoup de diversité. Il ne semble pas y avoir de sélection de certaines lignées au cours du temps et donc pas de colonisation spécifique. Le spécimen A6 d'*A. sciophilum* renferme une communauté d'endophyte isolée un peu différente par l'absence des genres *Colletotrichum* et *Paraburkholderia* majoritairement retrouvés dans les communautés des autres spécimens.

Ces résultats obtenus sur les souches cultivables d'*A. sciophilum* se retrouvent également sur l'ensemble de la communauté endophytique. Lors de leurs études, Donald *et al.* ont analysé par séquençage de nouvelle-génération, des fragments de folioles stérilisés en surface d'*A. sciophilum* issus d'une précédente récolte.<sup>296</sup> Plus de 1000 OTUs (Unité Taxonomique Opérationnelle) ont ainsi pu être obtenus par le metabarcoding des champignons et bactéries présents dans les feuilles. Ils ont ainsi pu montrer que les communautés endophytiques dans les feuilles d'*Astrocaryum* ne semblent pas structurées par des phénomènes de compétition. Malgré la grande diversité taxonomique observée, l'analyse de co-occurrence ne montre pas de patrons d'exclusion entre les OTUs. Cette absence d'effet de compétition est surprenante aux premiers abords compte tenu du nombre d'espèces différentes retrouvées dans un habitat limité en termes de place et de ressources. Néanmoins, cette observation rejoint celle de Jakuschkin *et al.* qui ont montré que la communauté d'endophytes au sein des feuilles de chênes partagent majoritairement des interactions mutualistes ou commensalistes.<sup>297</sup> Les endophytes seraient adaptés à une coexistence ensemble au sein des plantes afin de promouvoir ensemble la croissance et la défense de la plante-hôte face aux différents stress. Une compétition rude au sein des feuilles très jeunes a pu s'occasionner au moment de la colonisation initiale et l'établissement de la communauté, ce qui serait une hypothèse afin d'expliquer l'observation de cette absence de compétition sur le long terme.

---

<sup>296</sup> Donald J., Barthélemy M., *et al.*, Tropical palm endophytes exhibit low competitive structuring when assessed using co-occurrence and antipathogen activity analysis. *Front. For. Glob. Change* **2019**, soumis.

<sup>297</sup> Jakuschkin B., Fievet V., *et al.*, Deciphering the pathobiome: intra- and interkingdom interactions involving the pathogen erysiphe althitoides. *Microb. Ecol.* **2016**, 72, p. 870–880.

## V. Criblage biologique des micro-organismes

### 5.1. Cibles biologiques

Plusieurs cibles biologiques ont été choisies dans le cadre de cette thèse. Le projet ANR SECIL a notamment été orienté dans un objectif de valorisation de molécules pour la santé publique. Pour cela, il a été convenu que l'activité biologique des extraits des endophytes isolés d'*Astrocaryum sciophilum* serait ciblée contre le staphylocoque doré, *Staphylococcus aureus*. À cette fin, l'activité antimicrobienne de chaque extrait a été mesurée sur la souche résistante à la méticilline (SARM) ainsi que leur activité quorum quenching sur la souche *S. aureus* sensible. Suite à ces résultats, l'activité antifongique de ces extraits a également été mesurée contre le pathogène humain *Trichophyton rubrum*. De plus, afin de comprendre le rôle écologique putatif des endophytes dans ces palmiers, l'activité de ces souches a été évaluée *in vitro* contre le phytopathogène *Fusarium oxysporum*.

#### 5.1.1. Pathogènes humains

##### 5.1.1.1. Bactérie - *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est une bactérie coque (Gram positif) ubiquitaire de la peau, des muqueuses et de la sphère rhinopharyngée chez l'Homme. On estime que 30 à 50% de la population sont porteurs sains du staphylocoque.<sup>298</sup> Décrite pour la première fois par Louis Pasteur en 1880, elle entraîne des infections avec des degrés de gravité variable lors d'une brèche de la surface épithéliale allant de l'infection cutanée à la septicémie. Son pouvoir pathogène est dû à la sécrétion d'enzymes et de toxines. Les enzymes agissent notamment contre les leucocytes, responsables de la réponse immunitaire face aux infections.<sup>299</sup> Cette bactérie peut également être responsable d'intoxications alimentaires. Premier germe responsable d'infections nosocomiales, elle est aujourd'hui une menace élevée pour la santé publique. L'antibiothérapie est le traitement de prédilection pour lutter contre sa virulence cependant l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques (méticilline et/ou vancomycine) laisse entrevoir une impasse thérapeutique.<sup>300</sup>

##### 5.1.1.2. Champignon - *Trichophyton rubrum*

*Trichophyton rubrum* est un champignon filamenteux dermatophyte, principalement responsable de dermatophytose des pieds (pieds d'athlète) et des ongles (onychomycose). Il excrète des protéases capables de dégrader la kératine.<sup>301</sup> *T. rubrum* a montré sa capacité à moduler l'expression de ces gènes impliqués dans divers procédés (transport de protéine, métabolisme lipidique, stress oxydatif, modifications post-traductionnelles) lors d'une exposition à des médicaments.<sup>302,303,304</sup> Ainsi, l'exposition répétée de la souche à des antifongiques *in vitro* a abouti à la sélection de résistance.<sup>305</sup>

<sup>298</sup> 'Staphylocoque', consulté sur <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>, 2016.

<sup>299</sup> Otto M., *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, 0, p. 32–37.

<sup>300</sup> Dumitrescu O., Dauwalder O., *et al.*, Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* - Les points-clés en 2010. *Med. Sci.* **2010**, 26, p. 943–949.

<sup>301</sup> Asahi M., Lindquist R., *et al.*, Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.* **1985**, 232, p. 139–144.

<sup>302</sup> Paião F. G., Segato F., *et al.*, Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 271, p. 180–186.

<sup>303</sup> Mendes N. S., Bitencourt T. A., *et al.*, Transcriptome-wide survey of gene expression changes and alternative splicing in *Trichophyton rubrum* in response to undecanoic acid. *Sci. Rep.* **2018**, 8, p. 2520.

<sup>304</sup> Persinoti G. F., de Aguiar Peres N. T., *et al.*, RNA-sequencing analysis of *Trichophyton rubrum* transcriptome in response to sublethal doses of acriflavine. *BMC Genomics* **2014**, 15, p. S1.

<sup>305</sup> Ghelardi E., Celandroni F., *et al.*, Potential of Ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58, p. 2825–2829.

### 5.1.2. Le champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum*

Nous avons décidé de cribler l'ensemble des micro-organismes de notre communauté contre le phytopathogène *Fusarium oxysporum*. Ce champignon, largement répandu dans les sols, engendre une fusariose vasculaire lors de l'infection par les racines.<sup>306</sup> Il a développé de nombreuses *formae speciales*. Ces *formae speciales* indiquent la spécialisation du champignon envers l'espèce ou le cultivar de la plante qu'il peut infecter.<sup>307</sup>

La forme la plus connue et la plus redoutée en agronomie est *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (FOC) causant la fusariose appelée maladie de Panama.<sup>308</sup> Cette maladie provoque une perte importante de cultivars de bananiers. L'inquiétude augmente face au développement de cette maladie et à sa diffusion. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* est classé en quatre races physiologiques selon leur virulence envers les différents cultivars de banane : FOC1, FOC2, FOC3 et FOC4.<sup>308</sup> FOC1 est responsable de l'effondrement mondial de l'exploitation des cultivars « Gros Michel ». En effet, avant 1960, ce cultivar était dominant et participait majoritairement à l'exportation de banane. L'utilisation accidentelle de rhizomes infectés en Amérique du sud pour la plantation de nouvelles cultures a disséminé de manière mondiale ce champignon. En conséquence, le cultivar « Cavendish » résistant à FOC1 a remplacé les cultivars « Gros Michel ». Mais l'apparition du variant TR4 du phytopathogène met à mal les cultures actuelles avec des pertes entre 20 et 40% des récoltes en Chine. La dissémination de ce champignon sous les tropiques de l'Ouest est particulièrement surveillée afin d'éviter de nouveau la chute de l'industrie bananière, d'autant plus qu'il n'y a actuellement pas de remplaçant acceptable aux cultivars « Cavendish ».<sup>308</sup>

106 autres *formae speciales* de ce champignon ont été caractérisées, beaucoup s'attaquant à des cultures maraichères comme le coton (f.sp. *vasinfectum*), le soja (f.sp. *glycines*), la tomate (f.sp. *lycopersici*), le melon (f.sp. *niveum*), les épinards (f.sp. *betae*) ... Outre le bananier, ce phytopathogène peut s'attaquer à différentes espèces de palmiers : le palmier à huile (f.sp. *elaeidis*), le dattier (f.sp. *albedinis*) ainsi que des espèces décoratives (f.sp. *canariensis* et *palmarum*).<sup>309</sup>

Une fois l'infection initiée, il est difficile de lutter contre ce pathogène. En effet, la contamination des sols par *F. oxysporum* implique un traitement radical afin d'éviter sa dissémination. Le plus souvent un traitement chimique est effectué, pouvant rendre la terre stérile et non cultivable pendant plusieurs saisons.<sup>310,311,312</sup>

Face à ces infections, des études de biocontrôle de *F. oxysporum* ont été réalisées montrant l'impact bénéfique que peuvent avoir les micro-organismes environnementaux pour la défense de la plante contre ce phytopathogène.<sup>313</sup> Lian Jie *et al.* suggèrent le rôle prépondérant de la communauté endophytique pour aider des plants de banane à lutter contre le phytopathogène.<sup>314</sup>

<sup>306</sup> Fourie G., Steenkamp E. T., *et al.*, Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect. Genet. Evol.* **2011**, *11*, p. 533–542.

<sup>307</sup> Armstrong G. M., Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilts of the Cucurbitaceae. *Phytopathology* **1978**, *68*, p. 19.

<sup>308</sup> Ploetz R. C., Panama disease: a classic and destructive disease of banana. *Plant Health Prog.* **2000**, *1*, p. 10.

<sup>309</sup> Edel-Hermann V., Lecomte C., Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology* **2018**, *109*, p. 512–530.

<sup>310</sup> Nel B., Steinberg C., *et al.*, Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Prot.* **2007**, *26*, p. 697–705.

<sup>311</sup> Bennett R. S., Spurgeon D. W., *et al.*, Efficacy of four soil treatments against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 on cotton. *Plant Dis.* **2011**, *95*, p. 967–976.

<sup>312</sup> Amini J., Sidovich D., The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *J. Plant Prot. Res.* **2010**, *50*, p. 172–178.

<sup>313</sup> Cao L., Qiu Z., *et al.*, Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *247*, p. 147–152.

<sup>314</sup> Jie L., Zifeng W., *et al.*, Artificial inoculation of banana tissue culture plantlets with indigenous endophytes originally derived from native banana plants. *Biol. Control* **2009**, *51*, p. 427–434.

Par conséquent, nous avons souhaité étudier le rôle des endophytes d'*A. sciophilum* contre ce phytopathogène.

## 5.2. Essais biologiques

### 5.2.1. Culture et extraction des métabolites secondaires

Chaque micro-organisme endophyte a été cultivé sur milieu solide puis le métabolome a été extrait à l'acétate d'éthyle (AcOEt) (Partie 10.3 p.188). *In fine*, 197 extraits ont été produits afin d'être criblés pour leur activité antimicrobienne et quorum quenching.

### 5.2.2. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée par mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Par dilution successive, ces essais permettent de mettre en contact le pathogène à une gamme de concentration de l'extrait à tester (entre 256 et 8 µg/mL). La plus faible concentration permettant d'inhiber la pousse du pathogène est déterminée comme étant la CMI de l'extrait brut.

Chaque extrait a été testé sur la souche pathogène *S. aureus* résistant à la méticilline (ATCC29213) ainsi que sur un isolat clinique de *Trichophyton rubrum* (SNB-CN1) fourni par Philippe Loiseau (Université Paris Sud, Châtenay-Malabry).

### 5.2.3. Activité quorum quenching

L'activité quorum quenching des extraits a été évaluée sur différents biosenseurs grâce aux collaborations au sein du projet ANR SECIL.

L'Unité de Microbiologie de l'Université de Genève a mis au point un test d'activité permettant de mesurer l'activité QQ contre *S. aureus* par injection d'un plasmide dans la souche (Figure V. 1). Ce plasmide contient le gène *pyrFE* contrôlé par le promoteur P2 (Partie 1.3.6 p.33). Chez *S. aureus*, le promoteur P2 contrôle l'expression des gènes *agr* de son quorum sensing. L'activation du quorum sensing implique alors l'expression de *pyrFE*, produisant une protéine. En présence d'acide 5-fluoroorotique (5-FOA), cette protéine la transforme en 5-fluorouridine monophosphate (5-fluoro-UMP), molécule toxique entraînant la mort cellulaire.<sup>315</sup> En mesurant la viabilité cellulaire de cette souche en présence de nos extraits, leur activité QQ peut être ainsi évaluée.

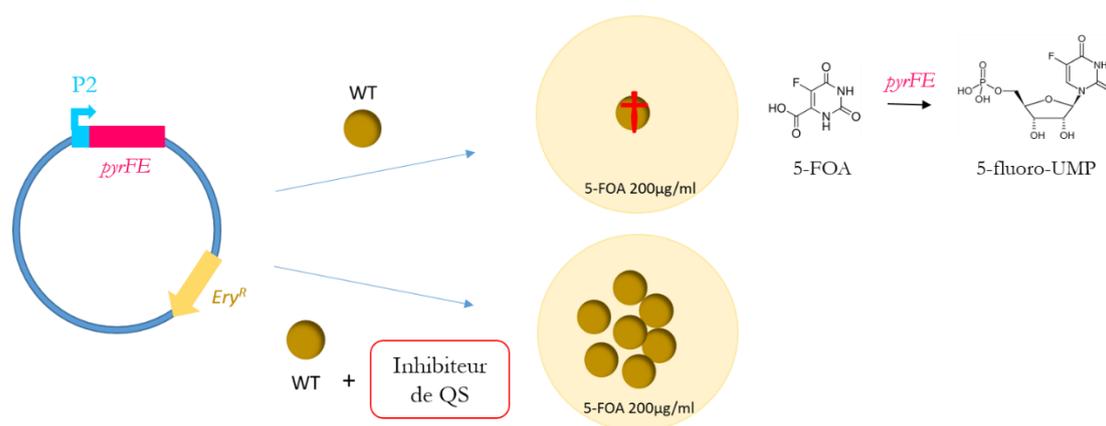


Figure V. 1. Principe de la mesure de l'activité quorum quenching de *S. aureus*. En présence d'un extrait possédant une activité QQ, il n'y a pas de diminution cellulaire de *S. aureus* car l'activation du gène *pyrFE* n'est pas réalisée. ©Sara Leoni

<sup>315</sup> Redder P., Linder P., New range of vectors with a stringent 5-fluoroorotic acid-based counterselection system for generating mutants by allelic replacement in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, p. 3846–3854.

En complément de ces résultats sur *S. aureus*, le laboratoire LBBM à Banyuls/Mer a testé les extraits sur les biosenseurs *Chromobacterium violaceum* CV026, *Pseudomonas putida* F117 et *Escherichia coli* MT102. *Chromobacterium violaceum* est une bactérie dont le quorum sensing est médié par des acylhomosérine lactones (AHL) provoquant la production du pigment violacéine.<sup>316</sup> Afin de mesurer l'activité QQ d'un extrait, le halo d'inhibition de la production de violacéine est mesuré par bioluminescence (Figure V. 2). La viabilité bactérienne en présence de l'extrait peut aussi être observée suivant l'aspect du tapis cellulaire sur la gélose.



Figure V. 2. Exemple d'halo d'inhibition du quorum sensing chez *Chromobacterium violaceum* CV026.

*Pseudomonas putida* F117 et *Escherichia coli* MT102 sont des souches possédant un plasmide contenant le gène codant pour la protéine GFP (Green Fluorescent Protein). Ce gène est sous la dépendance d'un promoteur témoignant de l'activité quorum sensing de la souche (le gène *lasB* du système *las* chez *P. putida* et *luxR* permettant la régulation de l'opéron *lux* pour *E. coli* MT102) (Figure V. 3).<sup>317,318</sup> Concrètement, une fluorescence est détectée lorsque le quorum sensing de la souche est activé.<sup>319</sup> Cette fluorescence est diminuée en présence d'un extrait possédant une activité QQ. La viabilité des biosenseurs a été évaluée par bioluminescence en évaluant la quantité d'ATP dans les cultures.

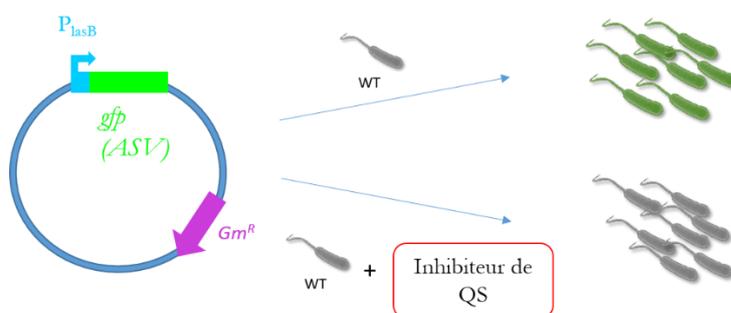


Figure V. 3. Principe de la mesure de l'activité quorum quenching chez le biosenseur *P. putida* F117. Lorsque la concentration en auto-inducteur (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) atteint le seuil critique, une molécule d'AHL se lie à deux protéines LasR, codé par le gène *lasR*. Ce complexe agit comme activateur transcriptionnel de nombreux gènes, notamment *lasB*.<sup>320</sup> Ce dernier active le gène *gfp* intégré dans le plasmide, et provoque la fluorescence de la souche. ©Sara Leoni

<sup>316</sup> McClean K. H., Winson M. K., *et al.*, Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **1997**, *143*, p. 3703–3711.

<sup>317</sup> Ruimy R., Andremont A., Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation* **2004**, *13*, p. 176–184.

<sup>318</sup> Andersen J. B., Heydorn A., *et al.*, GFP-based *N*-acylhomoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, p. 575–585.

<sup>319</sup> Steidle A., Allesen-Holm M., *et al.*, Identification and characterization of an *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, p. 6371–6382.

<sup>320</sup> Lee J., Zhang L., The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **2015**, *6*, p. 26–41.

#### 5.2.4. Activité cytotoxique

La cytotoxicité à 10 µg/mL des extraits possédant une activité antimicrobienne a été évaluée sur la lignée cellulaire MRC-5 (cellules saines de poumon fœtal). Ce test a été réalisé dans le but d'obtenir des indices de sélectivité nous permettant de cibler préférentiellement l'étude des extraits présentant uniquement une activité antimicrobienne ou une activité QQ.

### 5.3. Résultats du criblage et discussion

Pour chaque extrait, l'ensemble des résultats d'activité est disponible en Annexe S1.

#### 5.3.1. Activité antimicrobienne sur pathogènes humains

Nous avons considéré qu'un extrait présente une activité antimicrobienne lorsque la CMI contre un pathogène est inférieure ou égale à 64 µg/mL. Ainsi, une activité antibactérienne sur SARM a été mise en évidence pour sept extraits (Tableau V. 1). Ces extraits actifs proviennent de souches de *Fusarium polyphialidicum* (BSNB-0575, -0651) avec une CMI de 32 µg/mL, *Fusarium decemcellulare* (BSNB-0303) avec une CMI de 16 µg/mL, des deux souches de *Luteibacter* (BSNB-0719, -0721) avec des CMIs respectivement de 32 et 64 µg/mL, d'une souche du genre *Bacillus* (BSNB-0730) avec une CMI de 64 µg/mL et de la souche du genre *Akanthomyces* (BSNB-0732) avec une CMI < 8 µg/mL.

Trente-deux extraits ont montré une activité antifongique sur *T. rubrum*. Quatre de ces extraits sont issus de souches bactériennes du genre *Paraburkholderia* (BSNB-0521, -0562, -0563, -0564) avec des CMIs entre 32 et 64 µg/mL, cinq du genre *Bacillus* (BSNB-0561, -0568, -0712, -0716 et -0730), deux du genre *Luteibacter* (BSNB-0719 et BSNB-0721) et deux du genre *Enterobacter* (BSNB-0724 et BSNB-0726). Les dix-neuf autres sont issus de souches fongiques : une du genre *Stereum* (BSNB-0532) avec une CMI de 64 µg/mL, cinq souches *Endomelanconiopsis freycinetiae* (BSNB-0528, -0680, -0681, -0692 et -0731) avec des CMIs entre 32 et 64 µg/mL, six souches du genre *Colletotrichum* (BSNB-1019, -0615, -0637, -0641 et -0652) avec des CMIs entre 16 et 64 µg/mL, deux Xylariaceae (BSNB-0586 et -0689) avec des CMIs respectivement de 64 et 16 µg/mL, trois souches *Bjerkandera adusta* (BSNB-0624), *Cladosporium* sp. (BSNB-0638) et *Fusarium avenaceum* (BSNB-0686) avec des CMIs de 64 µg/mL, la souche *Akanthomyces* sp. (BSNB-0732) avec une CMI de 16 µg/mL et une souche non identifiée (BSNB-0722) présentant une CMI < 8 µg/mL.

L'analyse des résultats biologiques ne nous a pas permis de retrouver une activité spécifique à un genre. En effet, seulement sept *Colletotrichum* sp. de notre communauté sur quarante-trois présentent une activité antifongique. De même, seulement une souche de *Bacillus* sur les douze de notre communauté possède un extrait ayant montré une activité antibactérienne et trois une activité antifongique. Ce même résultat se retrouve avec les souches actives de *Paraburkholderia* et *Enterobacter*.

Tableau V. 1. Emplacement et taxonomie des endophytes dont l'extrait AcOEt montre une activité antimicrobienne

Code	Astrocaryum sciophilum		Proposed taxa (GenBank acc. N°)	CMI SARM (µg/mL)	CMI T. rubrum (µg/mL)	Cytotoxicité MRC-5 (% viabilité)
	N°	Feuille				
BSNB-0521	1	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643273)	> 256	64	67 ± 2
BSNB-0528	1	Jeune	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650407)	> 256	64	61 ± 4
BSNB-0532	1	Jeune	<i>Stereum</i> sp. (MK650354)	> 256	64	48 ± 3
BSNB-1019	1	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300789)	> 256	16	91 ± 1
BSNB-0561	2	fermé	<i>Bacillus</i> sp. (MK643294)	> 256	32	65 ± 4
BSNB-0562	2	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643323)	> 256	32	60 ± 1
BSNB-0563	2	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643324)	> 256	32	59 ± 2
BSNB-0564	2	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643325)	> 256	32	63 ± 2
BSNB-0568	2	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643322)	> 256	< 8	58 ± 2
BSNB-0575	2	Jeune	<i>Fusarium polyphialidicum</i> (MK279517)	32	> 256	20 ± 2
BSNB-0580	2	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300812)	256	64	3 ± 1
BSNB-0586	2	vieille	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650369)	> 256	64	5 ± 1
BSNB-0615	3	fermé	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300809)	> 256	16	23 ± 2
BSNB-0624	3	Jeune	<i>Bjerkandera adusta</i> (MK650370)	> 256	64	12 ± 1
BSNB-0637	3	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300797)	> 256	64	12 ± 1
BSNB-0638	3	vieille	<i>Cladosporium</i> sp. (MK650374)	> 256	64	15 ± 1
BSNB-0641	3	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300805)	> 256	64	9 ± 2
BSNB-0650	4	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300808)	> 256	64	7 ± 3
BSNB-0651	4	Jeune	<i>Fusarium polyphialidicum</i> (MK279518)	32	> 256	24 ± 3
BSNB-0652	4	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300791)	> 256	32	31 ± 1
BSNB-0680	5	Jeune	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650390)	> 256	64	35 ± 1
BSNB-0681	5	Jeune	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650386)	> 256	64	67 ± 3
BSNB-0686	5	Jeune	<i>Fusarium avenaceum</i> (MK650380)	> 256	64	73 ± 1
BSNB-0689	5	Jeune	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650338)	> 256	16	4 ± 1
BSNB-0692	5	vieille	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650388)	> 256	64	100 ± 1
BSNB-0712	6	fermé	<i>Bacillus</i> sp. (MK643316)	256	32	67 ± 4
BSNB-0303	6	fermé	<i>Fusarium decemcellulare</i> (MK279519)	16	256	15 ± 4
BSNB-0716	6	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643321)	> 256	64	71 ± 1
BSNB-0719	6	Jeune	<i>Luteibacter</i> sp. (MK279522)	32	16	104 ± 5
BSNB-0721	6	Jeune	<i>Luteibacter</i> sp. (MK643286)	64	32	102 ± 5
BSNB-0722	6	Jeune	ND	> 256	< 8	4 ± 1
BSNB-0724	6	vieille	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643308)	> 256	64	71 ± 1
BSNB-0726	6	vieille	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643313)	> 256	32	68 ± 4
BSNB-0730	6	vieille	<i>Bacillus</i> sp. (MK279521)	64	< 8	107 ± 4
BSNB-0731	6	vieille	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650387)	> 256	32	ND
BSNB-0732	6	vieille	<i>Akanthomyces</i> sp. (MK279520)	< 8	16	5 ± 1

ND : non déterminé

Nous observons également des variations d'activité entre des extraits issus de souches qui ont pourtant été identifiées génétiquement de la même espèce. Par exemple, les extraits de BSNB-0575 et BSNB-0651 possèdent une activité antibactérienne sur SARM avec une CMI à 32 µg/mL alors que les extraits des autres souches *Fusarium polyphialidicum* (BSNB-0581, -0647, -0690) présentent des CMI entre 128 et 256 µg/mL. Ces différences d'activité se retrouvent entre les extraits des trois souches identifiés *Fusarium decemcellulare* (BSNB-0301, -0302 et -0303), les extraits de *Fusarium avenaceum* (BSNB-0686, -0702) ou encore les extraits de *Bjerkandera adusta* (BSNB-0296, -0624 et BSNB-0660).

D'un point de vue global, nous ne retrouvons pas une communauté d'endophyte qui semble plus compétitive que les autres, que ce soit selon le spécimen *A. sciophilum* récolté ou selon l'âge des feuilles. Que les feuilles soient fermées, jeunes ou âgées, environ 15 à 20% des souches isolées possèdent un extrait AcOEt présentant une activité antimicrobienne (antifongique, antibactérienne ou les deux) (Figure V. 4). Seul les endophytes isolés du spécimen de palmier A6 semble présenter un pourcentage plus important d'extraits actifs (Figure V. 5).

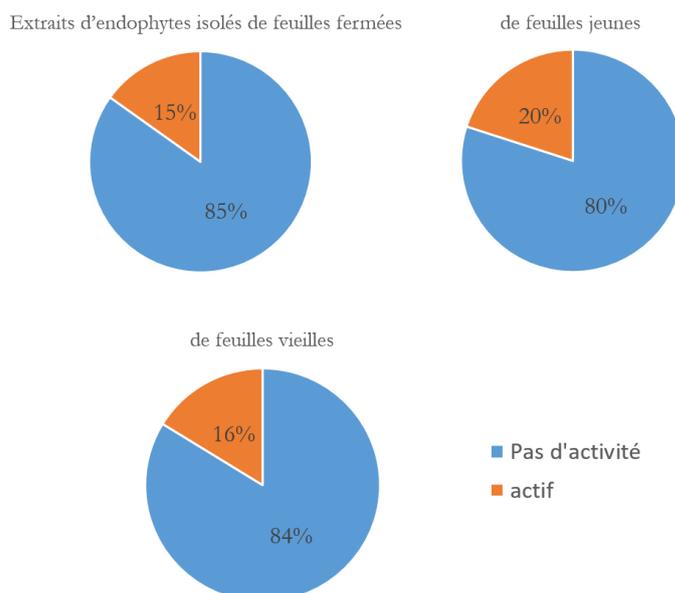


Figure V. 4. Pourcentage de souches dont l'extrait AcOEt montre une activité antimicrobienne suivant l'âge des feuilles.

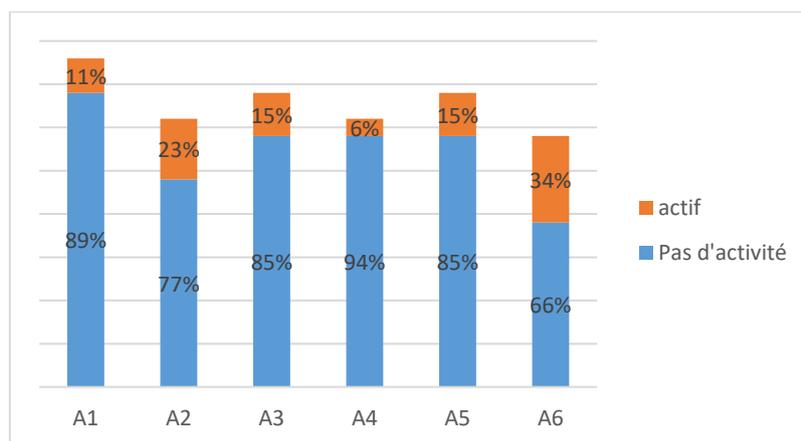


Figure V. 5. Pourcentage de souches dont l'extrait AcOEt montre une activité antimicrobienne suivant le spécimen *A. sciophilum* récolté.

### 5.3.2. Activité quorum quenching des extraits

Trois extraits testés à 128 µg/mL ont montré une activité QQ prometteuse sur *S. aureus* : BSNB-0658, BSNB-0519 et BSNB-0656. Ces trois souches appartiennent au genre *Paraburkholderia*. Ces extraits ont également montré une forte activité QQ sur CV026 et sur F117 avec néanmoins une possible toxicité sur cette souche (Annexe S15).

D'autres extraits présentent une activité QQ sur *S. aureus* plus modérée : BSNB-0664 (*Fusarium* sp.), BSNB-0627, BSNB-0641 et BSNB-0628 (*Colletotrichum* sp.), BSNB-0661 (*Paraburkholderia* sp.), BSNB-0300 (Xylariaceae sp.), BSNB-0295 (Sordariomycetes sp.), BSNB-0296 (*Bjerkadera adusta*) et BSNB-0517 (*Enterobacter* sp.). Certains de ces extraits montrent également une activité cytotoxique, antibactérienne ou QQ spécifique d'un biosenseur testé. Il est donc difficile de conclure de l'activité de ces extraits sur l'ensemble des cibles testées.

En revanche, sur les vingt extraits présentant une activité QQ sur CV026, onze sont issus de souches de *Paraburkholderia*. De manière générale, les extraits de ce genre semblent présenter une activité QQ plus ou moins prononcée suivant les biosenseurs.

L'extrait de BSNB-0732 (*Akanthomyces* sp.) présentent de très fortes activités antimicrobiennes ainsi qu'une importante toxicité sur les cellules MRC-5 et sur les biosenseurs MT102 et F117. Cet extrait doit être composé de molécules très toxiques et est écarté de potentielles études chimiques.

### 5.3.3. Activité des endophytes contre *F. oxysporum*

#### 5.3.3.1. Co-culture

Les essais ont été effectués sur deux souches de *Fusarium oxysporum* : *F. oxysporum* f.sp. *albedinis*, responsable du bayoud du dattier et *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, pathogène des plants de pois chiches. Afin de cribler l'activité antifongique des endophytes contre ces souches environnementales, des compétitions au sein de boîtes de Pétri ont été réalisées pour chaque endophyte sur les deux phytopathogènes. L'évolution de la compétition entre l'endophyte et le phytopathogène est observée jusqu'à cinq semaines de co-cultures à 28°C (Partie 10.1.9 p.187).

À l'issue de ces compétitions, il a été remarqué que l'activité de chaque endophyte est la même entre les deux *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* testées.

Pour les compétitions avec les champignons endophytes, quatre cas de figure ont été remarqués à l'issue de cinq semaines de culture :

- le phytopathogène pousse au-dessus du champignon endophyte,
- les deux champignons se développent jusqu'à entrer en contact,
- les deux champignons se développent jusqu'à entrer en contact et un changement de couleur s'effectue au niveau de cette zone d'interaction,
- l'endophyte inhibe la pousse du phytopathogène.

Deux endophytes fongiques inhibent ainsi la pousse de *F. oxysporum* (Figure V. 6): BSNB-0294 (*Xylariaceae* sp.) forme des halos d'inhibition de la pousse et BSNB-0299 (*Muscodor* sp.) l'empêche complètement de se développer.

Pour les compétitions avec les bactéries endophytes, deux cas de figure ont été observés à l'issue de cinq semaines de culture :

- le phytopathogène pousse au-dessus de la bactérie endophyte,
- la pousse du phytopathogène est inhibée par la bactérie.

Vingt-deux bactéries ont ainsi inhibé la pousse de *Fusarium oxysporum* (Figure V. 7) : BSNB-0519, -0521, -1020, -0560, -0561, -0562, -0563, -0564, -0572, -0618, -0626, -0630, -0632, -0634, -0635, -0636, -0639, -0640, -0656, -0658, -0661, -0663. Toutes ces bactéries appartiennent au genre *Paraburkholderia* hormis BSNB-0560 et -0634 qui n'ont pas pu être séquencées et BSNB-0561 et -0618 qui ont été identifiées comme *Bacillus* sp.



Figure V. 6. Co-culture à 5 semaines entre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* et BSNB-0294 (gauche) et entre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* et BSNB-0299 (droite).



Figure V. 7. Co-culture entre *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* et la souche *Paraburkholderia* sp. BSNB-0519.

### 5.3.3.2. Détection de composés organiques volatils antimicrobiens

La détection de COVs antimicrobiens est effectuée afin de vérifier si l'activité observée des endophytes contre *F. oxysporum* est due à leur présence. Pour cela, les souches sont ensemencées sur différentes boîtes de Pétri et placées face à face afin d'entraîner uniquement une diffusion par l'air (Partie 10.1.10 p.187).

Les deux champignons endophytes BSNB-0294 et BSNB-0299 ainsi que les vingt-deux bactéries précédemment identifiés pour leur activité contre *F. oxysporum* ont été criblés de cette façon. Seul le champignon BSNB-0299 (*Muscodor* sp.) possède une activité antifongique sur *F. oxysporum* par la production de COVs (Figure V. 8).

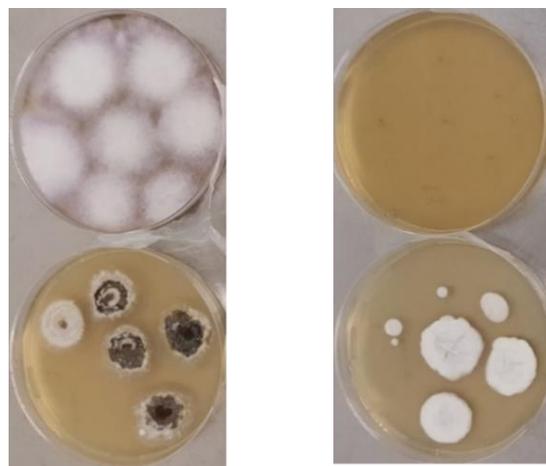


Figure V. 8. Pousse de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (en haut) face à l'endophyte BSNB-0294 (à gauche) et à l'endophyte BSNB-0299 (à droite).

#### 5.4. Conclusion : choix des souches d'intérêts

De manière générale, contrairement à notre postulat de départ, il n'a pas été mis en évidence la présence d'une communauté d'endophytes cultivables plus compétitive sur les feuilles âgées d'après l'isolement de ces souches et l'activité antimicrobienne de leur extrait. Les extraits présentant des activités antimicrobiennes proviennent aléatoirement de feuilles fermées, jeunes ou vieilles des six spécimens d'*A. sciophilum*. Seul le spécimen A6 présente une communauté légèrement plus compétitive : dix souches ont un extrait présentant une activité antifongique et/ou antibactérienne (CMI  $\leq$  64  $\mu\text{g/mL}$ ). De plus, ce spécimen de palmier semble présenter une communauté endophytique différente des autres spécimens (Partie 4.3.3 p.93).

La sélection des souches à étudier chimiquement a donc été effectuée en fonction de l'activité mesurée sur les différentes cibles de l'étude. De plus, nous avons pris en compte le résultat de différenciation des souches d'un même genre donné par leurs empreintes protéiques et lipidiques (Partie 4.2.2 p.80). Ces données peuvent expliquer la variation d'activité sur des souches identifiées identiques par le séquençage des régions ARNr 16S ou ITS. Par exemple, les extraits AcOEt des souches du genre *Paraburkholderia* ne présentent pas la même activité : sur vingt-deux, trois extraits (BSNB-0656, -0658 et -0661) montrent une activité QQ sur *S. aureus* et quatre autres (BSNB-0521, -0562, -0563 et -0564) une activité antifongique sur *T. rubrum*. Les empreintes protéiques de ces souches permettent de distinguer huit espèces/sous-espèces différentes qui coïncident avec ces différences d'activité entre les extraits. Ainsi les souches BSNB-0656, BSNB-0658 et BSNB-0661 ont été sélectionnées pour étudier l'effet QQ de leur extrait. (Partie VI p.107)

Concernant l'activité antibactérienne sur SARM, sept extraits présentent une CMI  $\leq$  64  $\mu\text{g/mL}$ . Parmi ces extraits, ceux issus de BSNB-0719, BSNB-0721 et BSNB-0730 possèdent également une activité antifongique sans cytotoxicité sur MRC-5. Les quatre autres extraits donnent une forte cytotoxicité sur MRC-5. La partie VII p.130 présente les données concernant les travaux sur ces extraits.

Vu le grand nombre de souches pouvant être étudiées, il est important de trouver des moyens de discriminer les micro-organismes intéressants dont la chimie n'a pas encore été exploitée. Le genre fongique *Colletotrichum* est le genre isolé majoritairement dans notre communauté. Pour autant, ces souches possèdent des extraits dont les activités cytotoxiques et antifongiques varient. L'établissement de réseaux moléculaires grâce aux données MS/MS de ces extraits va permettre la sélection de souches représentatives possédant une diversité chimique nouvelle. Ces travaux sur les extraits de *Colletotrichum* sont présentés en partie VIII p.140.

Deux souches fongiques Xylariaceae sp. (BSNB-0294) et *Muscodor* sp. (BSNB-0299) ainsi que les souches du genre *Paraburkholderia* montrent un contrôle biologique de *Fusarium oxysporum in vitro*. La partie IX p.156 présente l'étude chimique de Xylariaceae sp. (BSNB-0294) réalisée contre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*.

## VI. Etude des extraits de souches présentant une activité Quorum Quenching.

Quatre extraits à l'AcOEt de ces souches ont montré une activité QQ sur trois biosenseurs (*S. aureus*, *P. aeruginosa* F117 et *C. violaceum* CV026) : BSNB-0519, -0656, -0658 et -0661. De plus, les extraits de BSNB-0656 et BSNB-0658 montrent une activité QQ sur MT102. Ces extraits n'ont pas d'activité antibactérienne sur *S. aureus* et pas de cytotoxicité sur la lignée cellulaire MRC-5 (Annexe S15). Dans le cadre de la recherche de molécules naturelles à activité QQ, il a alors semblé intéressant d'étudier la chimie de ces souches. Ces souches sont identifiées génétiquement dans le genre *Paraburkholderia*.

Actuellement, le genre *Burkholderia* référence plus de 70 espèces, réparties en plusieurs clades selon les taxons retrouvés dans la phylogénie.<sup>321,322</sup> Le clade appelé *Burkholderia cepacia complex* (BCC) rassemble à la fois des souches pathogènes opportunistes retrouvées lors d'infections chez les animaux et chez des patients atteints de mucoviscidose, mais également des pathogènes de plantes.<sup>323</sup> En revanche, le clade nouvellement nommé *Paraburkholderia* abrite des souches environnementales, non pathogènes et retrouvées dans diverses niches écologiques.<sup>324</sup> Ce groupe est également décrit comme « plant-beneficial-environmental » (PBE) pour ces caractéristiques écologiques. En effet, *P. xenovorans* est connu pour entraîner la dégradation de composés toxiques comme les polychlorobiphényles.<sup>325</sup> D'autres espèces rhizosphériques ou endophytiques de ce genre, comme *P. phytofirmans* ou *P. tropica*, ont montré des effets bénéfiques sur le développement des plantes qu'ils occupent (elles sont nommées PGPB - Plant Growth Promoting Bacteria).<sup>326,327</sup> Outre leur potentiel d'aide au développement des plantes et de bioremédiation, les souches de *Burkholderia* sp. sont connues pour biosynthétiser des composés ayant des activités antifongiques.<sup>328,329</sup> Dans les années 90, différentes espèces de *Burkholderia* du clade des BCC ont été enregistrées comme agent de biocontrôle par l'Agence américaine de la Protection de l'Environnement (EPA) puis finalement retirées en 2004 compte tenu des risques infectieux de ces souches pour l'Homme.<sup>330</sup>

Notre communauté comprend vingt-deux souches du genre *Paraburkholderia* dont les extraits présentent des activités quorum quenching différentes. De nombreuses souches de *Paraburkholderia* dans cette communauté possède une activité QQ sur *Chromobacterium violaceum*.

<sup>321</sup> 'All names cited in the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: List M-R', consulté sur <http://www.bacterio.net/-allnamesmr.html>, 2019.

<sup>322</sup> Sawana A., Adeolu M., et al., Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* **2014**, 5, p. 429.

<sup>323</sup> Mahenthiralingam E., Baldwin A., et al., *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, 104, p. 1539–51.

<sup>324</sup> Coenye T., Vandamme P., Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* **2003**, 5, p. 719–729.

<sup>325</sup> Goris J., De Vos P., et al., Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, 54, p. 1677–1681.

<sup>326</sup> Esmaeel Q., Miotto L., et al., *Paraburkholderia phytofirmans* Psjn-plants interaction: from perception to the induced mechanisms. *Front. Microbiol.* **2018**, 9, p. 2093.

<sup>327</sup> Reis V. M., Estrada-de los Santos P., et al., *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, 54, p. 2155–2162.

<sup>328</sup> Schmidt S., Blom J. F., et al., Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Environ. Microbiol.* **2009**, 11, p. 1422–1437.

<sup>329</sup> Lin Z., Falkinham J. O., et al., Burkholderines from *Burkholderia ambifaria*: antifungal agents and possible virulence factors. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, p. 1518–1523.

<sup>330</sup> *Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food. Code of Federal Regulation.* **2004**.

### 6.1. Différentiation des souches du genre *Paraburkholderia*

Afin d'étudier biologiquement et chimiquement les endophytes de notre communauté du genre *Paraburkholderia*, nous avons cherché à relier la différence d'activité observée entre leur extrait à l'AcOEt (Annexe S15) et une potentielle variabilité en espèces/sous-espèces. D'après la phylogénie établie selon les séquences des régions 16S, nos vingt-deux souches se répartissent en au moins cinq espèces différentes : un clade est formé par les souches BSNB-0562, -0563, -0564 et -0565, un autre par BSNB-0648, -0635, -0640 et -0636, une branche sépare BSNB-0521, une autre BSNB-0545 et enfin le troisième clade est formé par les douze souches restantes comprenant notamment BSNB-0656, -0658 et -0661 (Annexe S4).

Les empreintes lipidiques de ces bactéries montrent uniquement des différences sur celles des souches BSNB-0521 et -0648 qui ont des spectres MALDI-TOF MS non similaires aux autres souches. Les empreintes lipidiques ne permettent pas d'améliorer la discrimination entre les souches de *Paraburkholderia*.

La comparaison de leur empreinte protéique établie une répartition en huit espèces/sous-espèces : chaque souche BSNB-0565, -0521, -0545 et -0648 possède une empreinte unique et constitue quatre espèces différentes, nous retrouvons un clade formé par BSNB-0562, -0564 et -0563, un second clade formé par BSNB-0635, -0636 et -0640, un troisième formé de BSNB-0656, -0658 et -0661 et un dernier clade où les souches restantes possèdent la même empreinte. Nous avons réparti ces souches en huit espèces nommées de *Paraburkholderia* sp.1 à sp.8 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

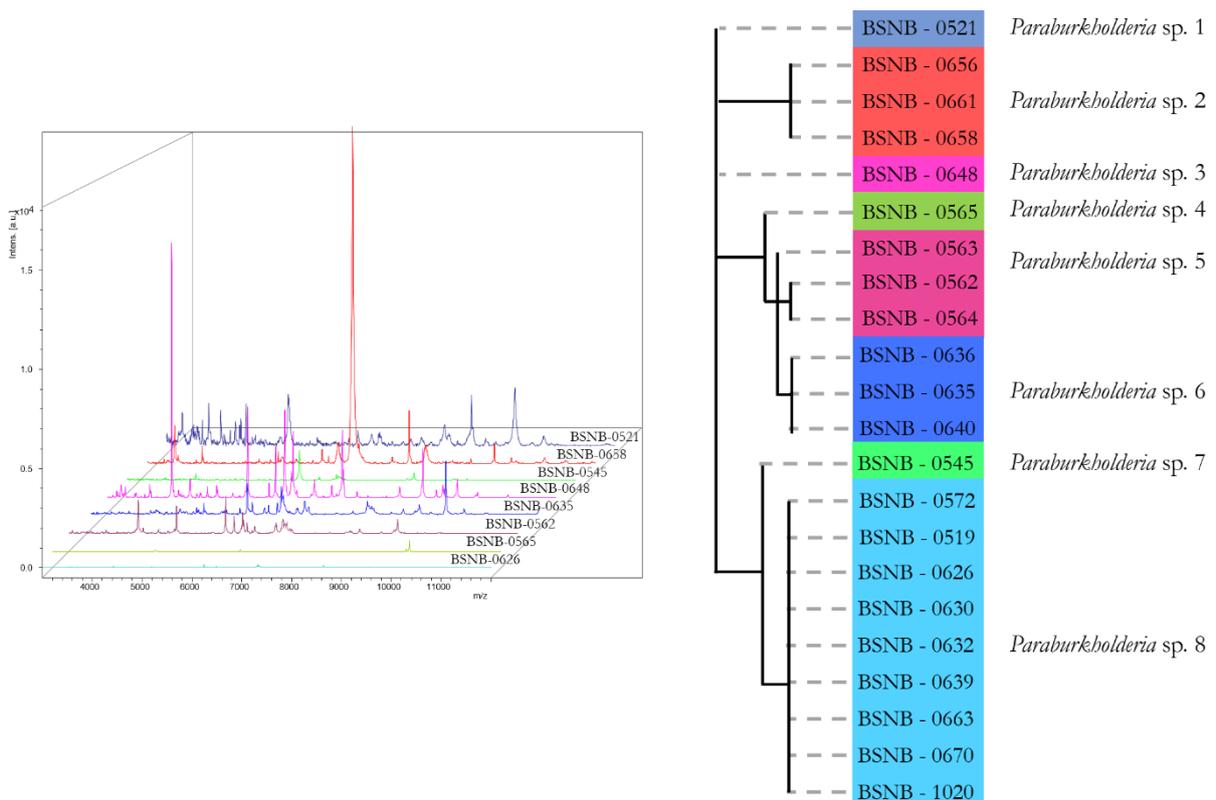


Figure VI. 1. Répartition en différentes espèces des souches de *Paraburkholderia* (à droite) suivant leur empreinte protéique par analyse MALDI-TOF MS (à gauche).

L'analyse MALDI-TOF peut représenter un avantage par rapport aux données phylogénétiques sur la région 16S pour discriminer les souches. En effet, notre analyse a permis de déterminer que BSNB-0656, -0658 et -0661 sont trois isolats de la même espèce de *Paraburkholderia* sp.2, ce qui corrèle avec la forte activité QQ de leur extrait à l'AcOEt sur les quatre biosenseurs.

L'identification des métabolites responsables de l'activité QQ de *Paraburkholderia* sp.2 a alors été envisagée par fractionnement bioguidé, en étudiant la souche BSNB-0656.

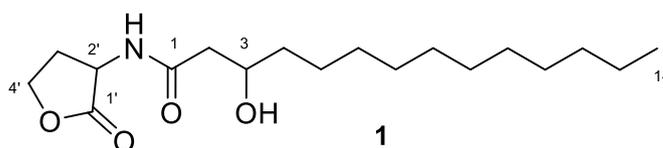
## 6.2. Analyses chimiques des extraits et activité biologique

### 6.2.1. BSNB-0656 : Isolement et identification de métabolites

Afin d'étudier sa diversité chimique, une culture à grande échelle de BSNB-0656 a été réalisée pour obtenir un extrait brut de la souche. Un fractionnement de cet extrait sur chromatographie flash a été effectué (Partie 10.5 p.195). Les fractions BSNB-0656-F3 et BSNB-0656-F4 montrant une activité QQ sur CV026 ont été purifiées par HPLC préparative et neuf molécules majoritaires ont ainsi été isolées.

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H de la première molécule affiche plusieurs signaux (Annexe S16) : six massifs correspondants à des protons à  $\delta_H$  4,64 / 4,44 / 4,30 / 3,97 / 2,56 et 2,26 ppm, un multiplet intégrant pour deux protons à  $\delta_H$  2,36, un second multiplet intégrant pour quatre protons à  $\delta_H$  1,47, un signal large à  $\delta_H$  1,30, caractéristique d'une chaîne alkyle, et un méthyle à  $\delta_H$  0,90. Cependant, nous avons observé une dégradation de la molécule dans le méthanol deutéré au cours du temps. En effet, les massifs initiaux sont toujours présents mais quatre nouveaux massifs apparaissent à  $\delta_H$  4,56 / 3,63 / 2,05 et 1,86 ppm (Annexe S17). L'interprétation des spectres RMN 2D (COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C et HMBC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) a donc été effectuée sur ce mélange de la forme initiale et la forme dégradée. Une chaîne saturée a été identifiée commençant par une double liaison C=O en C-1 ( $\delta_C$  174,4) avec la présence d'un groupement hydroxyle en position 3. Les corrélations COSY montrent l'enchaînement d'une méthine ( $\delta_H$  4,64 ;  $\delta_C$  49,9) et de deux méthylènes (un premier méthylène avec  $\delta_H$  [2,56 / 2,26] ;  $\delta_C$  29,8 et un deuxième  $\delta_H$  [4,30 / 4,44] ;  $\delta_C$  67,2). Ces protons corrélerent avec un carbone à  $\delta_C$  177,4 en C-1' d'après le spectre HMBC. De plus le proton H-2' corréle avec le carbone C-1 à  $\delta_C$  174,4 qui correspond au début de la chaîne alkyle précédemment identifiée.

Compte tenu du spectre de masse haute résolution de la molécule avant dégradation, la formule brute C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>4</sub> peut être déduite d'après l'ion pseudo-moléculaire [M+H]<sup>+</sup> à  $m/z$  328,2504 (calc. 328,2482, err. 6,70 ppm). Au vu des données RMN initiales de la molécule, nous pouvons alors proposer une lactone permettant de satisfaire les couplages et les déplacements chimiques des protons et des carbones puis, une liaison amide la reliant avec la chaîne insaturée. Afin de satisfaire la formule brute, 14 carbones sont placés sur cette chaîne aliphatique, procédant ainsi à l'identification de la *N*-(3-hydroxytétradécanoyl)-homosérine lactone ou 3-OH-C<sub>14</sub>-HSL (**1**).



L'analyse des massifs apparus au cours du temps et les corrélations observées sur les spectres RMN 2D permettent de déterminer une hydrolyse de la lactone en guise de dégradation (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). De plus l'ion pseudo-moléculaire détecté à  $m/z$  346,2599 correspond à une formule brute de C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>5</sub> (calc. 346,2588, err. 3,18 ppm) qui confirme cette hydrolyse (Annexe S17).

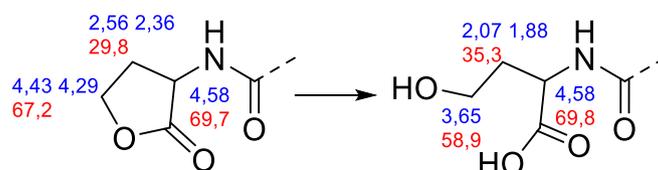


Figure VI. 2. Dégradation des acylhomosérine lactones (AHL) et ouverture de la lactone avec les déplacements RMN en ppm des protons (bleu) et des carbones (rouge).

Par comparaison des spectres RMN-<sup>1</sup>H et par la mesure de la masse en haute résolution (Annexe S18-S22), cinq autres acylhomosérine lactones (AHL) ont pu être identifiées des fractions F3 et F4 : les 3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL (**2**), 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL (**3**), 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (**4**), 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL (**5**) et 3-oxo-C<sub>14</sub>-HSL (**6**) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Pour chacune de ces molécules, la forme dégradée est également présente. La configuration n'a ainsi pas été déterminée mais compte tenu de la littérature, nous faisons l'hypothèse de *N*-acylhomosérine lactones de configuration L.<sup>331</sup>

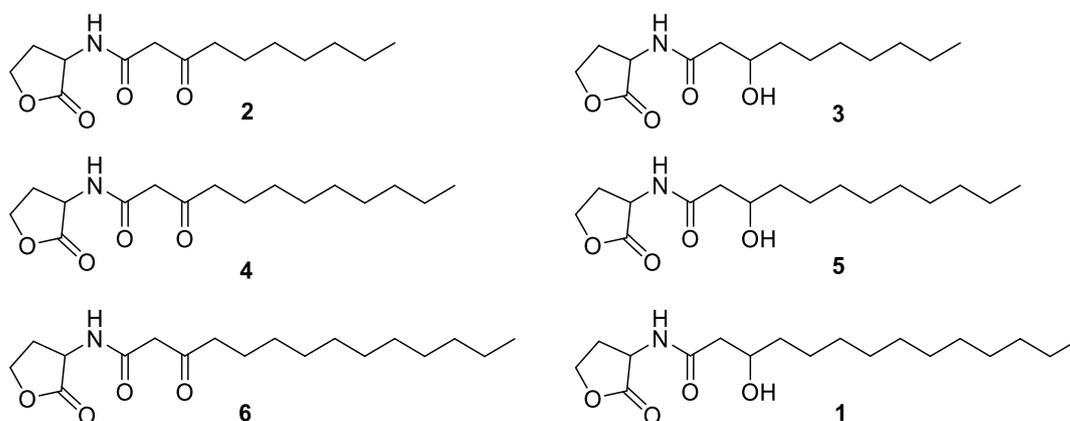


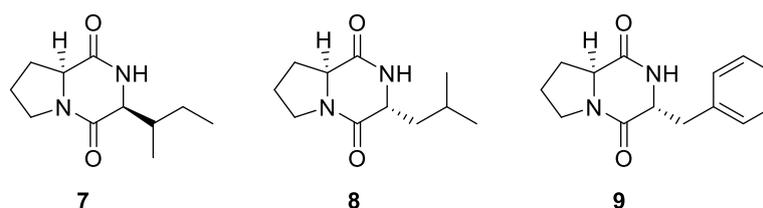
Figure VI. 3. AHLs isolées et identifiées des fractions F3 et F4.

La purification de la fraction F2 a abouti à l'isolement et l'identification de trois dicétopipérazines d'après leur spectre RMN-<sup>1</sup>H, leur spectre de masse haute résolution et la comparaison avec la littérature (Annexe S23-25): la cyclo-(*S*-Pro-*S*-Ile) (**7**), la cyclo-(*S*-Pro-*R*-Leu) (**8**) et la cyclo-(*S*-Pro-*R*-Phe) (**9**).<sup>332</sup> La configuration absolue de ces dicétopipérazines a été déterminée par mesure de leur pouvoir rotatoire et comparaison avec la littérature. Il s'avère qu'un pouvoir rotatoire négatif garanti la configuration (*S*) de la proline et que l'ampleur du pouvoir rotatoire varie de -134° à -185° pour les composés *S*-Pro-*S*-Xxx et de -78° à -120° pour les composés *S*-Pro-*R*-Xxxx.<sup>333</sup>

<sup>331</sup> Li S.-Z., Xu R., *et al.*, Influence of the D/L configuration of *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) and analogues on their Lux-R dependent quorum sensing activity. *Bioorg. Chem.* **2018**, *77*, p. 215–222.

<sup>332</sup> Fdhila F., Vázquez V., *et al.*, dd-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, p. 1299–1301.

<sup>333</sup> Adamczeski M., Reed A. R., *et al.*, New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx cf. podatypa*. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, p. 201–208.



La fraction F5 n'a pas été purifiée mais son analyse par UHPLC-MS/MS indique la présence d'AHLs. En effet, des fragments caractéristiques de la lactone sont observés à  $m/z$  102,055, 74,061 et 56,050 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).<sup>334</sup>

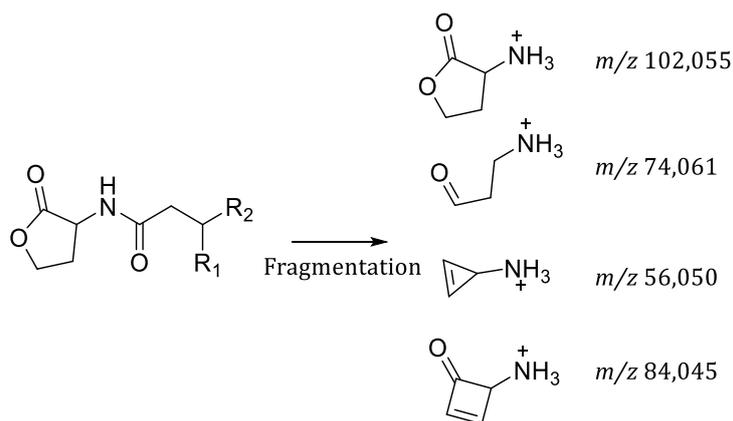


Figure VI. 4. Fragments caractéristiques des AHLs en MS/MS.

L'activité QQ observée sur CV026 des fractions F3, F4 et F5 semble être corrélée à cette présence d'AHLs en grande proportion dans l'extrait (Partie 6.2.3 p.115).

## 6.2.2. Diversité chimique des souches de *Paraburkholderia*

### 6.2.2.1. Analyses des profils UHPLC-MS/MS

Cette classification en différents taxons, proposée par l'analyse des empreintes protéiques des souches de *Paraburkholderia*, peut être corrélée à leur diversité chimique.

Les analyses UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt utilisés lors du criblage biologique ont été réalisées à l'Université de Genève. Les profils métabolomiques (Annexe S26) ont été comparés suivant la répartition des souches donnée par les empreintes protéiques. Nous avons pu observer les éléments suivants :

- les souches de *Paraburkholderia* sp.1, sp.4 et sp.6 produisent peu de métabolites ou du moins en faible quantité dans nos conditions de culture. En effet, leurs profils UHPLC-MS/MS sont identiques à celui de l'extrait à l'AcOEt du milieu de culture,
- les *Paraburkholderia* sp.3 et sp.7 produisent des métabolites en commun, différents des souches précédentes. De plus, l'extrait de *Paraburkholderia* sp.3 contient également des molécules plutôt apolaires de masse importantes (ex :  $m/z$  1068,47 et 1154,518), donc présente une certaine spécificité,
- l'extrait *Paraburkholderia* sp.5 présente un pic majoritaire à  $m/z$  206,153,

<sup>334</sup> Patel N. M., Moore J. D., *et al.*, Identification of unanticipated and novel *N*-acyl-*L*-homoserine lactones (AHLs) using a sensitive non-targeted LC-MS/MS method. *PLOS ONE* 2016, 11, p. e0163469.

- les souches de *Paraburkholderia* sp.8 quant à elles, partagent le même profil UHPLC-MS/MS, différent des autres espèces.

Ces analyses et la comparaison des spectres permettent de corrélérer la classification taxonomique des souches avec leurs profils chimiques.

#### 6.2.2.2. Analyse du réseau moléculaire regroupant les données UHPLC-MS/MS des extraits de *Paraburkholderia*

Après retraitement des données MS/MS de ces extraits par le logiciel MZmine 2, un réseau moléculaire contenant 7786 nœuds a été calculé par le logiciel MetGem (Figure VI. 5).

La déréplication de ce réseau par comparaison avec les spectres de fragmentation disponibles dans les bases de données MS/MS permet de retrouver au moins huit clusters contenant des molécules analogues aux AHLs. De plus, les fragments caractéristiques des AHLs (Figure VI. 4) sont bien présents dans les spectres MS/MS des nœuds de ces clusters. Les nœuds relatifs aux AHLs isolées de BSNB-0656 (*Paraburkholderia* sp.2) sont retrouvés grâce à la mesure de leur masse en haute résolution (Figure VI. 5).

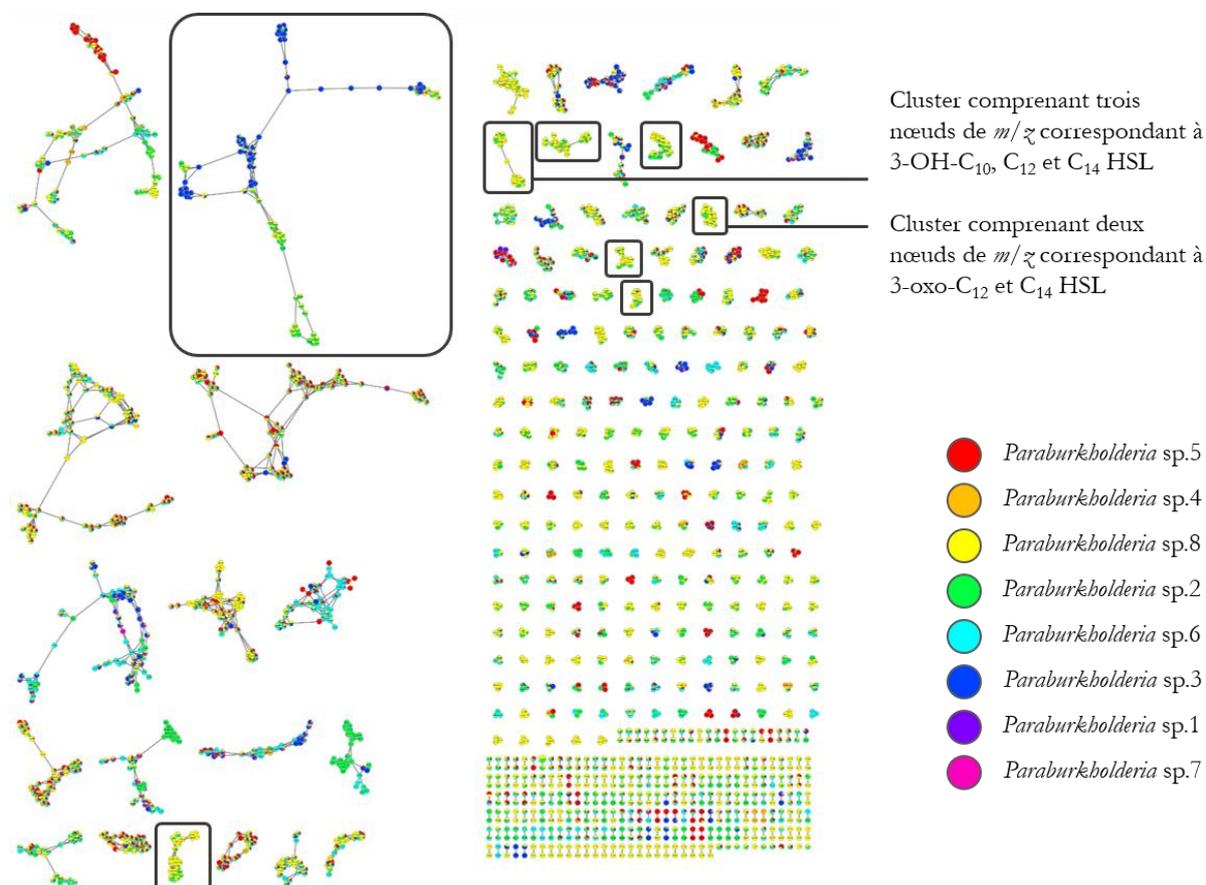


Figure VI. 5. Réseau moléculaire construit avec les données UHPLC-MS/MS des 22 extraits AcOEt de *Paraburkholderia* sp. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par une répartition en secteur du nœud suivant l'intégration du signal XIC. Les clusters encadrés sont formés de nœuds possédant des signaux de  $m/z$  caractéristiques aux AHLs sur leur spectre de fragmentation.

Sept de ces clusters présentent des nœuds retrouvés dans les extraits des souches de *Paraburkholderia* sp.2 BSNB-0656, -0658 et -0661 précédemment étudiés et *Paraburkholderia*

sp.8 (nœuds en vert et en jaune). Le dernier cluster est partagé entre les extraits de *Paraburkholderia* sp.3 et sp.8, et montre des nœuds spécifiques à l'extrait de la souche BSNB-0648 (*Paraburkholderia* sp.3). En plus des fragments caractéristiques retrouvés sur les spectres de fragmentation des AHLs ( $m/z$  102,055, 74,061 et 56,050), ces derniers sont également composés d'un pic à  $m/z$  120,066 (Figure VI. 6). D'après la littérature, ces nœuds pourraient correspondre à des AHLs hydrolysées avec l'ouverture du cycle de la lactone. **Erreur ! Signet non défini.** Le pic de  $m/z$  102,055 observé dans les spectres de fragmentation des AHLs hydrolysées est caractéristique du cycle lactone fermé et peut s'expliquer par sa reformation durant la fragmentation dans le spectromètre de masse.

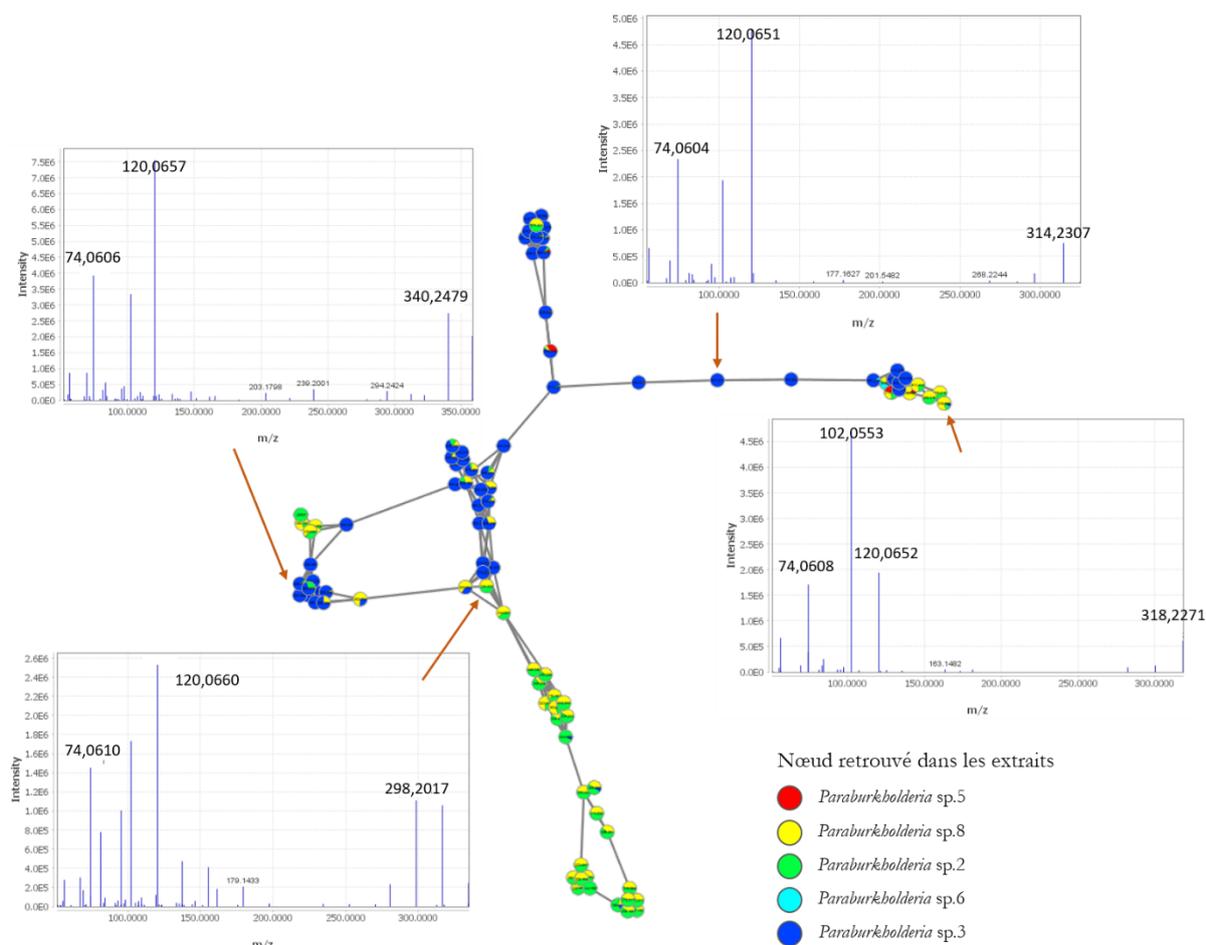


Figure VI. 6. Cluster de nœuds analogues d'AHLs spécifiques aux *Paraburkholderia* sp.2 (BSNB-0656, -0658, -0661) et *Paraburkholderia* sp.3 et sp.8. Les spectres de fragmentation sont associés à quatre nœuds, présentant un pic à  $m/z$  120,066.

Des nœuds sont spécifiques aux extraits des souches de l'espèce *Paraburkholderia* sp.5. Nous retrouvons notamment le nœud à  $m/z$  206,153, signal majoritaire des profils UHPLC de cette espèce. En comparant avec les bases de données de spectres MS/MS, le spectre de fragmentation de ce nœud est proche d'un ion dérivé de phényléthylamide à  $m/z$  276,231 avec des signaux en commun à  $m/z$  122,096, 105,070 et 103,055 sur le spectre de fragmentation. La formule brute prédite pour un ion  $[M+H]^+$  à  $m/z$  206,153 est  $C_{13}H_{19}NO$  (calc. 206,1539, err. -3,51 ppm), pouvant correspondre à un dérivé de phényléthylamide. Compte tenu de toutes ces données, nous pouvons supposer que ce métabolite est la *N*-(2-phényléthyl)pentanamide, permettant également d'expliquer le fragment à  $m/z$  85,065 (Figure VI. 7). De même, d'après les spectres de

fragmentation et la déréplication avec les bases de données, un ion à  $m/z$  245,164 peut correspondre à la *N*-(2-(1*H*-indol-3-yl)éthyl)pentanamide comportant un motif tryptamine (Figure VI. 8). D'après la formation des clusters dans le réseau moléculaire, des analogues de ces molécules seraient également produites par cette espèce (Figure VI. 9). D'autres clusters spécifiques à cette espèce sont présents dans le réseau, mais la déréplication n'a pas permis d'identifier des structures proches de ces clusters à partir des bases de données.

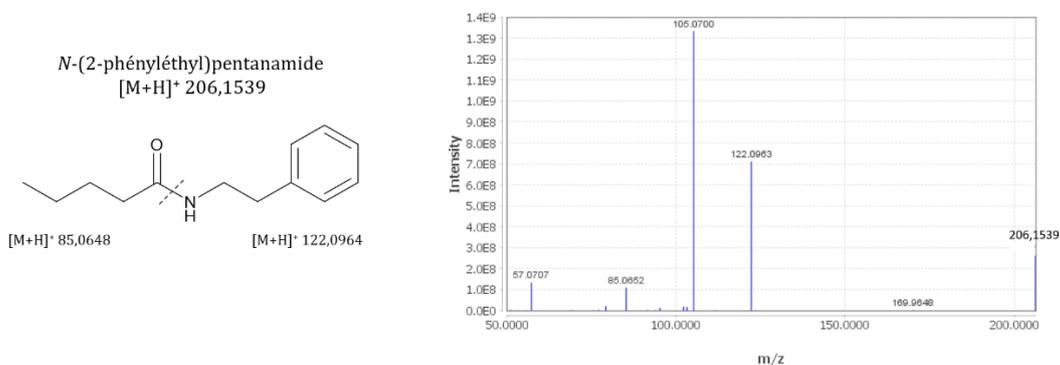


Figure VI. 7. Spectre de fragmentation et prédiction de la molécule associée au nœud à  $m/z$  206,153.

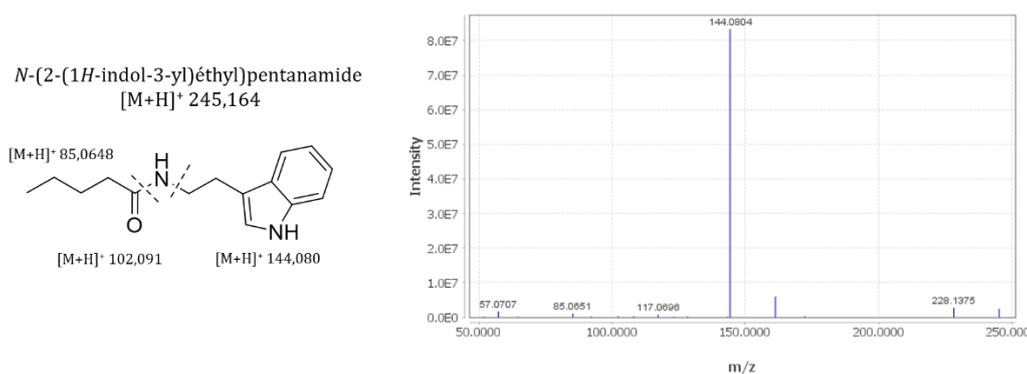


Figure VI. 8. Spectre de fragmentation et prédiction de la molécule associée au nœud à  $m/z$  245,164.

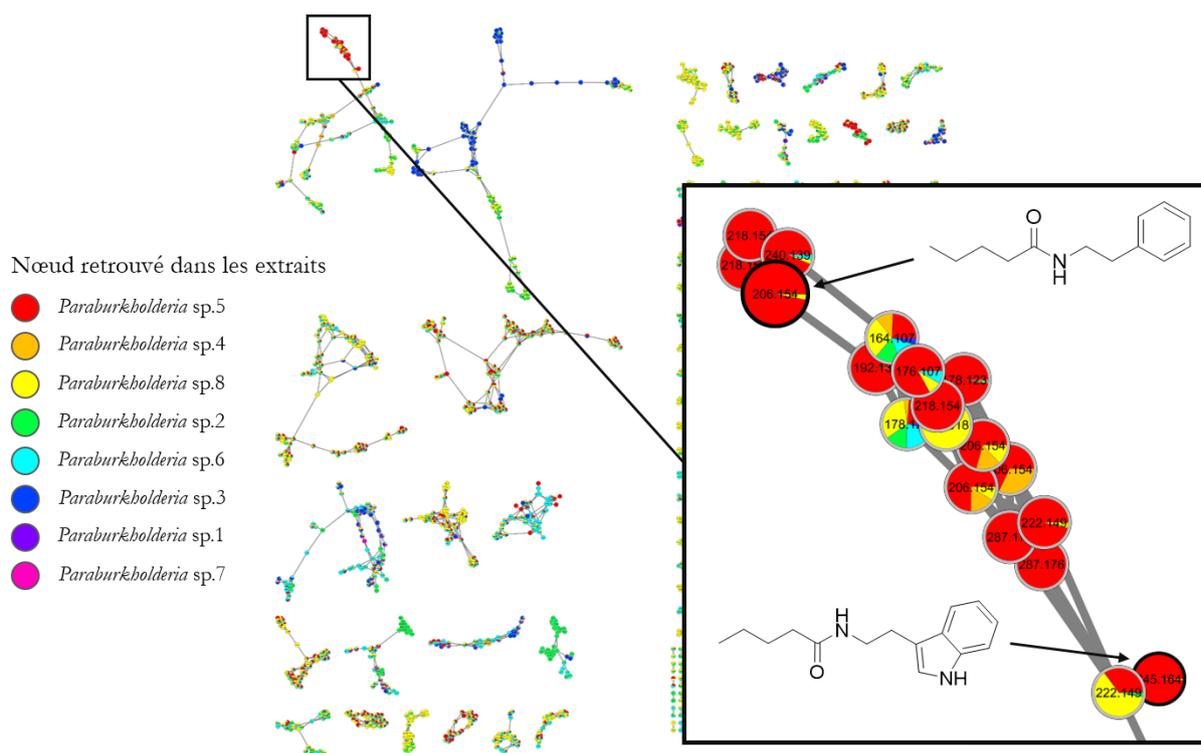


Figure VI. 9. Nœuds spécifiques à *Paraburkholderia* sp.5 avec prédiction de dérivés de phényléthylamide.

En conclusion, nous observons des variations dans la diversité chimique des souches suivant la discrimination en espèces obtenue par l'analyse MALDI-TOF MS de leur empreinte protéique. Le réseau moléculaire, obtenu avec les données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt, indique la présence d'AHLs dans les extraits de *Paraburkholderia* sp.3 et sp.8. Le pic majoritaire de l'extrait de *Paraburkholderia* sp.5 à  $m/z$  206,153 semble correspondre à la *N*-(2-phényléthyl)pentanamide, d'après la masse haute résolution et son spectre de fragmentation MS/MS.

Les extraits AcOEt des souches de *Paraburkholderia* sp.8 montrent une activité QQ sur *Chromobacterium violaceum* CV026. L'activité QQ des AHLs, métabolites majoritaires dans ces extraits, est alors mesurée.

### 6.2.3. Activité QQ des extraits et des molécules AHLs

Après avoir testé l'extrait brut issu de la grande échelle de BSNB-0656 ainsi que les fractions obtenues, l'activité initiale QQ de BSNB-0656 n'a pas été retrouvée (Figure VI. 10). Pour l'extrait issu de la grande échelle, l'activité QQ sur F117 a diminué, avec un pourcentage de fluorescence de  $41 \pm 3$  au lieu de  $20 \pm 4$  à 24h et l'activité QQ sur MT102 a été également perdue. Une comparaison entre la détection DEDL des profils HPLC de l'extrait initial de BSNB-0656 qui a servi au criblage et l'extrait brut de la grande échelle montre des différences d'intensité de quelques signaux pouvant expliquer cette variation au niveau de l'activité (Figure VI. 11).

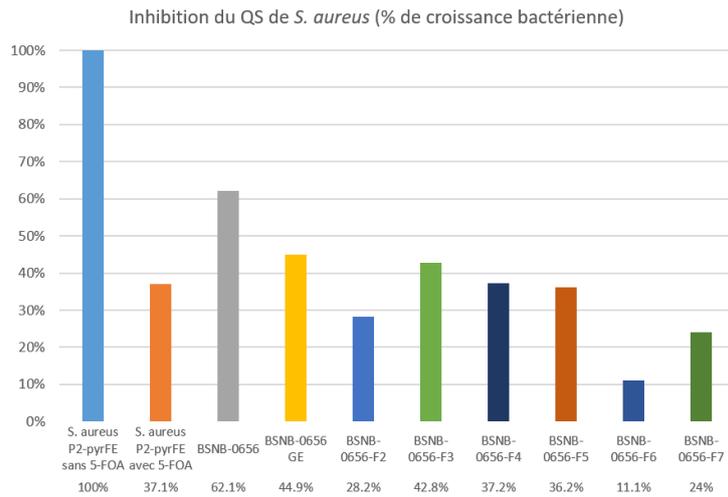


Figure VI. 10. Inhibition du QQ de *S. aureus* (P2-pyrFE) par l'extrait initial de BSNB-0656 (en gris), l'extrait issu de la grande échelle (GE, en jaune) et les fractions BSNB-0656-F2 à BSNB-0656-F7.

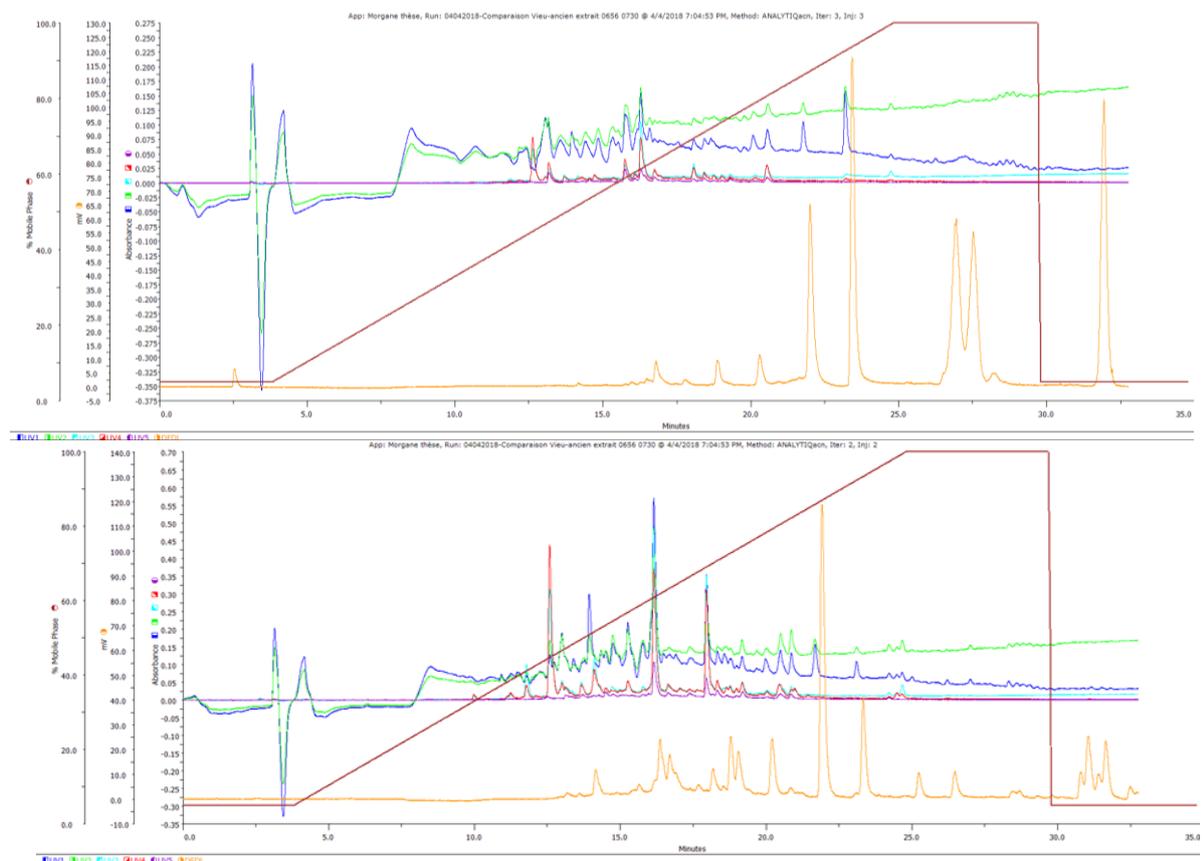


Figure VI. 11. Profil HPLC avec détection UV (210 nm – bleu foncé, 220 nm – vert, 254 nm – bleu clair, 270 nm – rouge et 320 nm – violet) et DEDL (jaune) des deux extraits de BSNB-0656 : l'extrait actif ayant servi au criblage (en haut) et l'extrait obtenu après la culture à grande échelle (en bas). Le gradient d'éluion indiquant la proportion en ACN est superposé en rouge.

L'activité QQ sur *S. aureus* n'ayant pas été retrouvée pour BSNB-0656, plusieurs souches actives lors du premier criblage biologique ont été remises en culture afin de réaliser de nouveaux extraits AcOEt. Ces extraits bruts ont été à nouveau testés sur le QS de *S. aureus* et comparés avec les premiers résultats obtenus (Figure VI. 12). L'activité initiale des trois extraits des souches BSNB-0656, -0658 et -0661 n'a de nouveau pas été retrouvée, de même que celle de l'extrait de la souche BSNB-0519 (*Paraburkholderia* sp.8).

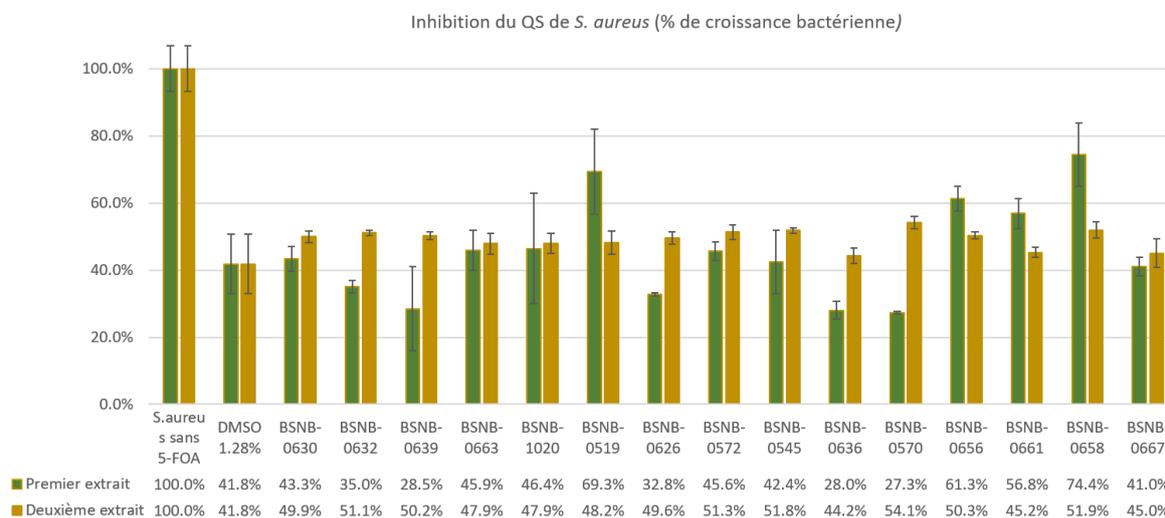


Figure VI. 12. Comparaison des activités QQ sur *S. aureus* de deux lots d'extraits AcOEt de notre collection d'endophytes.

Pour l'extrait de BSNB-0656 réalisé à grande échelle, seule l'activité QQ sur le biosenseur *C. violaceum* CV026 a été conservée. Les fractions BSNB-0656-F3, F4 et F5 sont les plus actives avec les plus grands halos d'inhibition de la production de violacéine (Figure VI. 13 et Tableau VI. 1).

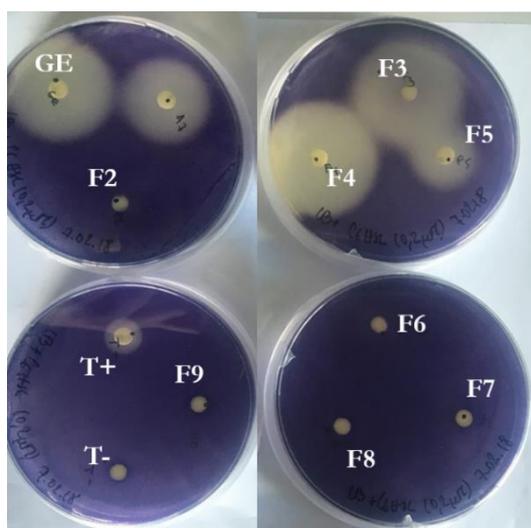


Tableau VI. 1. Résultat d'activité QQ sur CV026 des fractions de l'extrait issu de la culture à grande échelle de BSNB-0656.

Echantillon	Test 1 CV026	Test 2 CV026
BSNB-0656 GE	3,5 cm	3,5 cm
BSNB-0656-F2	-	-
BSNB-0656-F3	3,6 cm	3,7 cm
BSNB-0656-F4	4,1 cm	4,0 cm
BSNB-0656-F5	2,0 cm	2,1 cm
BSNB-0656-F6	-	-
BSNB-0656-F7	-	-
BSNB-0656-F8	-	-

- : pas d'activité QQ mesurée

Figure VI. 13. Activité QQ sur CV026 des fractions de l'extrait issu de la culture à grande échelle de BSNB-0656.

La purification de ces fractions actives a montré la présence d’AHLs, notamment la 3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL, 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL, 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL, 3-oxo-C<sub>14</sub>-HSL et 3-OH-C<sub>14</sub>-HSL (Partie **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** p.**Erreur ! Signet non défini.**). Afin de vérifier l’activité de ce type de molécules, des standards AHLs possédant des longueurs de chaîne et des groupements variables ont été testés pour leur activité QQ sur CV026 à une concentration de 1 mmol/L (Tableau VI. 2).

Tableau VI. 2. Activité QQ sur CV026 de différentes AHLs

Standard AHL	Halo d'inhibition de violacéine (cm)
C <sub>9</sub> -HSL	4,5
C <sub>10</sub> -HSL	4,7
3-oxo-C <sub>10</sub> -HSL	4,1
OH-C <sub>10</sub> -HSL	2,5
C <sub>11</sub> -HSL	3,5
C <sub>12</sub> -HSL	1,7
3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL	3,5
3-OH-C <sub>12</sub> -HSL	1,7
C <sub>13</sub> -HSL	0,7 (toxique*)
C <sub>14</sub> -HSL	0,7 (toxique*)
C <sub>14</sub> :1-Δ <sup>9</sup> cis-(L)-HSL	2,3
3-oxo-C <sub>14</sub> -HSL	1
3-oxo-C <sub>14</sub> :1-Δ <sup>7</sup> cis-(L)-HSL	3
C <sub>16</sub> :1-9Δ-(L)-HSL	0,7 (toxique*)
3-oxo-C <sub>16</sub> :1-Δ <sup>11</sup> cis-(L)-HSL	1,5

\* La mention « toxique » indique la présence d’un halo d’inhibition du tapis cellulaire de la bactérie

Les molécules possédant le plus d’activité sont la C<sub>9</sub>-HSL, C<sub>10</sub>-HSL, 3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL, C<sub>11</sub>-HSL et 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL. Il semblerait que pour une même longueur de chaîne, les AHLs possédant un groupement hydroxyle en position 3 soient moins actifs, mais plus de données sont nécessaires pour confirmer cette relation structure/activité. Nous pouvons toutefois conclure que les AHLs présentes dans les extraits sont bien responsables de l’activité QQ sur *C. violaceum* CV026.

#### 6.2.4. Discussion

La production d’AHLs a déjà été identifiée chez le genre *Burkholderia* lors de l’étude de leur système quorum sensing. En effet, il a été montré que le QS des espèces de *Burkholderia* du clade BCC est régulé par un système CepI/R médié par la production de la C<sub>8</sub>-HSL. Ce système est impliqué dans la régulation des facteurs de virulence de ces souches pathogènes.<sup>335</sup>

L’étude de Suarez-Moreno *et al.* a été la première à s’intéresser au quorum sensing de souches de *Paraburkholderia* fixatrices d’azote dont *P. kururiensis*.<sup>336</sup> Ils ont ainsi montré que la majorité de

<sup>335</sup> Eberl L., Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, 296, p. 103–110.

<sup>336</sup> Suárez-Moreno Z. R., Caballero-Mellado J., *et al.*, The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum sensing system, which is tightly regulated by the RsaL repressor. *Microbiology* **2008**, 154, p. 2048–2059.

ces souches possèdent un système quorum sensing nommé BraI/R qui produit et répond préférentiellement à la 3-oxo-C<sub>14</sub>-HSL.<sup>336,337</sup> Il a également été montré que le système BraI/R de *P. phymatum* produit des AHLs de différentes longueurs de chaîne, avec la présence ou non d'un groupement oxo ou hydroxyle en position 3 et répond même à une faible concentration de ces molécules dans le milieu.<sup>338</sup> Un gène de répression *rasL* a été identifié entre les gènes *bral/R*. Ce gène réprime *bral* et donc la production de 3-oxo-C<sub>14</sub>-HSL. L'absence de ce gène dans des souches mutantes provoque une production 2000 fois plus importante de cette molécule chez *P. kururiensis*.<sup>336</sup> Suarez-Moreno *et al.* ont émis l'hypothèse que ce gène de répression jouerait un rôle d'homéostasie ou de contrôle du QS dans certaines conditions environnementales.

Les phénotypes de ces bactéries comme la fixation de l'azote atmosphérique, la motilité, la production de sidérophores, la capacité de croissance en présence de composés aromatiques et l'activité protéolytique ne sont pas régulés par ce système QS.<sup>337</sup> En revanche, la régulation positive de la production d'exopolysaccharides (EPS) par le système BraI/R est une caractéristique commune à plus de dix espèces étudiées.<sup>337</sup> Ces produits extracellulaires forment une matrice protectrice pour la bactérie contre divers stress environnementaux et participent à la formation du biofilm. Ce phénomène est très important pour les relations symbiotiques des bactéries.<sup>339,340</sup>

Malgré la haute conservation du système QS BraI/R dans les souches de *Paraburkholderia* sp., la dégradation de composés, la formation de biofilm et le comportement symbiotique des espèces du genre *Paraburkholderia* sont régulés différemment par ce système suivant les espèces.<sup>338,339</sup> Cette spécificité des régulateurs suivant les espèces peut être due à une adaptation locale à des niches environnementales.<sup>338</sup>

Un second système de QS (XenI2/R2) médié par la 3-OH-C<sub>8</sub>-HSL a été trouvé chez quelques souches de *Paraburkholderia* sp. (*P. xenovorans* et *P. phytofirmans*) et semble être indépendant du système BraI/R. A ce jour, il n'a pas été mis en évidence de rôle fonctionnel de ce système QS. De plus, sa présence ne semble pas être spécifique à certaines espèces, mais plutôt à des isolats parmi ces espèces.<sup>337,338,341</sup>

L'étude de la souche BSNB-0656 ainsi que l'analyse du réseau moléculaire de l'ensemble des extraits de *Paraburkholderia* montrent une production de nombreuses AHLs dans les espèces *Paraburkholderia* sp.3 et sp.8. Compte tenu de la littérature, cette production pourrait être révélatrice de la présence d'un système QS médié par les AHLs dans ces bactéries. D'après l'étude de Coutinho *et al.*, la diversité en AHLs pourrait dépendre du milieu de culture utilisé.<sup>338</sup>

Nos résultats indiquent que les AHLs sont responsables de l'activité QQ des extraits du genre *Paraburkholderia* sp.8 sur *C. violaceum* CV026. *C. violaceum* CV026 est une souche mutante dont la production de violacéine peut être restaurée lorsque son quorum sensing est activé. Il a été montré que son QS est préférentiellement médié par la C<sub>6</sub>-HSL mais qu'en présence d'AHL de chaîne C<sub>4</sub> à C<sub>8</sub>, la production de violacéine est également rétablie. En revanche, en présence d'une

<sup>337</sup> Suárez-Moreno Z. R., Devescovi G., *et al.*, Commonalities and differences in regulation of N-acyl homoserine lactone Quorum Sensing in the beneficial plant-associated *Burkholderia* species cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, p. 4302–4317.

<sup>338</sup> Coutinho B. G., Mitter B., *et al.*, Regulon studies and in planta role of the BraI/R Quorum-Sensing system in the plant-beneficial *Burkholderia* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, 79, p. 4421–4432.

<sup>339</sup> Costa O. Y. A., Raaijmakers J. M., *et al.*, Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Front. Microbiol.* **2018**, 9, p. 1636.

<sup>340</sup> Vu B., Chen M., *et al.*, Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **2009**, 14, p. 2535–2554.

<sup>341</sup> Zúñiga A., Donoso R. A., *et al.*, Quorum-Sensing systems in the plant growth-promoting bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN exhibit cross-regulation and are involved in biofilm formation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2017**, 30, p. 557–565.

AHL activatrice, les AHLs à chaîne longue inhibent la production de violacéine par *C. violaceum* et ont un effet quorum quenching.<sup>316</sup> Dans notre étude, des AHLs de chaîne à nombre impair de carbones ont aussi été testées (C<sub>9</sub>, C<sub>11</sub> et C<sub>13</sub>) et montrent un effet QQ important.

L'activité initiale des extraits des souches du genre *Paraburkholderia* sp.2 n'a jamais été retrouvée sur le QS des trois autres biosenseurs (dont *S. aureus*) malgré la remise en culture des souches. Pourtant, la comparaison des profils HPLC de l'extrait actif et non actif montre seulement des différences d'intensité sur certains signaux. Ces extraits et les extraits de *Paraburkholderia* sp.8 partagent la même diversité chimique d'après le réseau moléculaire, mais étonnamment les extraits des souches de *Paraburkholderia* sp.8 ne montrent pas d'activité QQ sur *S. aureus* hormis celui de la souche BSNB-0519.

Une précédente étude a montré l'impact des AHLs sur le QS de *S. aureus* et l'expression de sa virulence, prouvant ainsi qu'une bactérie à Gram négatif pouvait avoir une répercussion biologique au-delà d'un rôle de communication sur des bactéries à Gram positif par le biais de ces métabolites.<sup>342</sup> D'après cette étude, les AHLs de longueur entre C<sub>8</sub> et C<sub>14</sub> substituées par un groupement oxo en position 3 affectent la croissance de *S. aureus*. Plus particulièrement, la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL interagit avec la membrane cellulaire de *S. aureus* mais aussi, inhibe l'expression de son système *agr* à des concentrations de 50 µM entraînant une perte de la production en exotoxines et en protéines de liaison à la fibronectine (Partie 1.3.6 p.33). La 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL serait responsable de la perturbation de plusieurs récepteurs membranaires aboutissant à une modulation de l'expression de la virulence chez *S. aureus*.<sup>342</sup>

Ainsi il est probable que l'activité initiale QQ des quatre extraits (BSNB-0656, -0658, -0661 et -0519) soit due à la présence de ces AHLs. Malgré des conditions de culture identique, la quantité de ces AHLs dans ces extraits a diminué dans les cultures suivantes, aboutissant à une diminution de cette activité QQ. Il a déjà été montré dans la littérature que des facteurs abiotiques comme la température ou la salinité pouvait impacter l'hydrolyse des AHLs produites par les bactéries. Par exemple, Yates *et al.* ont montré l'impact de la température entre 22 et 37°C sur la proportion produite en AHLs de la bactérie *Yersinia pseudotuberculosis* : au fur et à mesure que la température de culture augmente, la proportion en 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL diminue en faveur de la proportion d'AHLs hydrolysées.<sup>343</sup> Cependant, cette étude n'évoque pas d'éventuelles variations sur la production en OH-HSLs et en AHLs de chaîne plus longue.

### 6.3. Production en AHLs en fonction de la température de culture

Afin d'observer la production en AHLs suivant les conditions de température, deux souches ont été sélectionnées : BSNB-0661 (*Paraburkholderia* sp.2) et BSNB-0670 (*Paraburkholderia* sp.8). Ces souches ont été cultivées sur le même milieu gélosé à cinq températures différentes en triplicat : 10, 15, 20, 28 et 35°C. Après sept jours de culture, les extraits à l'AcOEt ont été réalisés. Des témoins négatifs (extraits à l'AcOEt du milieu gélosé mis aux différentes températures) ont également été réalisés. Les quantités obtenues pour chaque extrait sont disponibles en annexe S27. Les extraits ont été ensuite analysés au LBBM de Banyuls/Mer sur un spectromètre de masse Orbitrap MS/MS FT Q-Exacte (Thermo Scientific®), nous permettant d'obtenir des données UHPLC-MS/MS pour chaque extrait.

<sup>342</sup> Qazi S., Middleton B., *et al.*, N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, p. 910-919.

<sup>343</sup> Yates E. A., Philipp B., *et al.*, N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, p. 5635-5646.

### 6.3.1. Analyses des spectres UHPLC-MS/MS

Une similarité des profils entre les extraits AcOEt du milieu gélosé placé à 10, 15, 20, 28 et 35 °C montre que la température extérieure n'a pas d'effet sur le milieu de culture. Chaque souche a été cultivée en triplicat pour les cinq températures. Les trois extraits à l'AcOEt réalisés à chaque température ont montré les mêmes profils UHPLC-MS/MS.

Les extraits de la souche BSNB-0661 cultivée à 10°C montre un profil UHPLC similaire à un extrait AcOEt du milieu de culture (Figure VI. 14). En effet, le tapis cellulaire sur la boîte de Pétri était fin lors d'une culture à 10°C, la bactérie ayant des difficultés à se développer à cette température. Des métabolites secondaires, s'ils sont produits, doivent être présents en faible quantité et non observables sur le profil.

Les extraits de la souche BSNB-0661 cultivée aux quatre autres températures montrent deux profils (Figure VI. 15) :

- les extraits AcOEt des cultures placées à 15 et 20°C sont similaires avec la présence de plusieurs signaux majoritaires à 6,23 / 6,95 / 7,72 et 8,60 min,
- ces précédents signaux ne sont plus majoritaires dans les extraits AcOEt des cultures à 28°C. En revanche, de nouveaux signaux apparaissent à 6,77 et 6,85 min. Les extraits des cultures à 35°C se rapprochent d'un extrait de milieu gélosé hormis quelques pics comme celui à 6,85 min. La bactérie semble donc produire peu ou moins de métabolites à 35°C.

L'injection d'un mélange des 27 standards d'AHLs (Annexe S28) a permis d'identifier des signaux pouvant correspondre à des AHLs dans les extraits de BSNB-0661 cultivée à 20°C. Pour ces signaux, la présence d'AHLs est alors confirmée d'après la mesure de la masse haute résolution et l'observation de leur spectre de fragmentation. Ainsi, les pics à un temps de rétention 6,68 / 6,95 / 7,42 / 7,72 et 8,59 min sont respectivement associés aux AHLs suivantes : 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL, 3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL, 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL, 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et 3-oxo-C<sub>14</sub>-HSL (Figure VI. 16). Le pic à 6,77 min détecté dans l'extrait à 28°C correspondrait en revanche à la 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL hydrolysée au vu de sa masse haute résolution et de son spectre de fragmentation (présence d'un fragment à  $m/z$  120,0656) (Figure VI. 17).

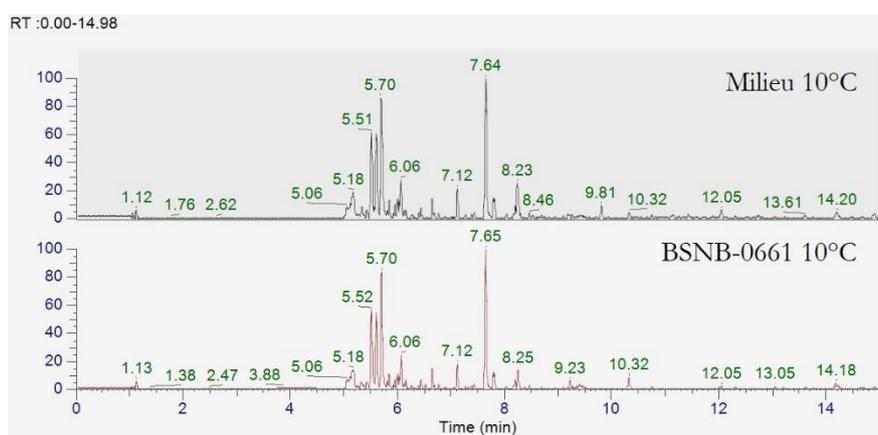


Figure VI. 14. Comparaison des profils UHPLC-MS/MS (Base Peak  $m/z$  50,0000 - 1500,0000) entre 0 et 15 min des extraits AcOEt du milieu gélosé incubé à 10°C (en haut) et de BSNB-0661 incubé à 10°C (en bas).

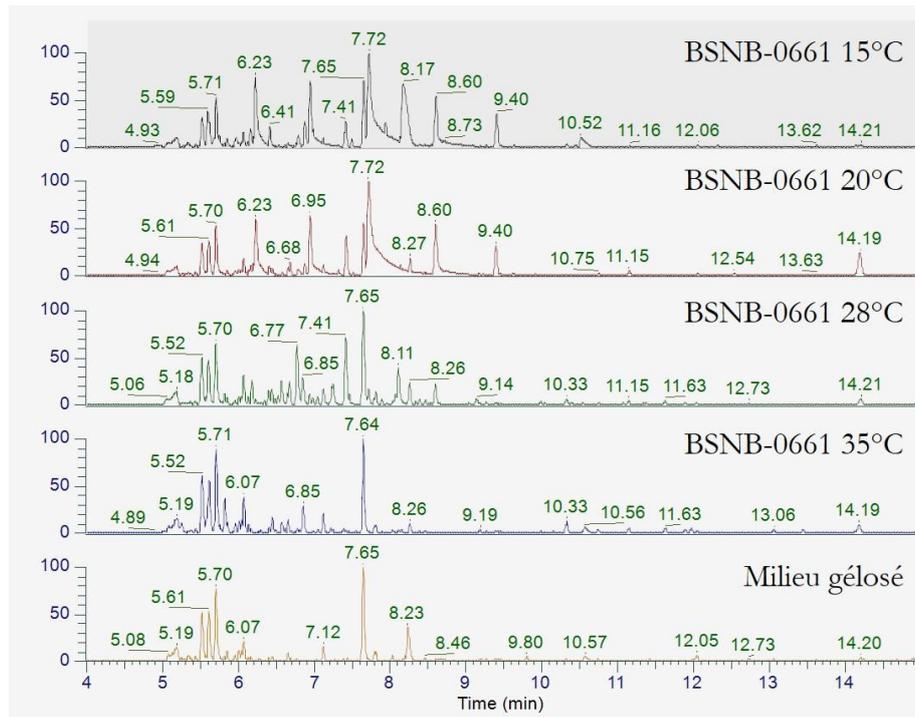


Figure VI. 15. Comparaison des profils UHPLC-MS/MS (Base Peak  $m/z$  50,0000 – 1500,0000) entre 4 et 15 min des extraits AcOEt de la souche BSNB-0661 incubée à différentes températures ainsi que de l'extrait à l'AcOEt du milieu gélosé.

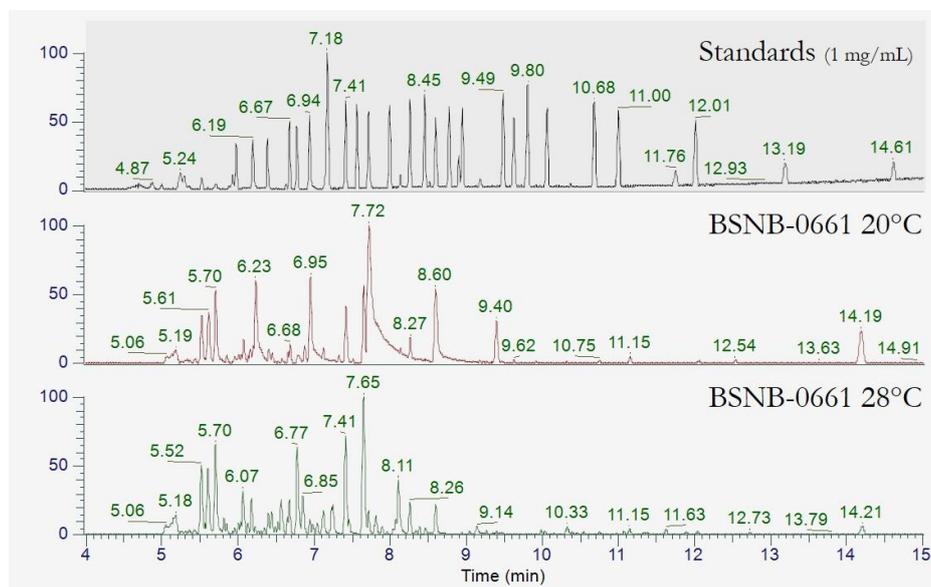


Figure VI. 16. Comparaison des profils UHPLC-MS/MS (Base Peak  $m/z$  50,0000 – 1500,0000) entre 4 et 15 min d'un mélange d'AHLs à 1 mg/mL (en haut) et des extraits AcOEt de la souche BSNB-0661 incubée à 20°C (au milieu) et à 28°C (en bas).

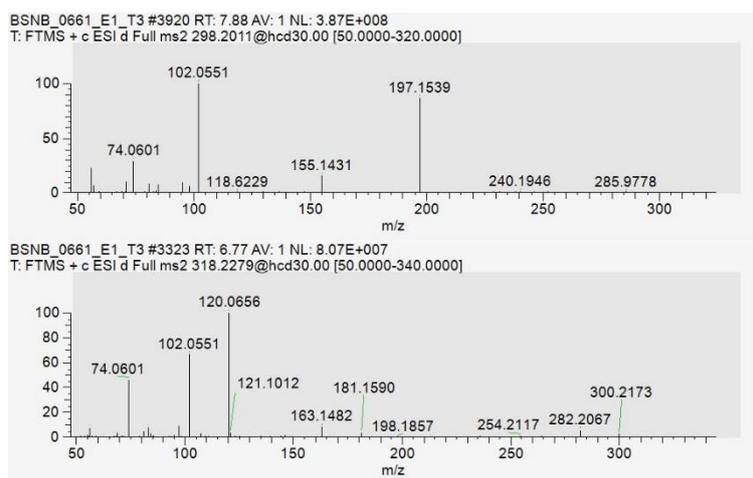


Figure VI. 17. Spectres de fragmentation MS/MS de l'ion à  $m/z$  298,2011 (en haut) et de l'ion à  $m/z$  318,2279 (en bas) présents dans l'extrait de BSNB-0661 cultivée à 20°C et 28°C respectivement.

Pour les extraits AcOEt de la souche BSNB-0670 cultivée à 15 et 20°C, des profils UHPLC-MS/MS similaires à ceux de BSNB-0661, avec la présence d'AHLs, sont observés. De même, les profils des extraits AcOEt pour des cultures de BSNB-0670 à 28 et 35°C sont chimiquement différents avec des signaux correspondants aux AHLs moins intenses. La souche semble mieux supporter la température de 35°C pour pousser que BSNB-0661. En effet, d'après le profil UHPLC-MS/MS, des signaux relatifs aux métabolites de la souche sont toujours observés à cette température (Figure VI. 18). L'extrait AcOEt de BSNB-0670 n'a pas été réalisé à la température de 10°C car cette température n'a pas permis à la souche de pousser.

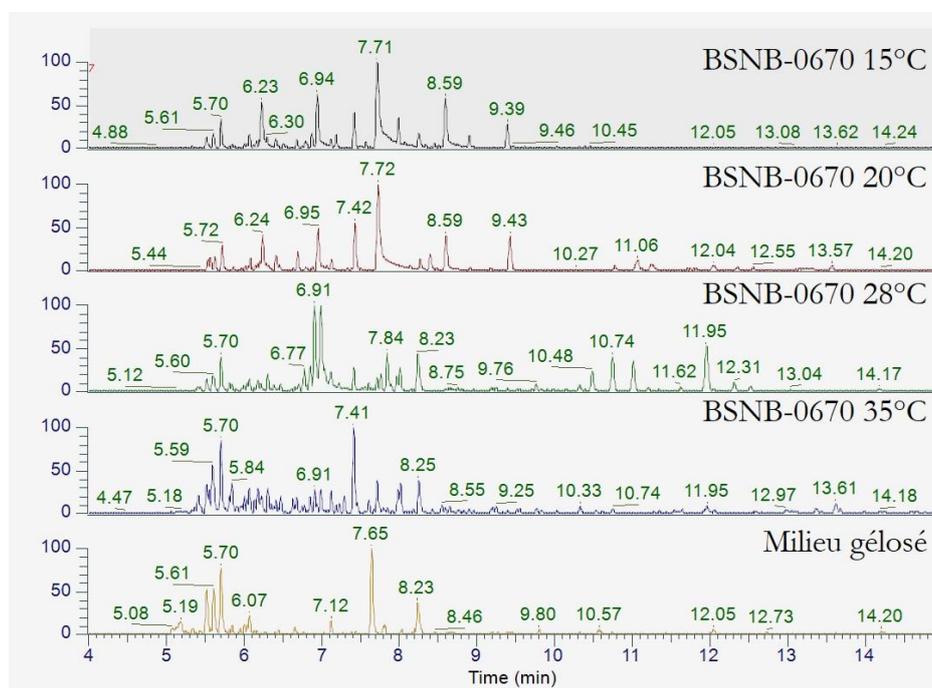


Figure VI. 18. Comparaison des profils UHPLC-MS/MS (Base Peak  $m/z$  50,0000 – 1500,0000) entre 4 et 15 min des extraits AcOEt de la souche BSNB-0670 incubée à différentes températures ainsi que de l'extrait AcOEt du milieu gélosé.

Une analyse par visualisation des données UHPLC-MS/MS sous forme de réseaux moléculaires a ensuite été effectuée.

### 6.3.2. Comparaison des données UHPLC-MS/MS par analyse en réseau moléculaire

Cette analyse permet de mettre en valeur les métabolites minoritaires difficilement observables sur les profils UHPLC. Pour chacune des deux souches, un réseau moléculaire est formé en prenant en compte les extraits en triplicat pour chaque température de culture, un extrait du milieu gélosé ainsi qu'un mélange de standard, permettant alors de cibler plus facilement les clusters d'AHLs dans le réseau.

Le réseau moléculaire réalisé avec les extraits de la souche BSNB-0661 (*Paraburkholderia* sp.2) comporte 3406 nœuds dont 2596 nœuds isolés (Annexe S29). Deux clusters regroupant les nœuds relatifs aux standards AHLs sont retrouvés. Les AHLs comportant un groupement oxo en position 3 forment un cluster séparé des AHLs non fonctionnalisées ou porteur d'un groupement OH. Il est également possible de retrouver dans ces clusters des nœuds correspondants à des AHLs hydrolysées d'après la mesure de masse haute résolution ainsi que du spectre de fragmentation.

Compte tenu de la difficulté de croissance de la souche aux températures de 10 et 35°C, les aires des pics retrouvées dans les extraits réalisés à ces températures sont faibles. Les nœuds sont majoritairement partagés entre les extraits de la souche en culture à 15, 20 et 28°C (Figure VI. 19).

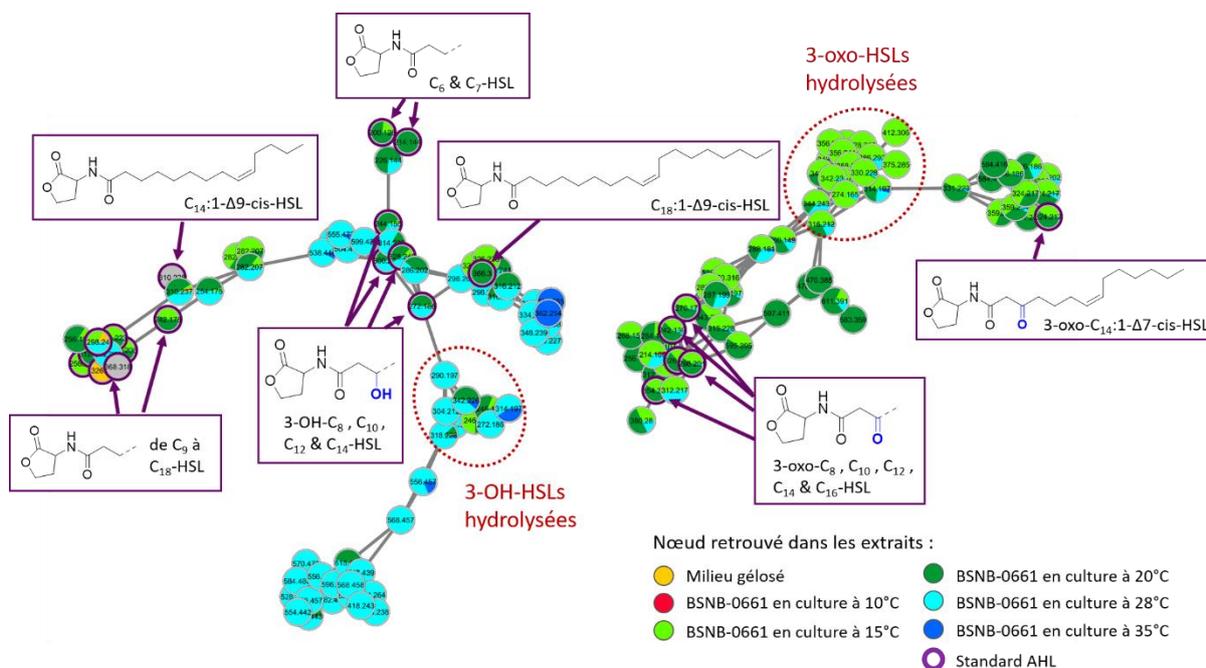


Figure VI. 19. Clusters relatifs aux AHLs issu du réseau moléculaire formé avec les données UHPLC-MS/MS des extraits de BSNB-0661 en culture aux différentes températures.

La répartition de ces nœuds suivant les différents extraits montre bien une tendance suivant la température de culture : les extraits de BSNB-0661 cultivée à 28°C renferment une majorité d'AHLs fonctionnalisées OH plutôt que des AHLs fonctionnalisées oxo. A l'inverse une majorité d'AHLs oxo se retrouve dans les extraits de la souche cultivée à 15 et 20°C.

Le deuxième réseau moléculaire, réalisé à partir des extraits de BSNB-0670 (*Paraburkholderia* sp.8), est composé de 4031 nœuds dont 3089 nœuds isolés (Annexe S30). Deux clusters d'AHLs sont retrouvés dans ce réseau moléculaire, toujours suivant leur fonctionnalisation oxo ou autre (Figure VI. 20). Les nœuds relatifs aux 3-oxo-HSLs se retrouvent

majoritairement dans les extraits des cultures à 15 et 20°C comme pour les extraits de BSNB-0661 (*Paraburkholderia* sp.2).

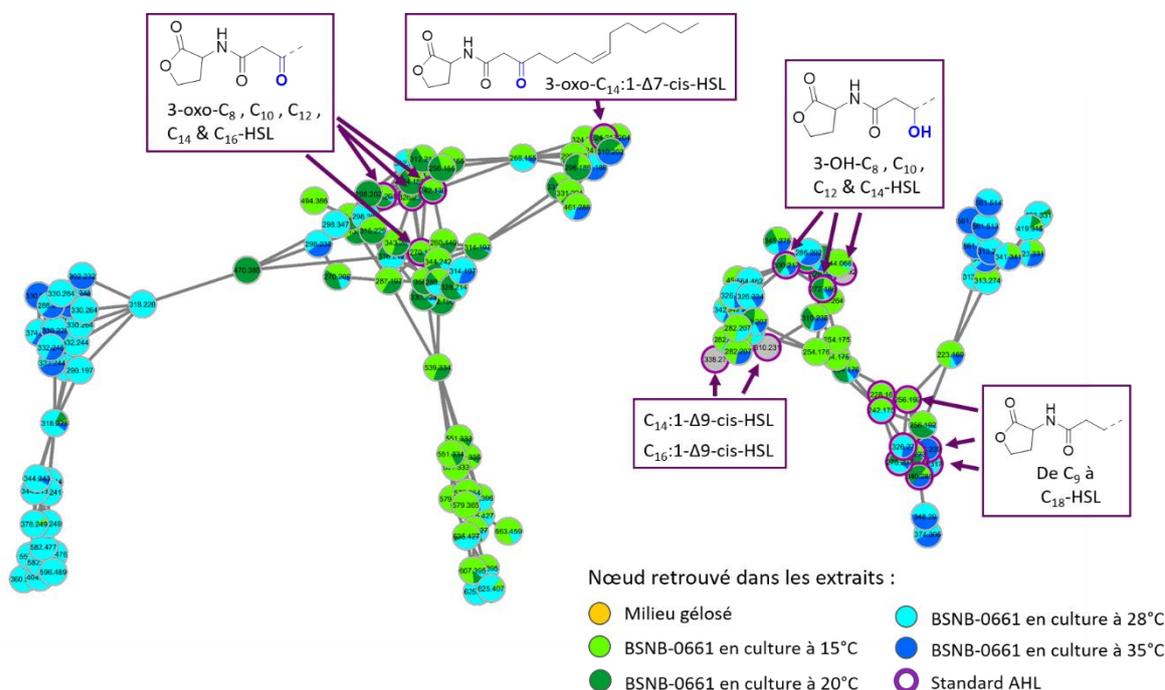


Figure VI. 20. Clusters relatifs aux AHLs issu du réseau moléculaire formé avec les données UHPLC-MS/MS des extraits de BSNB-0670 en culture aux différentes températures.

Afin d'être plus précis sur la proportion en AHLs fonctionnalisées produites par les souches au bout de sept jours de culture, nous avons cherché à doser ces molécules dans les extraits obtenus suivant la température de culture.

### 6.3.3. Dosage des AHL dans les extraits

Les AHLs peuvent être dosées dans les extraits suite à l'établissement de droites de calibration avec des molécules étalons (Annexe S31). Le dosage des AHLs fonctionnalisées oxo ou OH peut conforter les tendances en production suivant la température de culture précédemment observées sur les profils UHPLC-MS/MS et dans les réseaux moléculaires.

Nous avons dosé des AHLs de quatre longueurs de chaînes différentes (C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> et C<sub>14</sub>) non fonctionnalisées, fonctionnalisées oxo et fonctionnalisées OH (Annexe S32) et rapporté cette proportion à la quantité d'extrait obtenue (Annexe 33). Sachant que la dégradation de ces AHLs s'effectue lorsque la température augmente, nous avons également mesuré la proportion en AHLs hydrolysées dans les extraits.<sup>343</sup> Suite à la saponification et à l'analyse UHPLC-MS/MS des précédents standards (Partie 10.4.2 p.191), il a été possible d'obtenir des droites de calibration pour le dosage des 3-OH-HSLs hydrolysées (Annexe S31). En revanche, le dosage des 3-oxo-HSLs hydrolysées n'a pas été possible puisque la saponification de ces AHLs suivant la méthode utilisée a entraîné la formation de produits de réarrangement dont la structure n'a pas pu être clairement identifiée.

Pour la souche BSNB-0661 (*Paraburkholderia* sp.2), les dosages des AHLs montrent une présence majoritaire de 3-oxo-HSL à 15 et 20°C : par exemple, la 3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL est mesurée à la concentration de 4,8 µg/mg d'extrait à 15°C et à 5,9 µg/mg d'extrait à 20°C. De même, la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL est mesurée à la concentration de 9,1 µg/mg d'extrait à 15°C et à 11,8 µg/mg d'extrait à 20°C. En revanche, cette production diminue au sein de la souche cultivée à 28°C tandis que la proportion en AHLs fonctionnalisées OH augmente (Figure VI. 21) : la 3-OH-C<sub>10</sub>-HSL est mesurée à 3,0 µg/mg d'extrait et la 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL à 6,6 µg/mg d'extrait tandis que les équivalents oxo sont mesurés à 1,1 et 2,2 µg/mg d'extrait à cette température respectivement. Une quantité équivalente de 3-OH-HSLs hydrolysées est mesurée à cette température.

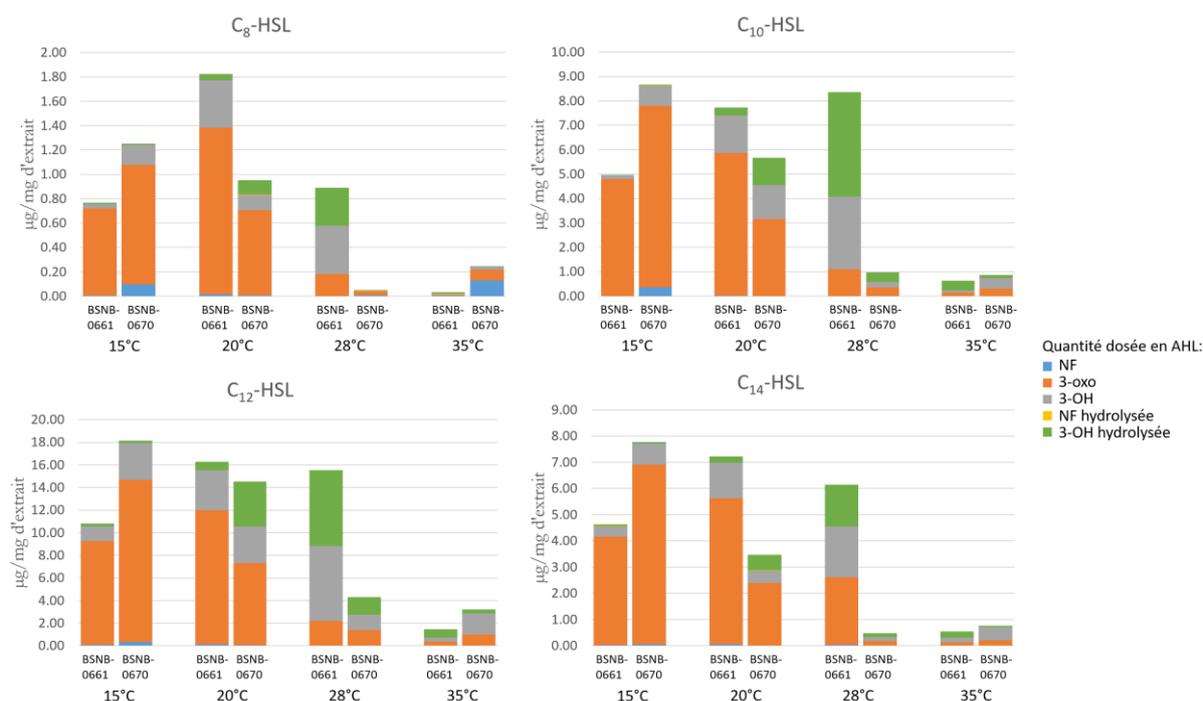


Figure VI. 21. Dosage des C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> et C<sub>14</sub>-HSL suivant leur fonctionnalisation dans les extraits de BSNB-0661 et BSNB-0670 cultivées à différentes températures.

La souche BSNB-0670 (*Paraburkholderia* sp.8) produit également majoritairement des AHLs fonctionnalisées oxo à la température de 15°C (Figure VI. 21) : la 3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL est mesurée à la concentration de 7,4 µg/mg d'extrait et la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL à la concentration de 14,3 µg/mg d'extrait. Pour cette souche, la diminution de la proportion en oxo-AHLs au profit d'une augmentation de la production en OH-HSL est visible à la température de 20°C. A partir de la température de 20°C, la dégradation des 3-OH-HSLs s'effectue, et il semble y avoir toujours un ratio d'environ 50/50 entre la proportion en 3-OH-HSL hydrolysées et non hydrolysées.

### 6.3.4. Discussion

Grâce aux dosages des AHLs fonctionnalisées 3-oxo et 3-OH pour des longueurs de chaîne C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> et C<sub>14</sub>, des observations ont pu être faites sur la production en AHLs. À des températures de culture comme 10 et 35°C, les extraits de ces souches ne contiennent pas ou peu d'AHLs après une semaine de culture, ce qui est certainement lié à leur capacité de croissance à ces températures. Aux températures de 15, 20 et 28°C, la production en AHLs est différente pour une même durée de culture. En effet, la production en AHLs fonctionnalisées 3-oxo est plus importante à des températures plus basses (à 15 et 20 °C pour BSNB-0661 et à 15°C pour BSNB-0670). L'augmentation de la température de culture à 28°C entraîne une diminution de cette production

en 3-oxo-HSLs, au profit des 3-OH-HSLs dans le cas de BSNB-0661. Pour des cultures d'une semaine de BSNB-0670, la diminution en 3-oxo-HSLs est également observable à partir de 20°C, mais contrairement au cas de BSNB-0661, la production de 3-OH-HSL semble moins stimulée.

Ces deux souches ont donc la même tendance dans la production d'AHLs fonctionnalisées à sept jours de culture mais à des températures différentes. Cette différence de comportement entre les deux souches peut s'expliquer d'après leur taxonomie différente pouvant impacter leur réponse biosynthétique.

Pour les deux souches, on observe au-dessus d'une certaine température, une augmentation de l'hydrolyse des 3-OH-HSLs après une semaine de culture (entre 20 et 28°C pour BSNB-0661 et entre 15 et 20°C pour BSNB-0670). La présence de 3-OH-HSLs hydrolysées a été observée dans l'analyse d'un extrait AcOEt n'ayant pas subi de partition à l'eau ainsi qu'un extrait au dichlorométhane de BSNB-0670 cultivée à 28°C. Ainsi, le lavage à l'eau des extraits et l'emploi de l'acétate d'éthyle ne sont apparemment pas responsables de l'hydrolyse de la lactone. L'hydrolyse des AHLs est connue pour s'effectuer à des pH basiques, entraînant une saponification.<sup>343</sup> Nous avons mesuré le pH du milieu gélosé à 3 donc relativement acide et le pH du tapis bactérien à 7. Dans cette étude, nous estimons que ce facteur n'a pas participé à la dégradation des AHLs.

Ces observations rejoignent celles de Yates *et al.* indiquant que l'hydrolyse des AHLs est réalisée au cours de la culture bactérienne.<sup>343</sup> Ayant cultivé la souche en milieu liquide, ils observent l'hydrolyse des 3-oxo-HSLs durant la phase stationnaire de croissance. Selon eux, cette hydrolyse est due à l'augmentation du pH par relargage d'ammoniac dans le milieu après dégradation aérobie de sources d'énergie. Néanmoins, leur étude ne traite pas des AHLs fonctionnalisées OH. Curieusement, la proportion en OH-HSL dégradée ne semble jamais excéder la proportion en OH-HSL dans nos dosages.

Sur milieu solide, nous n'avons pas pu mesurer la croissance bactérienne, cependant l'idée que ces différences de production en AHLs soient reliées à la croissance par l'intermédiaire de la température est hautement envisageable : la production de 3-oxo-HSLs se ferait lors de la phase exponentielle de croissance bactérienne, puis la production en 3-OH-HSL et la dégradation des AHLs deviendrait dominante lors de la phase stationnaire de croissance. La différence observée dans la production d'AHLs lors de la pousse de la bactérie à différentes températures serait due à l'impact de cette température sur la croissance bactérienne.

#### 6.4. Discussion générale et conclusion

Cette étude a été préalablement initiée afin d'identifier les métabolites responsables de l'activité quorum quenching sur *S. aureus* des extraits des souches BSNB-0656, -0658 et -0661 (*Paraburkholderia* sp.2), représentant plusieurs isolats de la même espèce. Des AHLs avec différentes longueurs de chaînes et différentes fonctionnalisations en position 3 (oxo/OH) ont été isolées et identifiées à partir de l'extrait de BSNB-0656.

D'après nos résultats, l'activité QQ sur *Chromobacterium violaceum* CV026 de cet extrait est due à cette présence d'AHLs. Il a déjà été montré que ces molécules possèdent suivant la longueur de la chaîne un effet activateur de quorum (< C8) ou inhibiteur de quorum (> C10) sur les bactéries à Gram négatif.<sup>316</sup>

En revanche, l'activité de l'extrait de BSNB-0656 sur le QS de *S. aureus* a été perdue lors de la culture à grande échelle. Ce problème récurrent lors du travail sur les bactéries, sensibles aux perturbations et mutations, a ici été étonnant du fait de l'absence de différences chimiques entre l'extrait initial actif et l'extrait issu de la culture à grande échelle. Les seules variations reposent

sur les différences d'intensité des signaux sur les profils HPLC. Ainsi, à première vue, les AHLs ne semblent pas être les métabolites responsables de l'activité QQ initiale sur *S. aureus* de nos extraits. De plus, de nombreux extraits de *Paraburkholderia* sp. n'ont jamais montré d'activité QQ chez *S. aureus* lors du premier criblage biologique alors que le réseau moléculaire indique la présence d'AHLs dans ces extraits.

Une précédente étude menée par Qazi *et al.* montre que les 3-oxo-HSL de longueur C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> et C<sub>14</sub> antagonisent significativement la croissance et la production de facteur de virulence chez *S. aureus* à des concentrations autour de 50 µM, la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et la 3-oxo-C<sub>14</sub>-HSL étant les plus actives. Ces AHLs agiraient entre autres sur le système *agr* de *S. aureus*.<sup>342</sup> Cette étude semble initialement en contradiction avec nos observations.

La 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL est la molécule majoritaire de notre extrait BSNB-0656 réalisé à grande échelle. D'après nos tests d'activité, l'activité sur le QQ de CV026 d'une AHL fonctionnalisée OH semble plus faible que l'activité de l'AHL de même longueur fonctionnalisée oxo. Qazi *et al.* n'ayant pas testé l'activité des AHLs fonctionnalisés OH sur le QS de *S. aureus*, le fait de ne pas retrouver la même activité QQ sur *S. aureus* que dans cette étude peut être expliqué par la présence majoritaire de 3-OH-HSL comparé à la 3-oxo-HSL.

Néanmoins, nous avons déterminé que la température de culture impacte les proportions produites par les souches en AHLs fonctionnalisées oxo, OH ou hydrolysées. Pour la souche BSNB-0661, les extraits réalisés sur des cultures d'une semaine à 15 et 20°C indiquent une production préférentielle en 3-oxo-HSLs par rapport aux 3-OH-HSLs. Entre 20 et 28°C, un « turnover » s'effectue avec cette fois-ci une présence préférentielle de 3-OH-HSLs dégradées ou non dans les extraits de culture à 28°C. La même tendance se retrouve dans les extraits de culture de *Paraburkholderia* BSNB-0670 mais à des températures différentes : le « turnover » dans le ratio oxo/OH se réalise entre 15 et 20 °C pour des cultures d'une semaine.

Ce phénomène peut être lié à la croissance bactérienne, de précédentes études ayant montré l'hydrolyse des AHLs lors des phases stationnaires. Au vu des activités biologiques des AHLs et de leur implication sur de nombreux phénotypes de la bactérie, la forte production en 3-oxo-HSL assurerait la compétitivité et la défense de la souche. En effet, les 3-oxo-HSLs ont donné les plus fortes activités comparativement aux 3-OH. En phase stationnaire, une auto-régulation de la bactérie pourrait s'effectuer *via* l'hydrolyse des AHLs, la diminution de la production de 3-oxo-HSLs et la production préférentielle de 3-OH-HSLs. Il est notamment indiqué dans la littérature la présence d'un gène de répression : *rasL*, permettant de diminuer la production de 3-oxo-HSLs.<sup>336</sup> Pour lier ce phénomène à la croissance bactérienne, l'étude devrait être répétée en analysant les extraits de ces souches le long d'une semaine de culture, permettant de constater l'évolution de la production en AHLs au cours du développement de la bactérie.

Avec ces éléments, il est alors possible de proposer une explication quant à la perte de l'activité de l'extrait de BSNB-0656 issu de la culture à grande échelle. En effet, malgré une température et un temps de culture identique, l'extrait actif a dû être réalisé alors que la production en 3-oxo-HSL était toujours maximale au sein de la bactérie. Nous pensons qu'un élément a dû affecter sa croissance et la rendre plus lente. Ceci peut être dû à l'ensemencement à partir d'un cryotube placé à -80°C. La culture à grande échelle a été réalisée à partir de la souche repiquée plusieurs fois possédant certainement un temps de croissance « normal » et donc avec une production en 3-oxo-HSLs diminuée. La concentration en 3-oxo-HSL étant diluée, il est possible que cela entraîne une perte d'activité avec un seuil de sensibilité de *S. aureus* pour ces molécules non atteint.

En revanche, pour ces extraits, l'activité QQ des AHLs sur *C. violaceum* CV026 a été maintenue compte tenu de la grande sensibilité de cette souche aux AHLs à longues chaînes.

Du fait des propriétés biologiques que peuvent induire ces molécules sur d'autres bactéries à Gram négatif (comme *C. violaceum*) ou bien des bactéries à Gram positif (comme *S. aureus*), leur présence peut conférer à ces souches de *Paraburkholderia* sp.2 et sp.8 un avantage compétitif au sein de la plante hôte.<sup>316,342</sup> En effet, outre leur rôle de régulateur de la coopération bactérienne par le QS, il a été montré que la concentration en AHLs, produites par les endophytes, peut être détectée par les plantes-hôtes et affecter la régulation transcriptionnelle, la réponse aux stress et la production hormonale de la plante.<sup>344,345,346,347</sup>

---

<sup>344</sup> Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., *et al.*, The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling Behav.* **2009**, *4*, p. 701–712.

<sup>345</sup> Mathesius U., Mulders S., *et al.*, Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial Quorum-Sensing signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, p. 1444–1449.

<sup>346</sup> Hernández-Reyes C., Schenk S. T., *et al.*, *N*-acyl-homoserine lactones-producing bacteria protect plants against plant and human pathogens. *Microb. Biotechnol.* **2014**, *7*, p. 580–588.

<sup>347</sup> von Rad U., Klein I., *et al.*, Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-*DL*-homoserine-lactone, a bacterial Quorum Sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* **2008**, *229*, p. 73–85.

## VII. Activité antibactérienne des extraits d'endophytes contre *S. aureus*

Les 197 extraits à l'AcOEt des endophytes isolés (66 bactéries et 131 champignons) ont été testés pour leur activité antibactérienne contre le staphylocoque doré résistant à la méticilline (SARM). Sept extraits montrent une concentration minimale inhibitrice (CMI) inférieure à 64 µg/mL et sont considérés comme actifs (Annexe S1) :

- trois extraits sont issus de champignons du genre *Fusarium* BSNB-0575, -0651 et -0303 et possèdent des CMIs de 16 ou 32 µg/mL,
- un extrait provient de la souche BSNB-0732 identifiée comme *Akanthomyces attenuatus* et possède une CMI ≤ 8 µg/mL.
- les trois derniers extraits sont issus de deux bactéries du genre *Luteibacter* (BSNB-0719 et BSNB-0721) et d'une bactérie du genre *Bacillus* (BSNB-0730) et possèdent des CMIs de 32, 64 et 64 µg/mL respectivement. D'après les empreintes protéiques MALDI-TOF MS identiques entre les bactéries BSNB-0719 et BSNB-0721, les deux souches *Luteibacter* sp. sont considérées comme deux isolats de la même espèce.

La cytotoxicité sur des cellules MRC-5 a été évaluée. Seuls les extraits des trois bactéries ne sont pas cytotoxiques, avec un index de sélectivité supérieur à 1.

Étant donné la grande diversité taxonomique de nos souches, nous avons souhaité utiliser les réseaux moléculaires afin de représenter l'ensemble de la diversité chimique des endophytes. Cette étude peut permettre notamment de choisir les extraits actifs les plus prometteurs pour l'isolement de métabolites bioactifs nouveaux. Ce travail a donné lieu à une publication dans la revue *International Journal of Molecular Sciences* en février 2019.<sup>348</sup>

### 7.1. Analyse de la diversité chimique des extraits par les réseaux moléculaires

Chaque extrait AcOEt provenant des endophytes de notre communauté a été analysé par UHPLC-MS/MS chez nos collaborateurs à l'Université de Genève. Les données ont ensuite été retraitées par le logiciel MZmine 2 afin de générer des réseaux moléculaires (Partie 10.4.3 p.192).<sup>204,349</sup>

Dans ces réseaux moléculaires, la quantification relative des ions (nœuds) dans les extraits est représentée par une répartition en secteur avec différentes couleurs suivant leur provenance. Les proportions de ce diagramme correspondent aux aires respectives du signal de l'ion dans les profils chromatographiques.

#### 7.1.1. Observation de la diversité chimique des champignons endophytes

Un réseau moléculaire a été construit avec les données UHPLC-MS/MS des 131 extraits à l'AcOEt des champignons endophytes de notre communauté. Ce réseau est composé de 28 719 nœuds. Des nœuds issus des quatre extraits actifs se retrouvent dans douze clusters différents (Figure VII. 1).

<sup>348</sup> Barthélemy M., Elie N., *et al.*, Structural identification of antibacterial lipids from amazonian palm tree endophytes through the molecular network approach. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, p. 2006.

<sup>349</sup> Pluskal T., Castillo S., *et al.*, MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, p. 395.

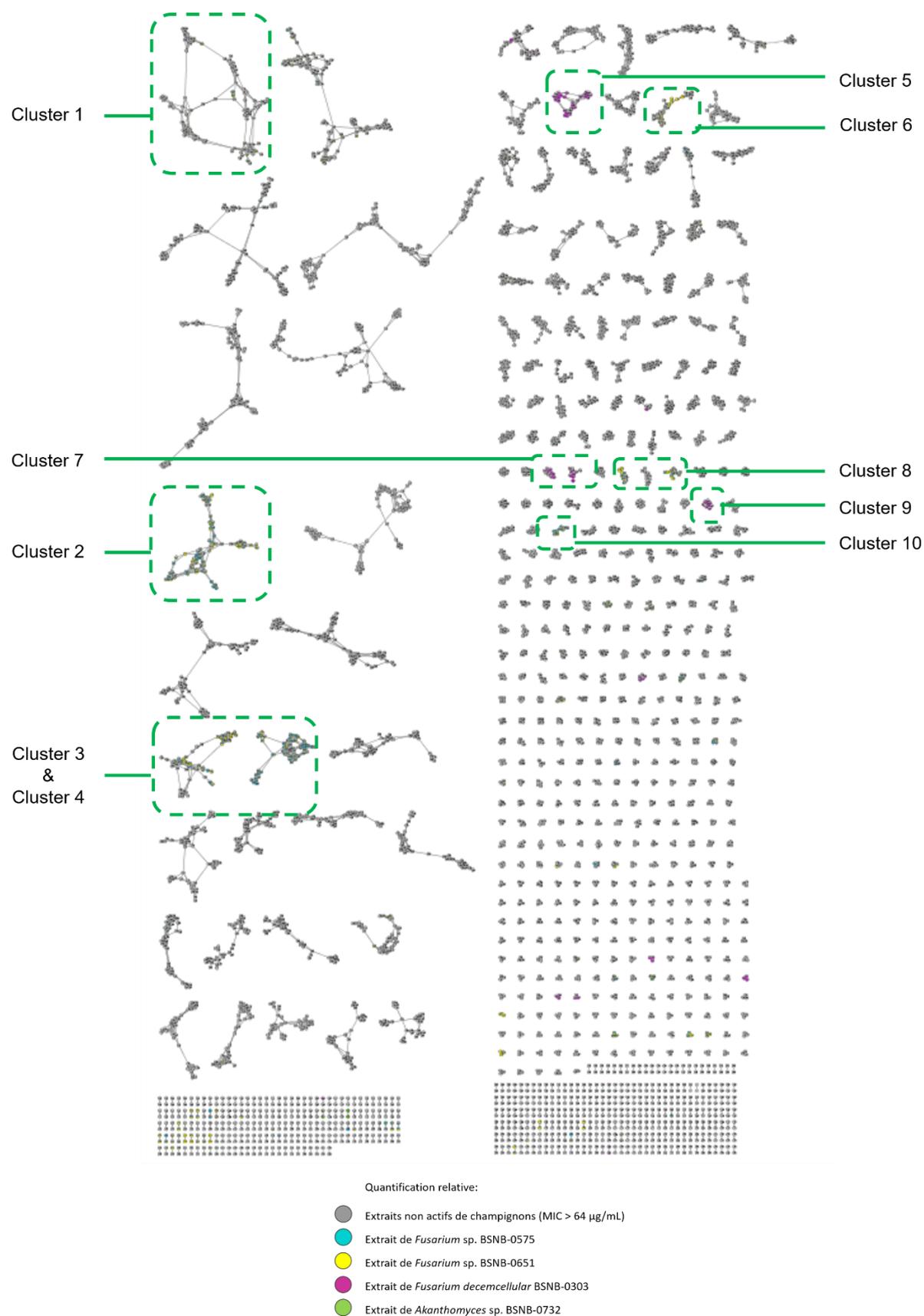


Figure VII. 1. Réseau moléculaire construit avec les données UHPLC-MS/MS des 131 extraits AcOEt des champignons endophytes. Les clusters annotés regroupent des ions provenant d'extraits de champignons actifs contre SARM. Zoom en annexes

Sept de ces clusters renferment des nœuds issus des deux souches de *Fusarium* sp. (BSNB-0575 et -0651) (Annexe S34). Un de ces clusters regroupe des analogues de depsipeptides d'après la comparaison des données MS/MS avec celles de bases de données. En effet, les ions à  $m/z$  640,42, 654,43 et 668,45 ont une correspondance spectrale avec des depsipeptides formés de valines, de leucines et/ou isoleucines (Figure VII. 2). Ces composés sont également retrouvés dans les extraits de *Fusarium* sp. (BSNB-0581 et -0647) possédant une CMI de 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ces différences d'activité entre les extraits de *Fusarium* sp. peuvent être expliquées par les proportions relatives des métabolites dans les extraits (Annexe S35).

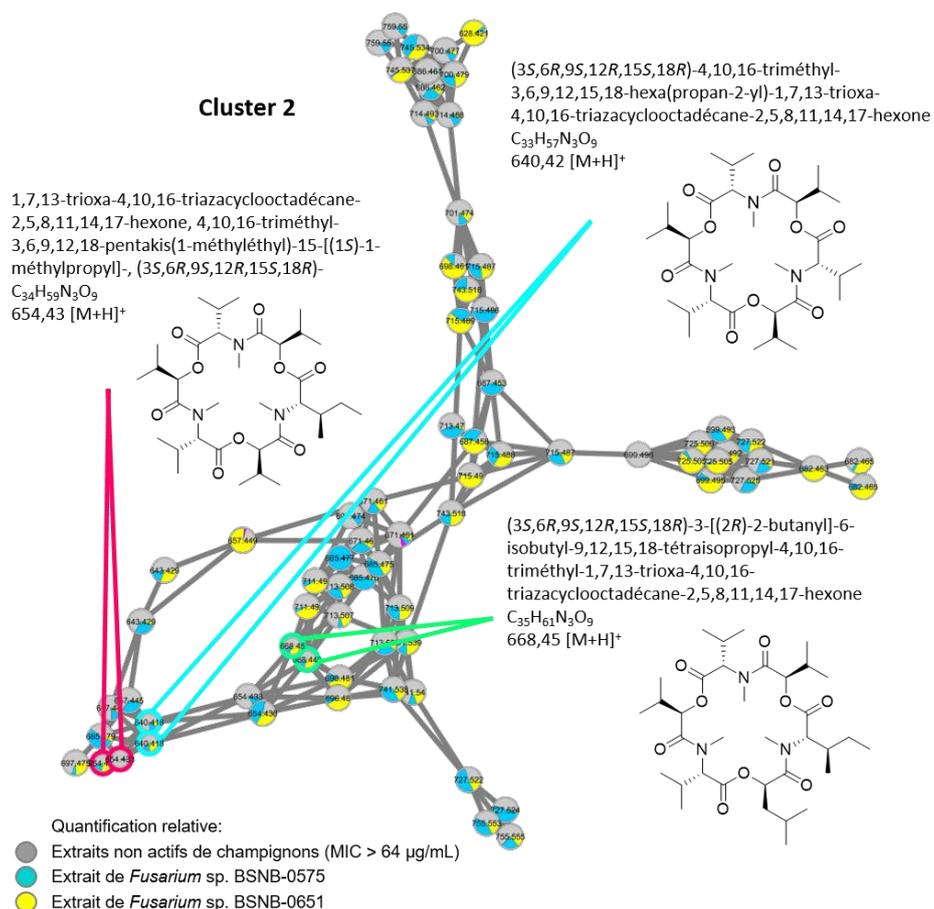


Figure VII. 2. Zoom du cluster 2 issu du précédent réseau moléculaire. Ce cluster regroupe des ions provenant d'extraits de *Fusarium* sp. qui semblent être des analogues de depsipeptides d'après leur spectre de fragmentation.

Des nœuds issus de l'extrait de *Fusarium decemcellulare* BSNB-0303 se retrouvent dans quatre différents clusters (Annexe S34). Ces clusters renferment également des ions analogues de peptides ou de depsipeptides. En effet, le depsipeptide exumolide A formé de phénylalanines, prolines et leucines est annoté dans un des clusters. L'observation des spectres MS/MS des nœuds des trois autres clusters montre des pertes de neutre caractéristiques de la fragmentation d'un peptide : 113,08 (leucine/isoleucine), 99,07 (valine), 71,04 (alanine) et 101,05 (thréonine). Sans identifier les molécules, nous pouvons supposer que ces souches du genre *Fusarium* produisent de nombreux peptides.

De même, l'extrait de la souche *Akanthomyces* BSNB-0732 présente des ions se retrouvant dans un cluster d'analogues de cyclopeptides d'après la correspondance spectrale de nœuds avec les GameXPptides A, B et C (Annexe S34).

### 7.1.2. Observation de la diversité chimique des bactéries endophytes

Un réseau moléculaire a été formé avec les données UHPLC-MS/MS des 66 extraits à l'AcOEt des bactéries endophytes de notre communauté. Ce réseau généré est composé de 13 763 nœuds (Figure VII. 3. A).

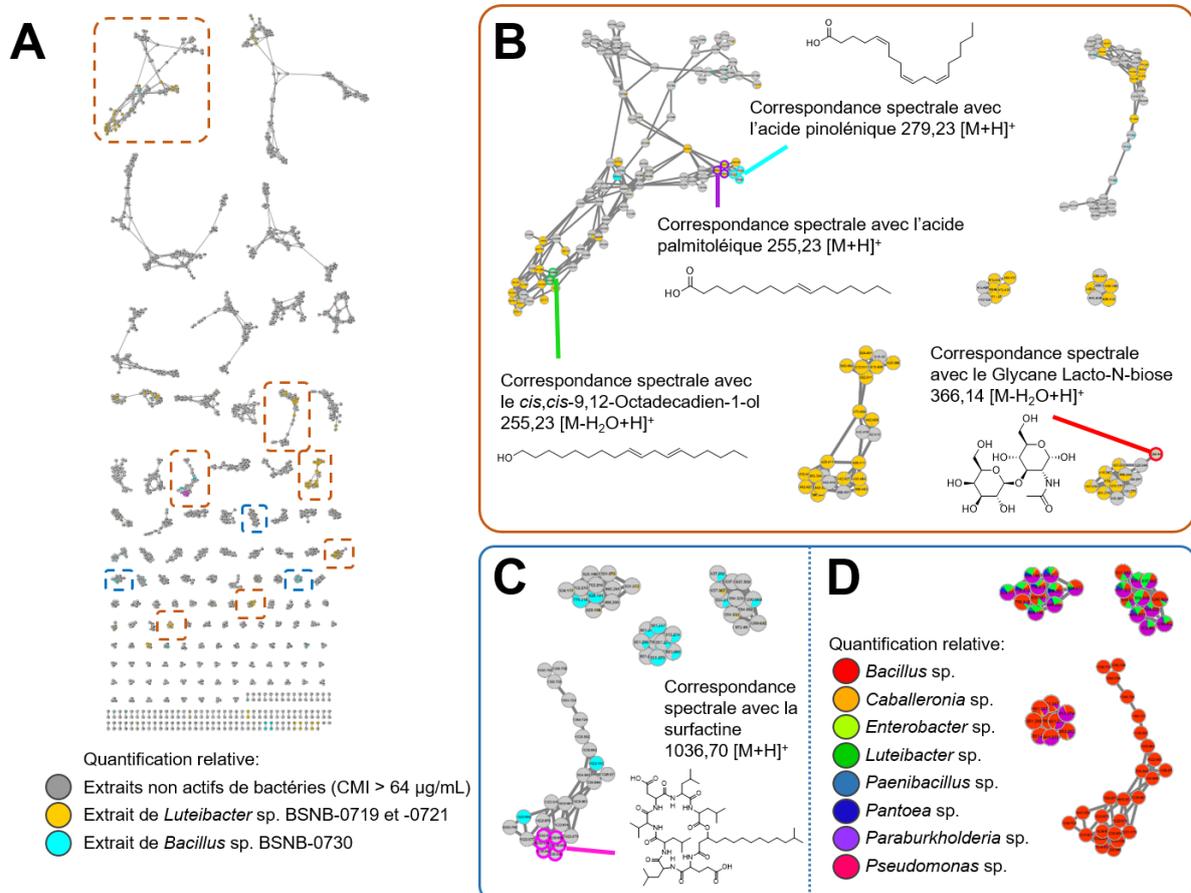


Figure VII. 3. A) Réseau moléculaire construit avec les données UHPLC-MS/MS des 66 extraits AcOEt des bactéries endophytes. B) Clusters contenant des ions provenant des extraits de *Luteibacter* sp. C) Clusters contenant des ions provenant de l'extrait de la souche active de *Bacillus* sp. D) Répartition des ions des clusters de C) suivant le genre bactérien des extraits d'où ils proviennent.

Ce réseau montre des clusters d'ions appartenant spécifiquement aux deux extraits actifs de *Luteibacter* sp. BSNB-0719 et BSNB-0721 (Figure VII. 3. B). La comparaison des spectres de fragmentation des nœuds qui composent ces clusters avec les données MS/MS disponibles dans les bases de données montrent que ces extraits de *Luteibacter* sp. sont entre autres composés d'analogues d'acides gras. En revanche, les autres clusters spécifiques à ces deux souches indiquent une potentielle originalité chimique au sein de ces souches. Notamment, les signaux des ions à *m/z* 442,43, 456,44, 618,50 et 472,44 retrouvés dans un cluster de nœuds spécifiques aux souches *Luteibacter* sp. sont détectables sur le spectre MS de l'extrait (Figure VII. 4). Ces métabolites semblent plutôt apolaires car les signaux associés sont observés en fin de gradient sur phase inverse C<sub>18</sub>. Les spectres MS/MS de ces ions n'ont pas permis d'identifier de potentiels analogues par comparaison avec les spectres référencés dans les bases de données. Ces métabolites semblent donc intéressants à identifier structurellement.



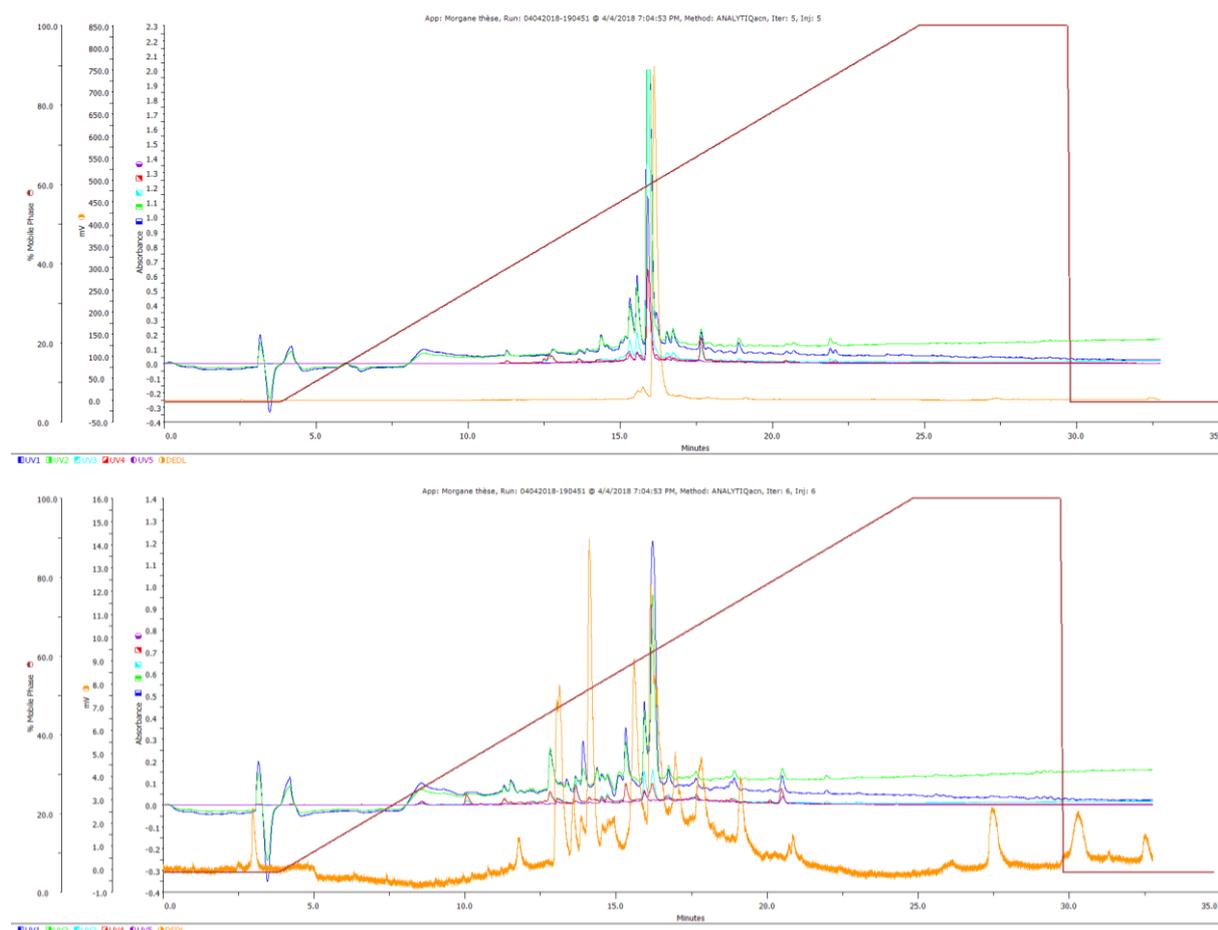


Figure VII. 5. Comparaison des profils UV (210 nm – bleu foncé, 220 nm – vert, 254 nm – bleu clair, 270 nm – rouge et 320 nm – violet) et DEDL (jaune) de l'extrait actif (en haut) et inactif (en bas) sur SARM de *Bacillus* sp. BSNB-0730.

Ce pic majoritaire est associé à un signal à  $m/z$  883,2625 pouvant être associé à plusieurs formules brutes d'après les prédictions. La formule brute  $C_{39}H_{42}N_6O_{18}$  (calc. 883,2628, err. -0,34 ppm) correspond entre autres à la bacillibactine, un sidérophore précédemment isolé de *Bacillus anthracis* et *B. subtilis*.<sup>351</sup> De plus, le spectre de fragmentation MS/MS du signal à  $m/z$  de 883,2625 (Annexe S36) est identique à celui de la bacillibactine (CCMSLIB00003739997) disponible dans la base de données MoNA (MassBank of North America). La bacillibactine peut posséder une activité antimicrobienne indirecte de par son effet chélatant du fer, rendant ce dernier indisponible pour la bactérie.

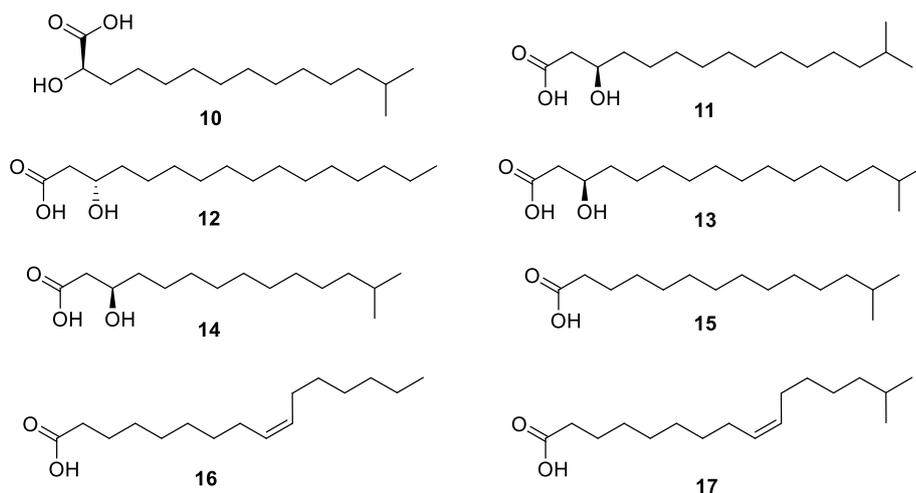
L'activité de cette souche n'ayant pas été retrouvée lors d'un second essai biologique, l'étude chimique de son extrait a alors été arrêtée.

### 7.3. Diversité chimique de *Luteibacter* sp. (BSNB-0721) et activité antibactérienne

L'extrait issu de la culture à grande échelle de BSNB-0721 est travaillé par fractionnement bioguidé. Huit composés purs ont été isolés à partir de trois fractions actives sur SARM. L'identification de ces molécules a été déterminée grâce aux données de masse haute résolution

<sup>351</sup> Dertz E. A., Xu J., et al., Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, p. 22–23.

ainsi que par l'analyse des spectres RMN (Annexe S37-S44). Ces composés sont identifiés comme étant des acides gras. Les différences entre ces molécules résident dans la longueur de la chaîne aliphatique (entre 15 et 17 carbones), la présence d'un méthyl en avant-dernière position de la chaîne et la présence d'un groupe hydroxyle en position 2 ou 3. L'acide (*R*)-2-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque (**10**) présente un groupement hydroxyle en position 2. Les acides (*R*)-3-hydroxy-14-méthylpentadécanoïque (**11**), (*S*)- $\beta$ -hydroxypalmitique (**12**), (*R*)-3-hydroxy-15-méthylhexadécanoïque (**13**) et (*R*)-3-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque (**14**) présentent un hydroxyle en position 3. L'acide 13-méthyltétradécanoïque (**15**) ne possède pas de groupement hydroxyle. La configuration de ces composés a été déterminée par la mesure du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les valeurs de la littérature.<sup>352,353,354</sup>



Les deux composés **16** et **17** présentent une double liaison sur leur chaîne aliphatique. La configuration de la double liaison est déterminée *Z* par la constante de couplage du multiplet ( $\delta_H$  5,35) mesurée à 11,3 Hz. La position de l'insaturation a été déterminée par l'analyse MS/MS de l'ester associé, comme décrit par Vrkoslav et Cvacka.<sup>355</sup> Après l'estérification des acides gras insaturés, les molécules sont ionisées en phase gazeuse par Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique (APCI) permettant la formation d'adduit  $[M+C_3H_5N]^+$ . L'analyse du spectre MS/MS permet d'attribuer la place de ces doubles liaisons en position 9 (Figure VII. 6 et annexe S45). Ces deux molécules sont identifiées comme étant l'acide (*9Z*)-hexadécenoïque (**16**) et l'acide 15-méthyl-(*9Z*)-hexadécenoïque (**17**).

Les acides gras isolés ont été testés pour leur activité antibactérienne contre SARM. Ces composés montrent des valeurs de CMI entre 128 et 32  $\mu\text{g/mL}$  (Tableau VII. 1). Le composé **16** est le plus actif et est composé d'une chaîne en C16 avec la présence d'une double liaison en position 9.

<sup>352</sup> Nakahata M., Imaida M., *et al.*, The preparation of optically pure 3-hydroxyalkanoic acid. The enantioface-differentiating hydrogenation of the C=O double bond with modified raney nickel. *BCSJ* **1982**, *55*, p. 2186–2189.

<sup>353</sup> Wohlrab A., Lamer R., *et al.*, Total synthesis of Plusbacin A3: a depsipeptide antibiotic active against vancomycin-resistant bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, p. 4175–4177.

<sup>354</sup> Kodato S., Nakagawa M., *et al.*, Synthesis of Cerebroside B1b with antiulcerogenic activity I. Synthesis of ceramides with optically active  $\alpha$ -hydroxypalmitic acids. *Tetrahedron* **1989**, *45*, p. 7247–7262.

<sup>355</sup> Vrkoslav V., Cvacka J., Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, p. 244–250.

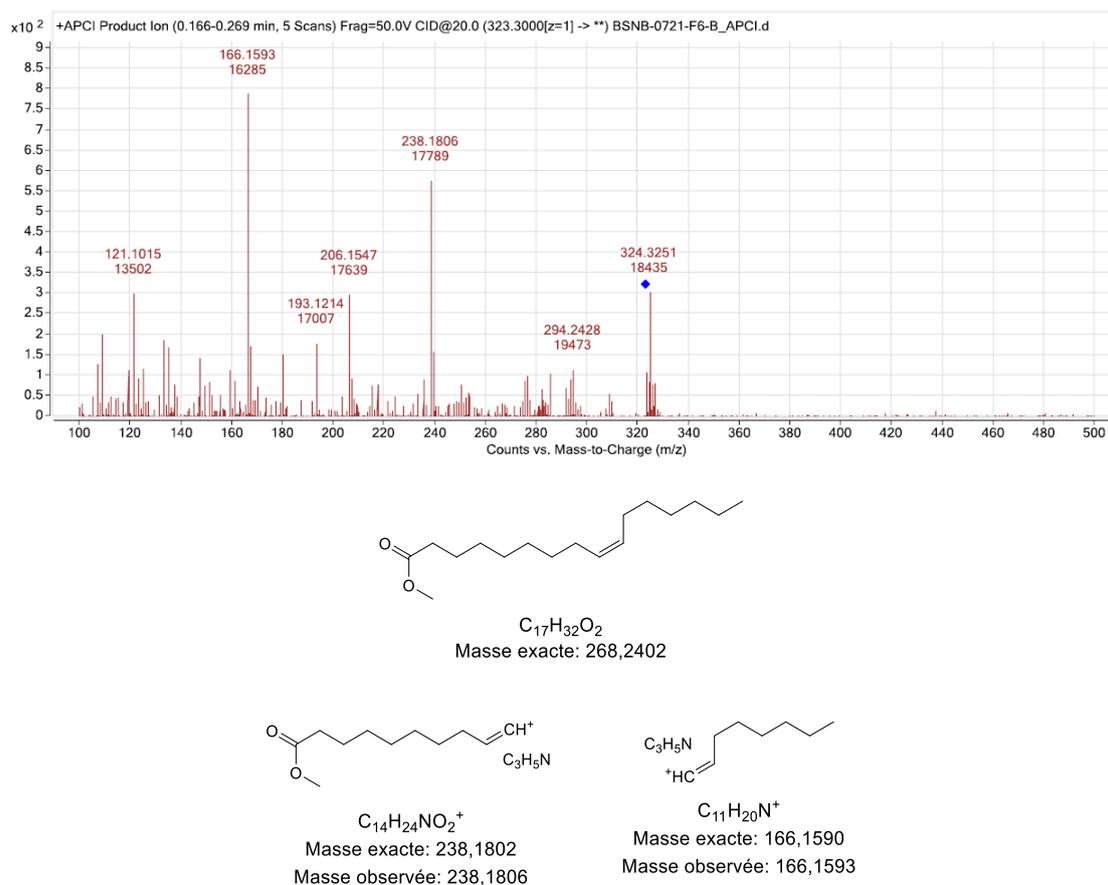


Figure VII. 6. Spectre MS/MS de l'ester méthylique de l'acide (Z)-hexadénoïque (**16**) permettant de déterminer la place de la double liaison en position 9 et 10.

Tableau VII. 1. Concentration minimale inhibitrice (CMI) des composés **10–17** contre *S. aureus* résistant à la méticilline.

	Acide gras	CMI contre SARM <sup>1</sup> (µg/mL)
<b>10</b>	<chem>CC(C)CCCCCCCC(O)C(=O)O</chem>	64
<b>11</b>	<chem>CC(C)CCCCCCCC(O)C(O)C(=O)O</chem>	128
<b>12</b>	<chem>CCCCCCCC(O)C(O)C(=O)O</chem>	128
<b>13</b>	<chem>CC(C)CCCCCCCC(O)C(O)C(=O)O</chem>	128
<b>14</b>	<chem>CC(C)CCCCCCCC(O)C(O)C(=O)O</chem>	ND
<b>15</b>	<chem>CC(C)CCCCCCCC(O)C(=O)O</chem>	128
<b>16</b>	<chem>CCCCCCCCC=CCCCCCCC(=O)O</chem>	32
<b>17</b>	<chem>CC(C)CCCCCCCC=CCCCCCCC(=O)O</chem>	64

<sup>1</sup> Contrôle positif: Vancomycine (CMI = 1 µg/mL). ND = Non déterminé

#### 7.4. Discussion et conclusion

Parmi les 197 extraits testés pour leur activité antibactérienne contre *S. aureus* résistant à la méticilline, sept extraits ont une CMI  $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ . Les extraits de champignons possédant une activité antibactérienne (trois souches de *Fusarium* et une souche *Akanthomyces*) ont également montré une activité cytotoxique sur les cellules MRC-5. L'activité antibactérienne de ces souches dépend potentiellement de la présence de métabolites secondaires cytotoxiques. En utilisant une approche par les réseaux moléculaires, des molécules spécifiques à ces souches ont été observées et se révèlent être structurellement proches d'analogues de depsipeptides et de cyclopeptides. Ces molécules sont connues pour pouvoir posséder une activité cytotoxique.<sup>356</sup> Les depsipeptides ont été fréquemment isolés de champignons du genre *Fusarium* : par exemple, trois pentapeptides cycliques et un lipopeptide cyclique fusaristatin A ont été isolés de l'espèce *Fusarium decemcellulare*.<sup>357</sup> Le genre *Akanthomyces* est connu pour être un champignon parasite d'araignées. De précédentes études chimiques sur ce genre a permis l'identification de dérivé glycosylés et de dérivées pyrone.<sup>358,359</sup> De précédentes études ont montré que des souches fréquemment retrouvées comme entomopathogènes peuvent être isolées lors de la recherche d'endophyte.<sup>360</sup> La prédiction de nombreux peptides dans ces quatre extraits fongiques par l'analyse du réseau moléculaire pourrait expliquer leur activité biologique. D'après la littérature, c'est la première fois que de tels composés sont détectés au sein des souches du genre *Akanthomyces*.

Sur les 66 extraits des bactéries endophytes, trois ont montré une activité antibactérienne sans cytotoxicité sur les cellules MRC-5 : les deux souches *Luteibacter* BSNB-0719 et -0721 et une souche *Bacillus* (BSNB-0730). L'analyse du réseau moléculaire des 66 extraits bactériens a montré que les extraits de *Luteibacter* possèdent des métabolites propres à eux.

D'après les données organisées dans le réseau moléculaire, l'extrait de *Bacillus* sp. BSNB-0730 ne possède pas une chimie différente des extraits à l'AcOEt des autres souches de *Bacillus* de la communauté. L'analyse des profils HPLC entre un extrait actif et un extrait non-actif de BSNB-0730 permet d'observer la présence d'un pic majoritaire dans l'extrait actif. D'après la mesure de masse à haute résolution ainsi que la comparaison du spectre de fragmentation, ce pic pourrait être associé à la bacillibactine, un sidérophore précédemment isolé du genre *Bacillus*.<sup>351</sup> L'absence de données sur l'activité antimicrobienne de la bacillibactine ne nous permet pas de conclure si cette molécule est bien responsable de l'activité initiale de *Bacillus* sp. BSNB-0730.

Le genre *Luteibacter* a été pour la première fois isolé de la rhizosphère d'orge (*Hordeum vulgare*).<sup>231</sup> À ce jour, trois différentes espèces ont été décrites : *L. anthropi*, *L. yeojuensis* et *L. rhizovicinus*.<sup>231,283</sup> Ce genre n'a jamais été étudié chimiquement jusqu'alors et l'analyse des données UHPLC-MS/MS des extraits a montré la présence de métabolites inconnus spécifiques à cette souche ainsi que des dérivés d'acide gras. L'extrait de *Luteibacter* sp. (BSNB-0721) a été étudié afin d'identifier les composés actifs contre SARM. Huit dérivés d'acides gras ont été isolés comme étant les composés majoritaires de l'extrait. Ces acides gras sont responsables de l'activité antibactérienne de l'extrait. En revanche, les ions ciblés ( $m/z$  442,43, 456,44, 618,50 et 472,44) appartenant aux clusters spécifiques à *Luteibacter* dans le réseau moléculaire n'ont pas été

<sup>356</sup> Wang X., Gong X., *et al.*, Structural diversity and biological activities of cyclic depsipeptides from fungi. *Molecules* **2018**, *23*, p. E169.

<sup>357</sup> Li G., Kusari S., *et al.*, Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53. *RSC Advances* **2016**, *6*, p. 54092–54098.

<sup>358</sup> Helaly S. E., Kuephadungphan W., *et al.*, Five unprecedented secondary metabolites from the spider parasitic fungus *Akanthomyces novoguineensis*. *Molecules* **2017**, *22*, p. 991.

<sup>359</sup> Kuephadungphan W., Helaly S. E., *et al.*, Akanthopyrones A-D,  $\alpha$ -pyrones bearing a 4-O-methyl- $\beta$ -D-glucopyranose moiety from the spider-associated ascomycete *Akanthomyces novoguineensis*. *Molecules* **2017**, *22*, p. E1202.

<sup>360</sup> Vega F. E., Posada F., *et al.*, Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Control* **2008**, *46*, p. 72–82.

retrouvés lors du fractionnement de l'extrait. Au vu de leur polarité, nous supposons que les conditions de fractionnement sur chromatographie flash ne leur ont pas permis d'être élués durant le gradient eau/acétonitrile. Ces composés se retrouvent seulement lors de l'injection de l'extrait dans les conditions analytiques.

L'activité antibactérienne et antifongique des acides gras a déjà été étudiée. En effet, même si leur mécanisme d'action n'est pas clairement identifié, il est généralement accepté que l'activité des acides gras réside dans la perturbation de la membrane cellulaire.<sup>361,362</sup> Plusieurs études ont analysé les corrélations entre la structure des acides gras et leur activité antibactérienne et quelques tendances ont été identifiées. Les acides gras saturés composés d'une chaîne de 12 carbones sont les plus actifs, et l'activité bactérienne décroît si la chaîne s'allonge ou diminue.<sup>361</sup> La présence d'une double liaison de configuration *Z* augmente l'activité antibactérienne tandis qu'une configuration *E* rend le composé inactif.<sup>363</sup> L'activité antibactérienne est également augmentée lorsque l'acide gras est composé d'un groupement carboxyle plutôt que d'un ester.<sup>364</sup> Ces données peuvent expliquer la plus forte activité des composés **16** et **17** dans notre étude, composés qui possèdent une double liaison *Z*. Nos observations montrent que l'activité antibactérienne d'un acide gras n'est pas impactée si la chaîne se termine par un groupement isopropyle. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 ne permet pas une augmentation de l'activité mais peut augmenter la solubilité de ces molécules.

---

<sup>361</sup> Bergsson G., Arnfinnsson J., *et al.*, Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* **2001**, *109*, p. 670–678.

<sup>362</sup> Parsons J. B., Yao J., *et al.*, Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, p. 5294–5304.

<sup>363</sup> Kabara J. J., Swieczkowski D. M., *et al.*, Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *2*, p. 23–28.

<sup>364</sup> Kodicek E., Worden A. N., The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms. *Biochem. J.* **1945**, *39*, p. 78–85.

## VIII. Analyses des souches endophytes du genre *Colletotrichum*

La communauté d'endophytes isolés des *Astrocaryum sciophilum* regroupe une quarantaine de souches identifiées génétiquement du genre *Colletotrichum* (Partie 4.2 p.71). Ce genre, largement distribué dans les zones tropicales comme dans les zones plus tempérées, est représenté par un grand nombre d'espèces (entre 29 et 700 suivant les interprétations taxonomiques).<sup>365</sup> Possédant un comportement biotrophe (colonisation des tissus vivants) pendant une partie de son développement, le genre *Colletotrichum* se retrouve en tant qu'endophytes dans les tissus sains.<sup>366</sup> Il a été montré que la présence de *Colletotrichum tofieldiae* au sein des racines améliorerait la croissance d'*Arabidopsis thaliana* en participant à un apport en phosphore.<sup>85</sup> Néanmoins, le genre *Colletotrichum* est plus connu en tant qu'un des groupes les plus importants de phytopathogènes.<sup>365</sup> Ces champignons causent des anthracnoses sur les parties aériennes et la pourriture des récoltes. De nombreuses espèces de plantes peuvent être touchées : cultures fruitières, maraîchères et plantes ornementales.<sup>365,366</sup>

La taxonomie du genre *Colletotrichum* est souvent modifiée en raison des nombreuses imprécisions d'identification.<sup>365</sup> Ces ambiguïtés, nous avons pu les constater lors de l'établissement d'une phylogénie de nos souches de *Colletotrichum* sp. sur la base du séquençage de la région ITS : toutes les souches montrent une similarité importante avec des séquences identifiées de *Colletotrichum gloeosporioides* d'après la comparaison BLAST. Cependant, les deuxièmes ou troisièmes séquences les plus proches renvoient à d'autres espèces comme *C. fructicola*, *C. karstii* ou *C. vietnamense* (Figure VIII. 1). Une identification de l'espèce d'après le séquençage du seul gène ITS n'est donc pas possible pour le genre *Colletotrichum*. D'ailleurs, Douanla-Meli *et al.* utilisent une analyse multilocus de 454 isolats de *Colletotrichum* sp. sur plusieurs régions de l'ADN (comme TUB2, ACT et GAPDH) pour identifier plus précisément les espèces de ce genre.<sup>367</sup>

L'activité biologique des extraits de nos isolats de *Colletotrichum* conforte également l'inexactitude du seul séquençage de la région ITS pour l'établissement d'une phylogénie de ce genre. En effet, la répartition en différents clusters sur l'arbre phylogénétique n'établit aucune corrélation avec l'activité cytotoxique des extraits de ces souches. Douze isolats *Colletotrichum* sp. possèdent un extrait à l'AcOEt présentant une viabilité cellulaire inférieure à 35% sur la lignée MRC-5, mais ces souches sont réparties sur différentes branches de l'arbre phylogénétique (Figure VIII. 1). La morphologie de ces champignons indique également que des souches différentes sont groupées au sein de la même branche phylogénétique.

---

<sup>365</sup> Dean R., Van Kan J. A. L., *et al.*, The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, p. 414–430.

<sup>366</sup> Silva C., Michereff S., Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. *Revista Caatinga* **2014**, *26*, p. 130–138.

<sup>367</sup> Douanla-Meli C., Unger J.-G., Phylogenetic study of the *Colletotrichum* species on imported citrus fruits uncovers a low diversity and a new species in the *Colletotrichum gigasporum* complex. *Fungal Biol.* **2017**, *121*, p. 858–868.

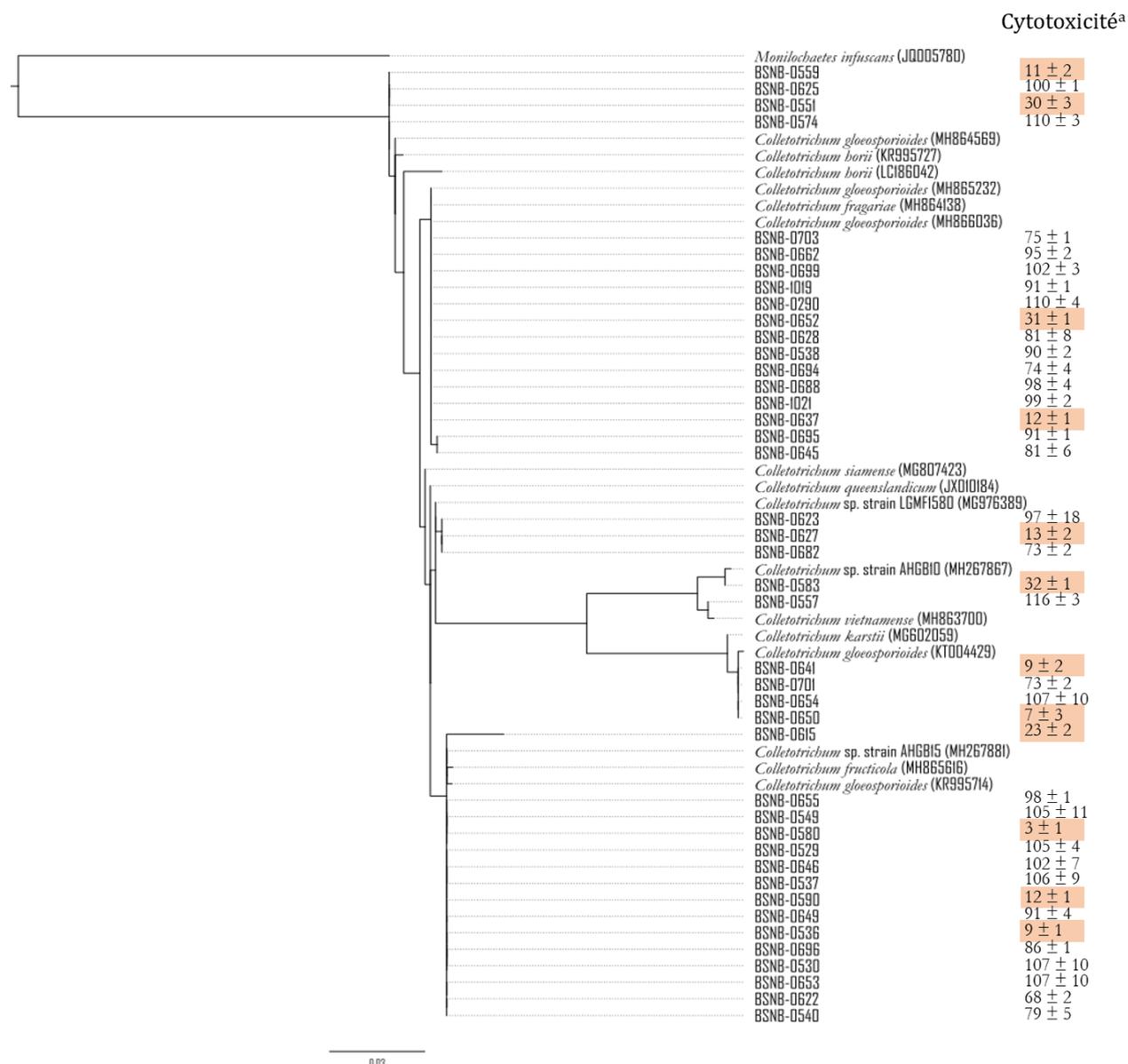


Figure VIII. 1. Arbre phylogénétique dérivé d'une analyse par maximum de vraisemblance d'un alignement de séquences ITS des souches *Colletotrichum* sp. de notre échantillonnage (BSNB-). Les séquences ITS les plus proches de *Colletotrichum* sp. référencées sur NCBI ont été déterminées par BLAST et incluses dans l'arbre. *Monilochaetes infuscans* (JQ005780) est utilisé comme groupe externe. <sup>a</sup> Cytotoxicité de l'extrait à l'AcOEt des souches à une concentration de 10 µg/mL : mesure de la viabilité sur cellules MRC-5 (%), contrôle positif : Docetaxel).

Afin de mieux appréhender les incertitudes d'identification des souches du genre *Colletotrichum*, nous avons analysé les empreintes protéiques MALDI-TOF MS des souches de notre échantillonnage. Cette discrimination des espèces par MALDI-TOF MS a pu être reliée à l'activité cytotoxique de l'extrait à l'AcOEt respectif de chaque souche. La diversité chimique de ces différentes espèces a été ensuite étudiée afin d'expliquer la différence d'activité de ces extraits.

### 8.1. Discrimination des souches de *Colletotrichum* suivant leur empreinte MALDI-TOF MS

Les empreintes protéiques obtenues en MALDI-TOF MS ont été comparées entre les quarante-deux isolats *Colletotrichum* sp. de notre communauté. Ces observations montrent que certaines empreintes sont communes à plusieurs isolats tandis que quinze isolats possèdent leur propre empreinte protéique. Considérant les précédents travaux dans la littérature sur la spécificité des empreintes protéiques MALDI-TOF suivant les taxons, nous assumons qu'une empreinte protéique réfère à une espèce ou sous-espèce du genre *Colletotrichum*. Ainsi, les vingt empreintes différentes obtenues à partir de ces 42 souches de *Colletotrichum* sont rangées en vingt taxons (Figure VIII. 2). Dix-huit de ces taxons (notées de *Colletotrichum* sp.1 à *Colletotrichum* sp.18) sont classées en un regroupement hiérarchique suivant le  $m/z$  des ions les plus intenses de l'empreinte (Figure VIII. 3 et Annexe S46). Sur une même branche sont positionnés tous les isolats de même empreinte protéique. Certaines branches sont séparées suivant la présence de protéines en commun (Annexe S46). Cette représentation est à opposer à celle d'un arbre phylogénétique puisqu'elle ne propose pas d'informations sur l'évolution des souches : ce regroupement se fait uniquement sur la base de similarité des empreintes protéiques permettant de discriminer les taxons les uns par rapport aux autres. Les souches BSNB-0703, BSNB-0290 et BSNB-0646 n'apparaissent pas dans ce regroupement en raison de la mauvaise qualité de leur empreinte spectrale, mais BSNB-0703 partage la même empreinte que *Colletotrichum* sp.6 et BSNB-0290 et BSNB-0646 ont des empreintes spécifiques à ces deux isolats (Annexe S46).

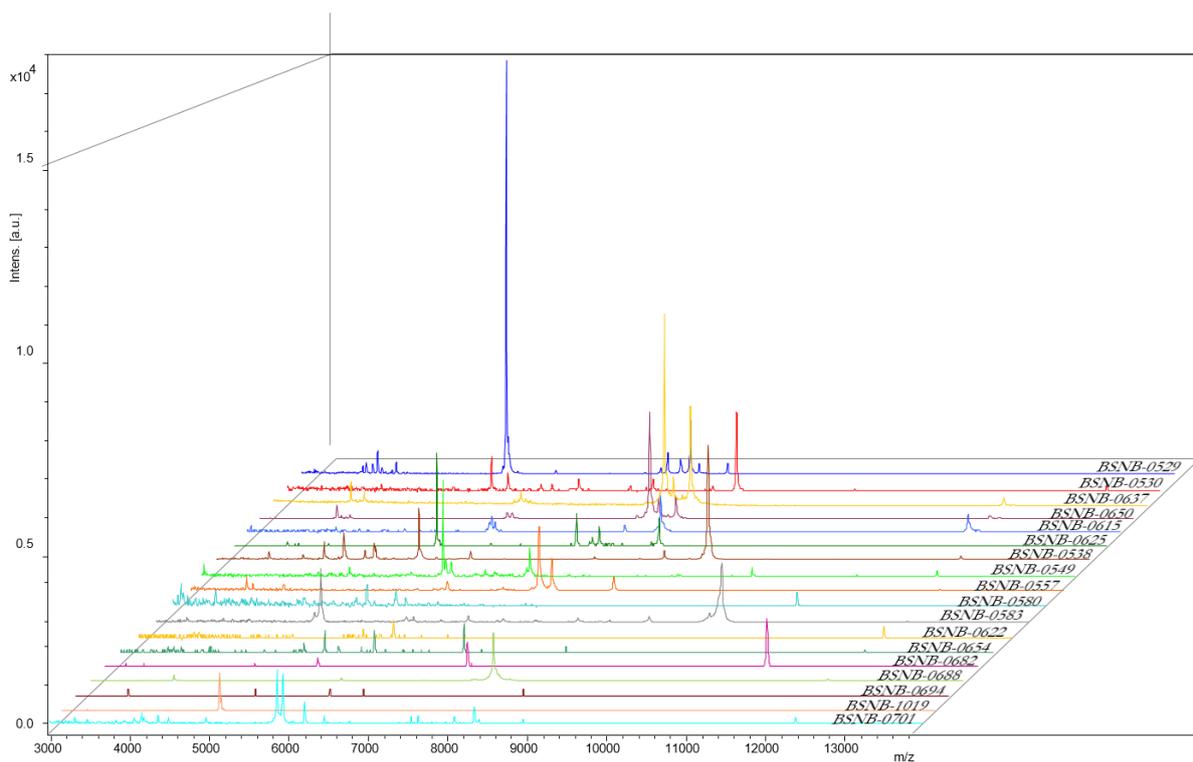


Figure VIII. 2. Comparaison des dix-huit différentes empreintes protéiques des souches de *Colletotrichum* sp. de notre communauté. Les empreintes protéiques spécifiques de BSNB-0290 et BSNB-0646 n'apparaissent pas dans cette figure à cause de leur faible intensité.

Suivant cette répartition, cinq espèces/sous-espèces de *Colletotrichum* possèdent un extrait à l'AcOEt présentant une viabilité cellulaire inférieure à 35% sur la lignée MRC-5 : *Colletotrichum* sp.1, sp.2, sp.11, sp.12 et sp.14. La corrélation entre la taxonomie et l'activité biologique des souches est ainsi mieux représentée. BSNB-0627 est le seul isolat sur les six de *Colletotrichum* sp.6

dont l'extrait AcOEt est cytotoxique avec une viabilité de 13% sur les cellules MRC-5. L'observation des profils UHPLC des extraits des souches de *Colletotrichum* sp.6 pourrait indiquer des différences chimiques expliquant cette différence d'activité au sein de la même espèce.

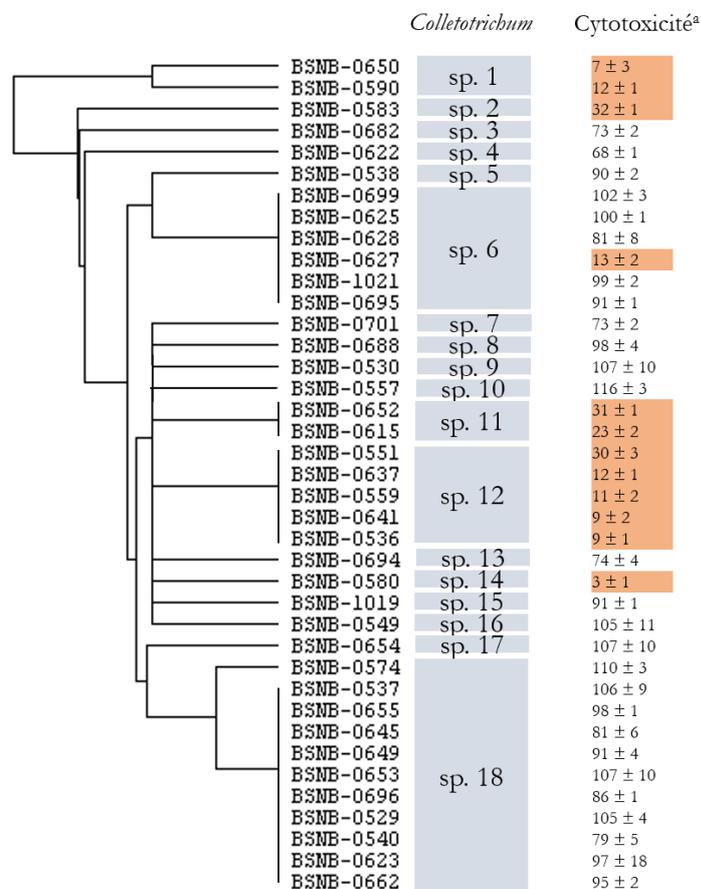


Figure VIII. 3. Regroupement hiérarchique des isolats de *Colletotrichum* réalisé après détection des ions les plus intenses de leur empreinte protéique MALDI-TOF MS. <sup>a</sup> Cytotoxicité de l'extrait AcOEt de la souche à une concentration de 10 µg/mL : mesure de la viabilité sur cellules MRC-5 (%), contrôle positif : Docetaxel).

## 8.2. Diversité chimique des souches de *Colletotrichum*

La diversité chimique des différentes espèces déterminées par leur empreinte MALDI-TOF MS a pu être observée avec l'analyse des données UHPLC-MS/MS visualisées par un réseau moléculaire et par une représentation t-SNE de ce dernier (Annexes S47 et S8).

### 8.2.1. Réseau moléculaire

Un réseau moléculaire a été généré à partir des 42 extraits à l'AcOEt de *Colletotrichum* injectés sur UHPLC-MS/MS (Figure VIII. 4, Annexes S47 et S49). La visualisation des ions provenant des extraits cytotoxiques est facilitée par l'application d'un code de couleur. La répartition des ions entre les différents extraits est représentée par un diagramme en secteurs de ces différentes couleurs, basé sur l'intensité d'ionisation de ces ions dans les extraits.

Ce réseau moléculaire permet de faire apparaître des clusters d'ions spécifiques aux extraits cytotoxiques. L'extrait de *Colletotrichum* sp.2 (BSNB-0583) forme entre autres trois clusters d'ions entièrement spécifiques à cette souche (Figure VIII. 4. A). D'après la comparaison de leur spectre MS/MS avec ceux des bases de données, les ions de deux clusters semblent reliés à des chaînes ramifiées insaturées mais aucune identification précise ne peut être établie. Le troisième cluster contenant un ion majoritaire à  $m/z$  346,275 ne propose aucun analogue connu.

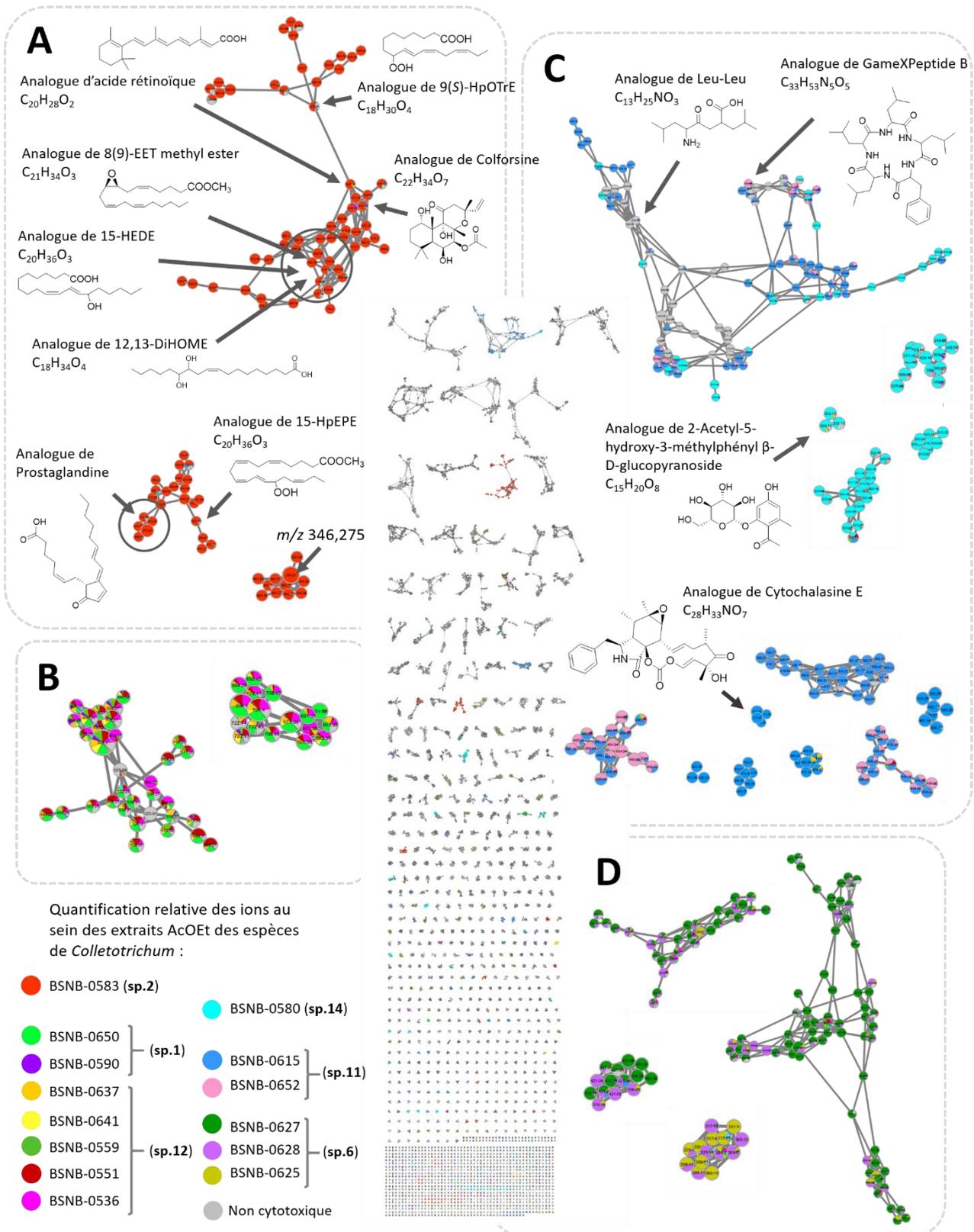


Figure VIII. 4. Réseau moléculaire établi d'après les données UHPLC-MS/MS des 42 extraits à l'AcOEt de *Colletotrichum* sp. A) Clusters d'ions spécifiques à BSNB-0583 (*Colletotrichum* sp.2), B) Clusters d'ions spécifiques aux isolats de *Colletotrichum* sp.1 et sp.12, C) Clusters d'ions spécifiques aux isolats de *Colletotrichum* sp.14 et sp.11, D) Clusters d'ions spécifiques aux isolats de *Colletotrichum* sp.6.

Les extraits des souches de *Colletotrichum* sp.1 et sp.12 présentent le même profil chimique malgré leurs empreintes protéiques différentes. Ainsi on retrouve dans le réseau moléculaire des clusters d'ions spécifiques aux extraits de souches de ces deux espèces (Figure VIII. 4. B).

Les extraits de *Colletotrichum* sp.14 et de *Colletotrichum* sp.11 forment à la fois des clusters d'ions spécifiques à chacune des espèces et un cluster d'ion commun aux deux espèces (Figure VIII. 4. C). La cytochalasine E a pu être dérépliquée d'après les spectres de fragmentation MS/MS à partir du nœud à  $m/z$  496,2678 d'un cluster spécifique à BSNB-0615. Le cluster commun à ces deux espèces semble être composé d'analogues de peptides d'après la comparaison des spectres MS/MS aux bases de données.

Enfin, malgré l'activité de l'extrait de BSNB-0627 (le seul extrait actif des souches de *Colletotrichum* sp.6), son profil chimique ne semble pas différent de celui des souches inactives telles que BSNB-0625 et BSNB-0628 (Figure VIII. 4. D).

### 8.2.2. Approche t-SNE

La représentation classique d'un réseau moléculaire ordonne les clusters par taille, sans donner d'informations sur les similarités chimiques pouvant exister entre ces clusters. Pour contourner cette limitation, la représentation d'un réseau moléculaire par l'algorithme t-SNE permet de rapprocher spatialement des ions possédant des structures communes mais réparties entre plusieurs clusters.

Ainsi la représentation t-SNE du précédent réseau moléculaire (Figure VIII. 5, Annexes S48 et S50) montre que les ions provenant de clusters spécifiques à *Colletotrichum* sp.11, sp.1 et sp.12 se retrouvent spatialement proches, dont l'ion identifié comme étant la cytochalasine E dans l'extrait de *Colletotrichum* sp.11. Le cluster commun aux espèces sp.11 et sp.14, contenant des analogues de peptides, se retrouve également dans cette zone. D'après cette répartition, les extraits de *Colletotrichum* sp.1 et sp.12 seraient composés d'analogues de cytochalasines ou de peptides.

À l'inverse, des clusters spécifiques à l'extrait de *Colletotrichum* sp.2 (BSNB-0583) et à l'extrait de *Colletotrichum* sp.14 (BSNB-0580) se retrouvent dans des régions éloignées des analogues de cytochalasines et de peptides. Peu d'identifications sont obtenues sur les ions entourant ces clusters. Ainsi la diversité chimique des souches *Colletotrichum* sp.2 (BSNB-0583) et *Colletotrichum* sp.14 (BSNB-0580) semblent les plus prometteuses du point de vue de l'originalité chimique. Cependant, étant donné que les réseaux moléculaires indiquent une potentielle production de peptides par BSNB-0580, l'activité cytotoxique de l'extrait peut être due à ces métabolites. Afin de vérifier les prédictions données par ces méthodes de spectrométrie de masse sur la présence de cytochalasines, la souche BSNB-0536 de l'espèce *Colletotrichum* sp.12 va également être étudiée.

Les métabolites représentés sur le réseau moléculaire t-SNE de la Figure VIII. 5 sont issus des études chimiques des extraits de ces trois souches après un travail d'isolement et d'identification détaillé dans les paragraphes suivants.

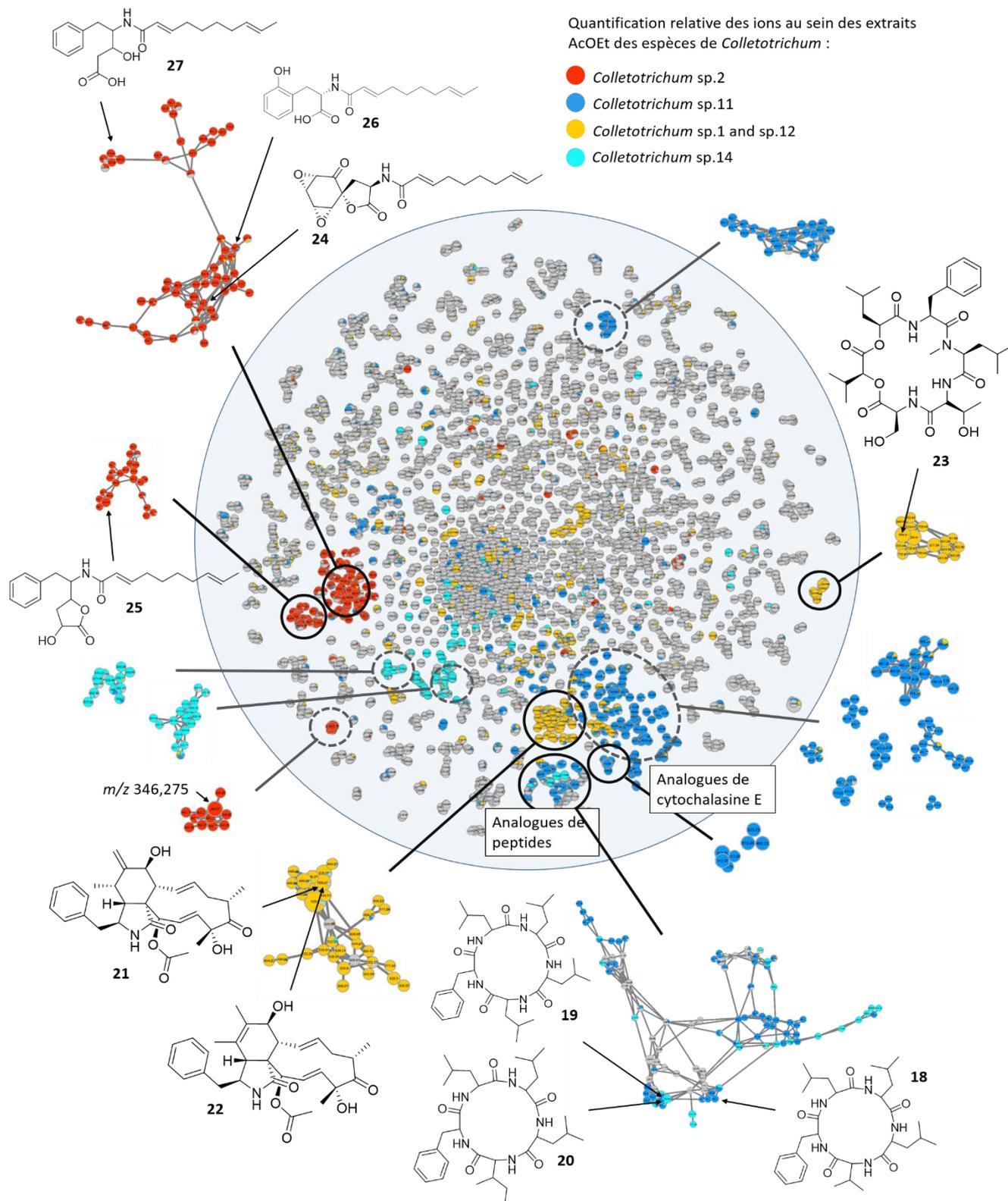
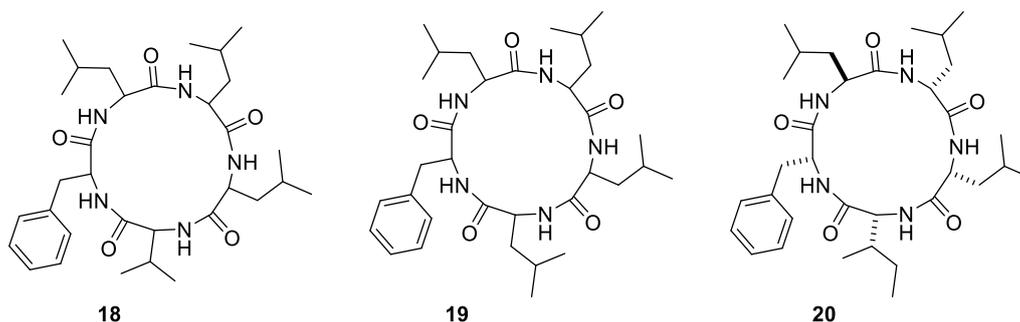


Figure VIII. 5. Représentation t-SNE du réseau moléculaire établi d'après les données UHPLC-MS/MS des 42 extraits à l'AcOEt de *Colletotrichum* sp. Autour de la représentation t-SNE se trouvent les clusters du réseau moléculaire relatifs aux différentes zones entourées. Les molécules dessinées ont été isolées et identifiées après l'étude chimique des extraits, et sont associées à leur ion respectif dans les clusters.

### 8.2.3. Etude chimique de *Colletotrichum* sp.14

Après une culture de la souche BSNB-0580 sur 226 boîtes de Pétri, trois cyclopeptides ont été isolés et identifiés par RMN, analyse de la fragmentation MS/MS et attribution des fragments (Annexes S51-S53). En effet, la composition en acides aminés peut être déduite à partir de la masse des ions immoniums observés sur le spectre MS/MS. Ainsi, les signaux à  $m/z$  86,097 (leucine/isoleucine),  $m/z$  72,081 (valine) et  $m/z$  120,081 (phénylalanine) sont attribués sans ambiguïté.

La cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Val) (**18**), cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Leu) (**19**) et cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Ile) (**20**) sont ainsi retrouvées, cette dernière étant le métabolite majoritaire de l'extrait. La configuration relative de la cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Ile) a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Les activités cytotoxiques de ces métabolites ont été mesurées avec des  $CI_{50}$  sur la lignée MRC-5 de 3,2, 1,4 et 17,7  $\mu$ M, respectivement.



En analysant le cluster du réseau moléculaire contenant ces cyclopeptides, il est possible d'observer deux isomères des composés **19** et **20** produits par la souche BSNB-0580. Trois autres isomères de **18** sont aussi observés. Une proportion différente en leucines et isoleucines ou un enchaînement différent de ces acides aminés peut expliquer la présence de ces isomères.

Également, par la mesure de masse en haute résolution et l'observation des spectres de fragmentation MS/MS, d'autres cyclopeptides peuvent être prédits. Notamment, il est possible d'identifier des cyclopeptides contenant des proportions variées en leucines, phénylalanines et valines (Figure VIII. 6). Deux nœuds respectivement à  $m/z$  600,38 et 586,36 correspondraient à deux cyclopeptides contenant une méthionine oxydée d'après la détection d'un signal MS/MS à  $m/z$  120,048. Ainsi le cyclopeptide à  $m/z$  600,38 serait composé de quatre leucines/isoleucines et d'une méthionine oxydée et le cyclopeptide à  $m/z$  586,36 composé d'une valine, trois leucines/isoleucines et d'une méthionine oxydée. Plusieurs nœuds dans ce cluster semblent être composés d'acides aminés non protéinogènes car les différences de masse entre les fragments ou les masses des ions immoniums ne correspondent pas avec ceux des acides aminés protéinogènes. Ces peptides ne sont pas formellement identifiés compte tenu de leur faible production par la souche et donc la difficulté de les isoler.

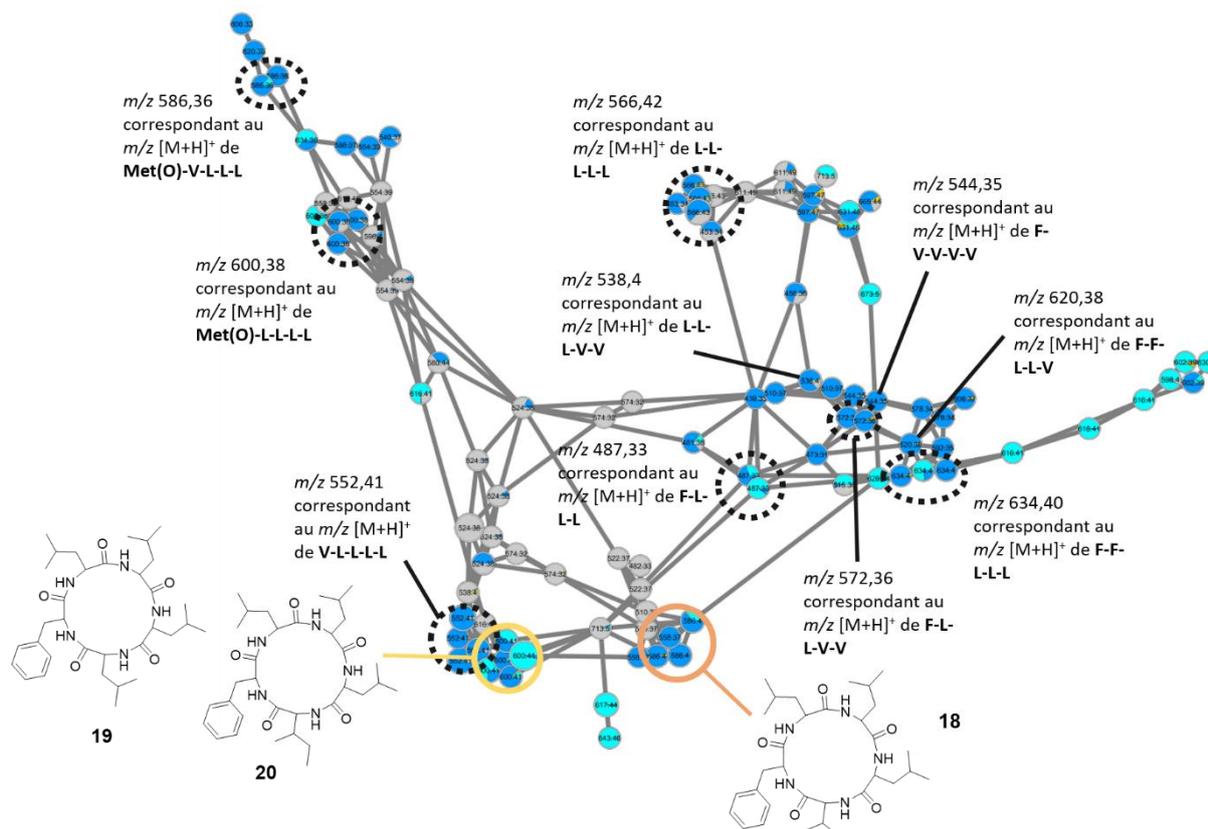
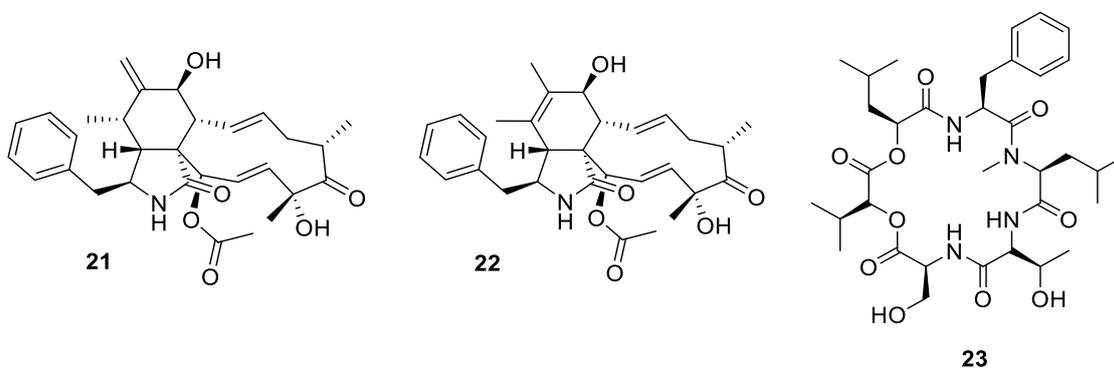


Figure VIII. 6. Déréplication d'un cluster de peptides contenant des ions retrouvés dans les extraits de *Colletotrichum* sp.11 et sp.14.

#### 8.2.4. Etude chimique de *Colletotrichum* sp.12

La souche BSNB-0536 a été chimiquement étudiée afin d'isoler les métabolites majoritaires contenus dans les clusters spécifiques aux espèces *Colletotrichum* sp.1 et sp.12. A l'issue d'une culture à grande échelle de la souche suivie d'une extraction, trois métabolites spécifiques à ces espèces ont été isolés : les cytochalasines D (**21**) et C (**22**) et le depsisepptide hirsutatine A (**23**). L'identification de ces composés et leur configuration ont été établies sur la base des données spectroscopiques et la comparaison avec la littérature (Annexes S54-S56).<sup>368,369</sup>



<sup>368</sup> Espada A., Rivera-Sagredo A., *et al.*, New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. *Tetrahedron* **1997**, *53*, p. 6485-6492.

<sup>369</sup> Isaka M., Palasarn S., *et al.*, Cyclohexadepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, p. 1680-1682.

D'après le réseau moléculaire, d'autres analogues de cytochalasines seraient produits par les espèces *Colletotrichum* sp.1, sp.11 et sp.12. L'activité cytotoxique des cytochalasines C (**22**) et D (**21**) est confirmée sur les cellules MRC-5 avec une  $CI_{50}$  mesurée à 3,01 and 1,97  $\mu$ M respectivement.

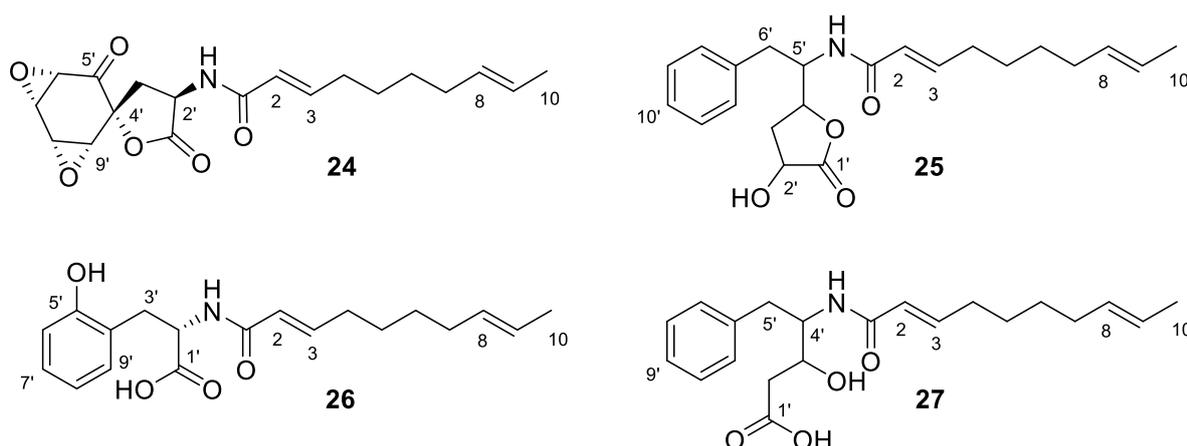
### 8.2.5. Etude chimique de *Colletotrichum* sp.2

Trois clusters contenant des ions spécifiques à l'espèce *Colletotrichum* sp.2 (BSNB-0583) sont observés dans le réseau moléculaire. Ces trois clusters se retrouvent dans deux zones séparées sur la représentation t-SNE sans permettre l'identification d'analogues proches de ces ions (Figure VIII. 5). L'extrait brut de cette souche a donc été choisi pour être étudié chimiquement au vu de sa diversité chimique.

Après une culture à grande échelle de la souche BSNB-0583, un extrait brut à l'acétate d'éthyle est obtenu. Cet extrait montre une viabilité cellulaire de  $63 \pm 4\%$  sur les cellules MRC-5 à 10  $\mu$ g/mL, ce qui montre une réduction de la cytotoxicité comparée à l'activité de l'extrait initial de BSNB-0583 ( $32 \pm 1\%$ ). Les variations dans la production de métabolites chez les micro-organismes sont des phénomènes précédemment observés lors de nos études dans l'équipe. Nous pensons que le stockage en cryotube à  $-80^\circ\text{C}$  ainsi que la culture répétée sur milieu synthétique peut altérer au cours du temps la production en molécules selon les micro-organismes.

La comparaison des profils UHPLC-MS/MS de l'extrait cytotoxique et non-cytotoxique de BSNB-0583 montre une différence d'intensité de l'ion à  $m/z$  346,275. Cet ion est le majoritaire d'un cluster spécifique à la souche sur le réseau moléculaire et pourrait être responsable de l'activité biologique de l'extrait.

Après purification de l'extrait brut de BSNB-0583, quatre métabolites possédant tous une chaîne décadiénamide ont été isolés et identifiés, et sont présentés ci-dessous. Les spectres RMN 1D et 2D sont disponibles en annexes S57-S60.



La formule brute du composé **24** a été déterminée comme étant  $C_{19}H_{23}NO_6$  sur la base de l'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  362,1621  $[M+H]^+$  (calc. 362,1598, err. 6,35 ppm). L'analyse des spectres RMN- $^1H$ ,  $^{13}C$  et HSQC  $^1H$ - $^{13}C$  ont permis l'identification d'un méthyle à  $\delta_H$  1,63, cinq méthylènes ( $\delta_H$  [2,53, 2,83] / 2,22 / 2,00 / 1,47 et 1,39), neuf méthines ( $\delta_H$  6,82 / 5,93 / 5,42 / 4,34 / 4,15 / 4,00 / 3,66 et 3,62), parmi lesquels se trouvent quatre protons de groupements insaturés ( $\delta_H$  6,82 / 5,93 et 5,42). Quatre carbones quaternaires sont également identifiés ( $\delta_C$  198,9 / 175,0 / 168,5

et 84,6), dont le déplacement des trois premiers suggère la présence de groupements carbonylés. Une chaîne insaturée a été mise en évidence par les corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  observée permettant l'enchaînement des protons H-2/H-3/H-4/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-10, ainsi que par les corrélations HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  entre H-2 et C-1 (Figure VIII. 7). D'après la constante de couplage mesurée à 15,3 Hz entre H-2 et H-3, la double liaison en position 2 est de configuration *E*. D'après le déplacement des protons H-8 et H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  5,42) ainsi que celui du méthylène adjacent H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  2,00), la double liaison en position 8 est déduite également de configuration *E*.<sup>370</sup>

Cette chaîne est liée au carbone C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  49,2) au vu de la corrélation HMBC entre H-2' et C-1 (Figure VIII. 7). L'enchaînement des carbones entre C-1' et C-4' est déterminé par les corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  entre H-2' et H-3' ainsi que les corrélations HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  entre H-2'/C-1', H-3'/C-1' et H-3'/C-4'. Les déplacements de C-2' et C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  49,2 et 84,6) indiquent la présence d'oxygène sur ces deux positions. A ce stade de l'identification, quatre méthines restent à placer ( $\delta_{\text{C}}$  59,0 / 57,2 / 56,5 et 53,8) dont le déplacement chimique indique la présence d'oxygènes ainsi qu'un carbone quaternaire dont le déplacement ( $\delta_{\text{C}}$  198,9) suggère une fonction cétone. Les corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  lient les quatre méthines H-6'/H-7'/H-8'/H-9'. Les corrélations HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  entre H-6'/C-5', H-6'/C-4', H-9'/C-5', H-9'/C-4', H-3'/C-5' et H-3'/C-9' permettent l'établissement d'un cycle à six carbones, composé de la cétone en C-5' et du carbone quaternaire en C-4'. Afin de satisfaire la formule brute prédite ainsi que le nombre d'insaturation qui en découle, deux époxydes sont formés à partir des quatre méthines C-6', C-7', C-8' et C-9' ainsi qu'une fonction lactone entre les positions 1' et 4'. Le composé **24** est ainsi formé d'un bicycle spiro. Enfin une fonction amide est placée afin de respecter la formule brute, entre les positions 2' et 1 d'après la corrélation HMBC H-2'/C-1 observée. La (2*E*,8*E*)-*N*-[dihydro-5',6'-dioxospiro-(3,8-dioxatricyclo(5.1.0.0<sup>2,4</sup>)octane-5,2'-(3'*H*)-furan-4'-yl]-deca-2,8-dienamide (**24**) est identifiée, contenant une chaîne décadiénamide.

La configuration relative du composé **24** peut être déduite des corrélations NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure VIII. 7). En effet, les corrélations entre H-3'/H-6' et H-3'/H-9' imposent aux oxygènes de la lactone et des époxydes de se trouver sur le même côté du plan. La configuration relative du carbone spiro en C-4' est ainsi déterminée. La configuration relative de C-2' peut être également déterminée grâce à l'intensité des corrélations NOESY : H-2'/H-3'a et H-9'/H-3'b sont des corrélations intenses tandis que H-2'/H-3'b et H-9'/H-3'a sont des corrélations plus faibles. Des simulations 3D de la molécule permettent de conclure sur la configuration relative. Enfin, la configuration absolue est déterminée par comparaison du spectre de dichroïsme circulaire prédit de la molécule avec le spectre expérimental obtenu (Annexe S57). Ce métabolite **24** que nous choisissons d'appeler colletamide A avait précédemment été isolé d'une souche fongique *Pseudoarachniotus roseus* et breveté pour ces activités antimicrobiennes et contre l'hypercholestérolémie.<sup>371</sup> Nous avons pu déterminer par notre étude pour la première fois la configuration absolue de cette molécule.

<sup>370</sup> Frost D. J., Gunstone F. D., The PMR analysis of non-conjugated alkenoic and alkynoic acids and esters. *Chem. Phys. Lipids* **1975**, *15*, p. 53-85.

<sup>371</sup> Garrity G. M., Giacobbe R., et al., Novel HMG-CoA synthase inhibitors., *Novel HMG-CoA synthase inhibitors*, **1991**, United States Patent 5064856.

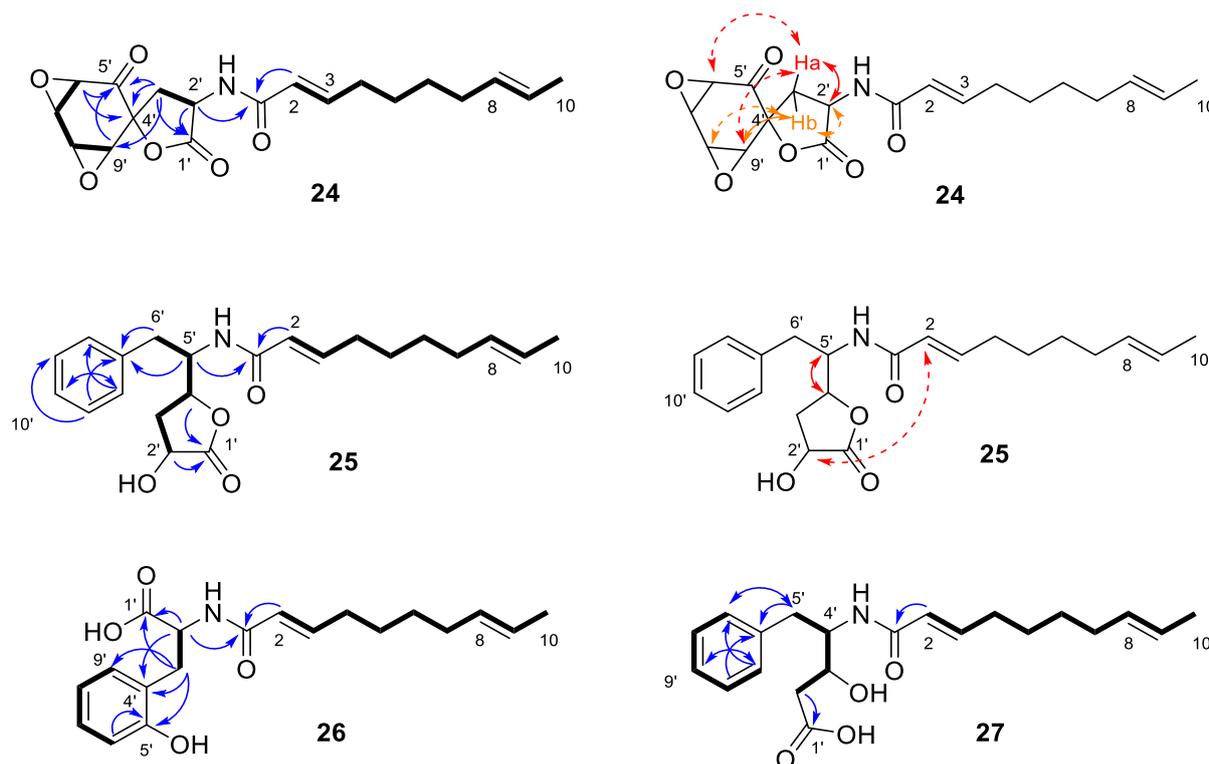


Figure VIII. 7. Corrélations des spectres RMN 2D ayant permis l'identification structurale des molécules **24-27** :  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (traits noirs),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (flèches bleues) et  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (flèches rouges et oranges). Les corrélations NOESY intenses sont en traits pleins et les plus faibles en pointillés.

La formule brute du composé **25** a été déterminée comme étant  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{NO}_4$  sur la base de l'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  372,2182  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calc. 372,2169, err. 3,49 ppm). L'analyse des spectres RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  montre la présence de la même chaîne (*2E,8E*)-deca-2,8-dienamide. Pour le reste de la molécule, les spectres RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et HSQC indiquent la présence de deux méthylènes ( $\delta_{\text{H}}$  [2,99 et 2,85], [2,41 et 2,17]), trois méthines ( $\delta_{\text{H}}$  4,71 / 4,40 et 4,32), un carbone quaternaire ( $\delta_{\text{C}}$  178,4) et un groupement phényle ( $\delta_{\text{H}}$  7,26 / 7,25 / 7,18 et  $\delta_{\text{C}}$  139,0 / 130,2 / 129,5 et 127,6). La chaîne déca-dienamide est liée à C-5' d'après la corrélation HMBC H-5'/C-1 (Figure VIII. 7). Les corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permettent l'élucidation de la séquence H-6'/H-5'/H-4'/H'-3'/H'-2'. La présence du groupe phényle est confirmée par les corrélations COSY et HMBC. Ce phényle est lié au méthylène en position 6' d'après les corrélations HMBC H-5'/C-7' et H-6'/C-7'. Les corrélations HMBC entre H-4'/C-1' et H-2'/C-1' et le déplacement chimique de C-4' à  $\delta_{\text{C}}$  80,7 indiquant la présence d'un oxygène, permettent de déduire une fonction lactone. La formule brute et le déplacement de C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  68,0) confirment la présence d'un hydroxyle en C-2'. La configuration relative de **25** est déterminée par comparaison des déplacements RMN prédits et observés (Annexe S59). La (*2E,8E*)-*N*-[1-(4-hydroxy-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)-2-phénylethyl]deca-2,8-dienamide (**25**) est identifiée et nommée colletamide B.

La formule brute du composé **26** a été déterminée comme étant  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_4$  sur la base de l'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  332,1859  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calc. 332,1856, err. 0,90 ppm). L'analyse des spectres RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  montre à nouveau la présence de la chaîne (*2E,8E*)-deca-2,8-dienamide. Pour ce composé, les spectres RMN indiquent en plus la présence d'un méthylène ( $\delta_{\text{H}}$  3,21 et 2,98), cinq méthines ( $\delta_{\text{H}}$  7,08 / 7,03 / 6,75 / 6,74 et 4,67) parmi lesquelles se trouvent quatre protons oléfiniques et trois carbones quaternaires ( $\delta_{\text{C}}$  176,9 / 156,7

et 125,4). Les corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  lient le méthine à  $\delta_c$  55,6 et le méthylène (Figure VIII. 7). La corrélation HMBC entre H-2' et C-1 rattache la chaîne décadienamide à cette même méthine. Un groupement hydroxyphényle est déterminé par les corrélations COSY permettant l'enchaînement des protons H-6'/H-7'/H-8'/H-9', les corrélations HMBC dans ce cycle et le déplacement du carbone quaternaire portant l'hydroxyle à  $\delta_c$  156,7. Ce groupement est rattaché au carbone C-3' d'après les corrélations HMBC H-2'/C-4', H-3'/C-4' et H-3'/C-9'. L'hydroxyle est ainsi placé en ortho au vu de la corrélation HMBC H-3'/C-5'. Le déplacement du dernier carbone quaternaire ( $\delta_c$  176,9) et les corrélations HMBC H-2'/C-1' et H-3'/C-1' indiquent un acide carboxylique en position 1', validé par la formule brute du composé. La configuration absolue du composé **26** est déterminée par comparaison des spectres de dichroïsme circulaire théorique et expérimental (Annexe S59). L'acide (S)-2-[(2E,8E)-deca-2,8-dienamido]-3-(2-hydroxyphényl)propionique a ainsi été identifié et nommé colletamide C (**26**).

La formule brute du composé **27** a été déterminée comme étant  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_4$  sur la base de l'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  360,2170  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calc. 360,2169, err. 0,28 ppm). La même chaîne (2E,8E)-deca-2,8-dienamide est retrouvée. Les spectres RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{-13}\text{C}$  et HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  montrent également la présence de deux méthylènes ( $\delta_H$  [2,97 et 2,81], 2,30), deux méthines ( $\delta_H$  4,14 et 4,02), un carbone quaternaire ( $\delta_c$  179,7) et un groupe phényle ( $\delta_H$  7,25/ 7,23/ 7,14 et  $\delta_c$  140,2). L'enchaînement des protons H-2'/H-3'/H-4'/H-5' est formé d'après les corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figure VIII. 7). Considérant les corrélations HMBC, le phényle est placé sur le carbone en position 5'. Le déplacement de H-3' ( $\delta_c$  70,1) indique la présence d'un oxygène en position 3'. La corrélation HMBC entre H-2' et le carbone quaternaire ( $\delta_c$  179,7) indique la présence d'une fonction carbonyle en position 1'. Afin de respecter la formule brute et les déplacements chimiques, un hydroxyle est placé en position 3' et un acide carboxylique en position 1'. Par comparaison avec les colletamides A-C, la chaîne décadienamide est reliée au carbone C-4'. La configuration relative de **27** a été déterminée par comparaison des déplacements chimiques RMN expérimentaux et théoriques (Annexe S60). La résolution du spectre de dichroïsme circulaire de cette molécule ne permet pas de déterminer la configuration absolue. L'acide 4-[(2E,8E)-deca-2,8-dienamido]-3-hydroxy-5-phénylpentanoïque est ainsi déterminé et nommé colletamide D (**27**).

Ces quatre métabolites, colletamide A-D n'ont pas d'activité cytotoxique ( $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) ce qui est corrélé avec la perte d'activité de l'extrait brut de BSNB-0583 observée.

De nombreux autres analogues à cette famille semble présents dans cet extrait : les ions contenus dans les deux clusters de cette famille présentent un signal MS/MS relatif à la chaîne décadienamide. Celle-ci est observée sur les spectres de fragmentation par les signaux à  $m/z$  123,118, 151,113 et 168,139 (Figure VIII. 8).

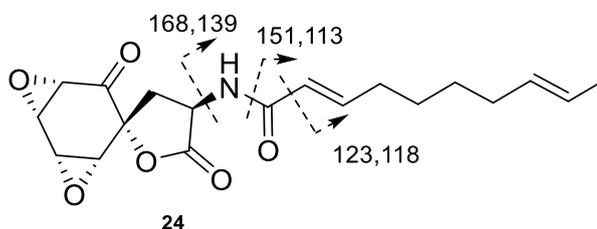


Figure VIII. 8. Fragmentation de la chaîne décadienamide dans la série des colletamides.

Afin d'isoler les métabolites responsables de l'activité de l'extrait, le composé majoritaire ( $m/z$  346,275) du troisième cluster spécifique à BSNB-0583 a été ciblé. Curieusement, aucune fraction

issue de la chromatographie flash ne contient ce métabolite, ce qui suggère que ce dernier est sensible aux conditions chromatographiques. Après une seconde culture et extraction de BSNB-0583, des partitions liquide-liquide et fractionnements, ce composé a été isolé en petite quantité (1,7 mg) en présence d'impuretés. L'identification de cette molécule n'a pas pu être achevée. Cependant, l'évaluation cytotoxique de cette molécule est en cours.

### 8.2.6. Discussion

Contrairement à la répartition taxonomique donnée par le séquençage de leur région ITS, les empreintes protéiques MALDI-TOF MS permettent une bonne discrimination des souches *Colletotrichum* de notre communauté. La qualité de cette discrimination est jugée d'après le profil chimique des extraits de ces souches : nous pouvons observer une bonne corrélation entre l'activité biologique de leurs extraits à l'AcOEt avec la discrimination en espèces/sous-espèces. Cinq espèces/sous-espèces sont alors considérées cytotoxiques : *Colletotrichum* sp.1, sp.2, sp.11, sp.12 et sp.14.

Seul l'isolat BSNB-0627 présente un extrait AcOEt cytotoxique parmi tous les isolats de l'espèce *Colletotrichum* sp.6. Le réseau moléculaire et les profils UHPLC-MS/MS ne fournissent pas d'informations sur une variation de métabolites permettant d'expliquer cette différence d'activité biologique. La souche BSNB-0627 a donc été écartée des espèces à étudier pour leurs métabolites actifs.

Les études chimiques de deux souches d'espèces différentes de *Colletotrichum* (BSNB-0580 et BSNB-0536) ont permis d'isoler six composés connus : trois cyclopeptides, deux cytochalasines et un depsispeptide. Alors que des dérivés d'ergostérol, colletotrichines, flavonols, cyclohexènes, azaphilones sont des métabolites connus produits par le genre *Colletotrichum*, c'est la première fois qu'est rapporté l'isolement de cytochalasines au sein de ce genre.<sup>103,372,373,374,375</sup> Les cytochalasines sont fréquemment retrouvées produites par des micro-organismes des genres *Xylaria*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Aspergillus* et *Phoma*.<sup>161,376,377,378</sup> Les trois cyclopeptides isolés n'avaient également jamais été retrouvés produits par des souches du genre *Colletotrichum*. Cependant, il a déjà été rapporté la production de peptide, notamment *Colletotrichum dematium* qui synthétise le peptide antimycotique colutelline A.<sup>379</sup>

La présence de ces métabolites explique l'activité cytotoxique des souches des espèces *Colletotrichum* sp.1, sp.12 et sp.14 d'après leurs résultats de CI<sub>50</sub> sur les cellules MRC-5 et les données de la littérature. En effet, beaucoup de publications montrent l'activité toxique de

---

<sup>372</sup> García-Pajón C. M., Collado I. G., Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, p. 426–431.

<sup>373</sup> Gohbara M., Kosuge Y., et al., Isolation, structures and biological activities of Colletotrichins, phytotoxic substances from *Colletotrichum nicotianae*. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, p. 1037–1043.

<sup>374</sup> Liu H.-X., Tan H.-B., et al., Secondary metabolites from the *Colletotrichum gloeosporioides* A12, an endophytic fungus derived from *Aquilaria sinensis*. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, p. 2360–2365.

<sup>375</sup> Wang W.-X., Kusari S., et al., Antibacterial Azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, p. 704–710.

<sup>376</sup> Carvalho C. R. de, Ferreira-D'Silva A., et al., Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miriciae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal plants. *Can. J. Microbiol.* **2018**, *64*, p. 835–843.

<sup>377</sup> Jouda J.-B., Tamokou J.-D., et al., Antibacterial and cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. harbored in *Garcinia kola* (Heckel) nut. *BMC Complement Altern. Med.* **2016**, *16*, p. 462.

<sup>378</sup> Kim E. L., Li J. L., et al., Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, p. 3126–3129.

<sup>379</sup> Ren Y., Strobel G., et al., Colutellin A, an immunosuppressive peptide from *Colletotrichum dematium*. *Microbiology* **2008**, *154*, p. 1973–1979.

peptides isolés de micro-organismes.<sup>380</sup> Egalement, l'activité cytotoxique des cytochalasines et leurs mécanismes d'actions a été largement étudié. Ces molécules sont connues pour inhiber la polymérisation de l'actine et ainsi perturber la morphologie cellulaire et la division cellulaire.<sup>161</sup> Par exemple, la cytochalasine D inhibe la synthèse protéique au sein des cellules HeLA et la cytochalasine E est un agent antiangiogénique efficace dû à la présence d'un époxyde.<sup>381,382</sup> L'hirsutatine A a été isolée d'un champignon entomopathogène *Hirsutella nivea* et n'a pas montré de cytotoxicité sur la lignée cellulaire Vero, tout comme dans cette étude sur la lignée cellulaire MRC-5. Des métabolites n'ont pas été isolés de *Colletotrichum* sp.11 mais le profil chimique UHPLC-MS/MS de ces souches semble indiquer la présence de cytochalasines.

Enfin l'étude de la souche de *Colletotrichum* sp.2 a permis d'isoler une nouvelle famille de métabolites, nommé colletamide, partageant une chaîne décadiénamide. L'étude du réseau moléculaire prédisait pour cette souche une potentielle originalité chimique confirmée lors de l'isolement de ces molécules. Quatre métabolites de cette famille ont été identifiés mais d'après l'observation des clusters du réseau moléculaire, d'autres analogues de cette famille sont produits. En revanche, les métabolites responsables de l'activité cytotoxique de cet extrait n'ont pas été retrouvés. Nous supposons que le métabolite actif est un composé de masse 345,27, produit majoritairement dans l'extrait initial ayant servi au criblage puis produit en plus faible proportion lors de cultures suivantes. Cette molécule n'a pas pu être isolée dans des conditions assez pures et en assez grande quantité pour permettre son identification.

### 8.3. Conclusion

Dans le cas de notre étude sur la composition chimique des isolats de *Colletotrichum*, l'utilisation du MALDI-TOF MS nous a permis de mieux discriminer les différentes espèces de notre communauté par rapport au séquençage de la région ITS de l'ADN. En effet, cette discrimination semble en adéquation avec l'activité biologique de leurs extraits AcOEt. Ainsi, nous avons pu rapidement identifier les réplicats d'une même espèce.

En parallèle d'une identification par empreinte protéique MALDI-TOF MS, nous constatons que la production en métabolites peut également participer à l'identification de l'espèce de *Colletotrichum*. En effet, l'observation des profils métaboliques des extraits à l'AcOEt de ces souches permet de constater que certains métabolites sont spécifiquement produits suivant les espèces. La visualisation de ces profils chimiques en un réseau moléculaire rend aisément compte de ces spécificités, notamment pour les espèces présentant un extrait cytotoxique sur la lignée MRC-5.

La comparaison des spectres MS/MS de ce réseau avec ceux des bases de données ont permis d'identifier des métabolites potentiellement responsables de cette activité au sein des extraits de *Colletotrichum* sp.1, sp.11, sp.12 et sp.14 : des cyclopeptides et la cytochalasine E. Différents analogues de cytochalasines présents dans les extraits ont également été identifiés en regardant spécifiquement leur spectre MS/MS. Ceux-ci comportent des signaux reconnaissables des cytochalasines. De plus, la représentation du réseau par l'algorithme t-SNE regroupe ces ions de manière proche, ce qui apporte une information supplémentaire quand la déréplication des métabolites ne permet pas d'identifier clairement les analogues.

---

<sup>380</sup> Wang X., Lin M., *et al.*, Structural diversity and biological activities of fungal cyclic peptides, excluding cyclodipeptides. *Molecules* **2017**, 22, p. E2069.

<sup>381</sup> Ornelles D. A., Fey E. G., *et al.*, Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, 6, p. 1650-1662.

<sup>382</sup> Udagawa T., Yuan J., *et al.*, Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 294, p. 421-427.

Dans notre étude, les prédictions des métabolites d'après la déréplication des spectres de fragmentation se sont révélées exactes. L'étude chimique de l'extrait BSNB-0580 et BSNB-0536 a été réalisée afin de confirmer ces prédictions mais il aurait été possible de se concentrer uniquement sur la souche BSNB-0583 afin de découvrir une diversité chimique intéressante. En effet, le réseau moléculaire a notamment mis en avant une diversité chimique pour l'espèce *Colletotrichum* sp.4, confirmée par l'identification de quatre métabolites d'une famille chimique nommée colletamide. Seule la colletamide A avait précédemment été citée dans un brevet pour une activité antimicrobienne et contre l'hypercholestérolémie, mais sa configuration n'avait pas été décrite jusqu'alors.

Afin de finaliser cette étude, l'identification exacte de ces souches est nécessaire pour connaître précisément les différentes espèces de *Colletotrichum* de notre communauté. Le séquençage de locus supplémentaire serait un moyen de parvenir à cette information.<sup>367</sup>

## IX. Etude de la compétition entre l'endophyte BSNB-0294 et *Fusarium oxysporum*

Suite au criblage de l'ensemble des souches de notre communauté contre les phytopathogènes *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* et f.sp. *albedinis* (Partie 5.3.3 p.104), deux endophytes fongiques et vingt-deux endophytes bactériens ont montré une inhibition de la croissance de ces pathogènes. Les souches bactériennes montrant une activité appartiennent aux genres *Paraburkholderia* et *Bacillus*. Les deux champignons actifs (BSNB-0294 et -0299) sont identifiés dans la famille des Xylariaceae dont un du genre *Muscodor* sp. (BSNB-0299).

La souche BSNB-0294 n'a pas pu être identifiée plus précisément aux rangs du genre et de l'espèce compte tenu du manque de similarité de sa région ITS avec celles de genres connus. La famille Xylariaceae renferme une très grande diversité de champignons pouvant être phytopathogènes ou endophytes.<sup>383</sup> La diversité taxonomique des Xylariaceae s'accompagne également d'une grande diversité chimique, et il n'est pas rare dans la littérature que des métabolites nouveaux soient isolés de champignons de cette famille.<sup>384</sup> De nombreux dérivés de xanthones ont été isolés, certains montrant des activités antibactériennes et cytotoxiques.<sup>385,386</sup> Des champignons du genre *Xylaria* produisent également des métabolites de type cytochalasine.<sup>162</sup> Des sesquiterpènes, analogues de xylarenal A, se sont montrés des ligands sélectifs à la protéine NPY Y5 qui est impliquée dans la régulation de la prise de nourriture et de la dépense énergétique chez l'homme.<sup>387</sup>

Le genre *Muscodor* appartient également à la famille des Xylariaceae et a été identifié pour la première fois en 2001 avec la description de l'espèce *M. albus*.<sup>388</sup> Vingt-six espèces ont été identifiées à ce jour.<sup>113</sup> Ce genre fongique est connu pour produire de nombreux composés organiques volatils (COVs) possédant une activité antimicrobienne (Partie 2.4.2.1 p.45). La composition en COVs semble espèce-dépendante.<sup>125,389</sup>

Les espèces du genre *Muscodor*, comme la souche BSNB-0299, ayant été très étudiées pour leurs COVs, nous avons choisi de nous engager dans l'identification des molécules responsables de l'activité antimicrobienne observée chez la souche fongique BSNB-0294. Pour cela, une étude chimique de la compétition entre *F. oxysporum* et l'endophyte Xylariaceae sp. BSNB-0294 a été réalisée.

### 9.1. Etude de la compétition Xylariaceae sp. (BSNB-0294) – *F. oxysporum* au cours du temps

Nous avons pris en compte qu'une souche mise en culture seule sur un milieu gélosé n'est pas soumise aux mêmes stress que lorsqu'elle se retrouve en milieu naturel. Le fait d'être placée en compétition face à un autre micro-organisme permet potentiellement de mieux représenter les interactions microbiennes présentes dans la nature. Une co-culture a été réalisée entre

<sup>383</sup> Rogers J. D., Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycol. Res.* **2000**, *104*, p. 1412–1420.

<sup>384</sup> Rudiyanayah, Alimuddin A. H., *et al.*, Arugosins O-Q, new fungal metabolites from the fungus Xylariaceae sp. isolated from leaves of *Lansium domesticum* (Meliaceae). *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14*.

<sup>385</sup> Mühlbauer A., Triebel D., *et al.*, Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species. *Mycol. Prog.* **2002**, *1*, p. 235–248.

<sup>386</sup> Malet-Cascón L., Romero F., *et al.*, IB-00208, a new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, p. 219–225.

<sup>387</sup> Díaz S., González A., *et al.*, Enantioselective Syntheses of (+)-Xylarenal A and ent-Xylarenal A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, p. 3749–3752.

<sup>388</sup> Worapong J., Strobel G., *et al.*, *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon* **2001**, *79*, p. 67–79.

<sup>389</sup> Pena L. C., Jungklaus G. H., *et al.*, *Muscodor brasiliensis* sp. nov. produces volatile organic compounds with activity against *Penicillium digitatum*. *Microbiol. Res.* **2019**, *221*, p. 28–35.

Xylariaceae sp. BSNB-0294 et *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Figure IX. 1), avec l'objectif d'observer une élicitation de la production de molécules en comparaison avec les molécules biosynthétisées lors d'une culture seule.



Figure IX. 1. Compétition entre le phytopathogène *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (gauche) et l'endophyte Xylariaceae sp. BSNB-0294 à trois semaines de co-culture.

### 9.1.1. Analyse de la compétition par les profils UHPLC et UHPLC-MS

Lors de ces confrontations, des extraits de chaque champignon (Xylariaceae sp. BSNB-0294 et *F. oxysporum*) ainsi que de la zone de confrontation entre les deux ont été réalisés à une, deux et trois semaines de co-culture. Les signaux UV-visibles des profils UHPLC ont été comparés entre ces extraits de co-culture et les extraits des champignons obtenus en culture seule.

Dans les profils des extraits AcOEt de l'endophyte BSNB-0294 cultivé en compétition avec *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, deux signaux observés à 4,4 et 4,7 min deviennent de plus en plus intenses au cours du temps de compétition alors qu'ils ne sont pas détectés dans l'extrait de l'endophyte en culture seule (Figure IX. 2). Les spectres MS de ces deux signaux sont identiques avec un ion moléculaire intense à  $m/z$  324,13. De même, deux signaux à 7,8 et 8,4 min sont présents uniquement dans les extraits de l'endophyte en compétition. Ces signaux pourraient être issus de la diffusion de composés biosynthétisés par *F. oxysporum* à travers la gélose. En effet, des signaux de même temps de rétention sont également observables dans le profil UHPLC des extraits AcOEt du phytopathogène (Figure IX. 3).

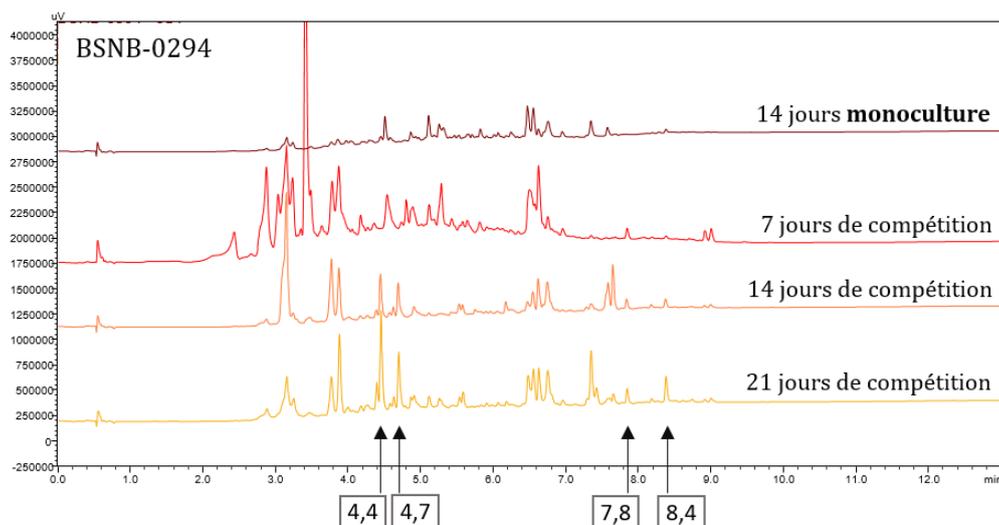


Figure IX. 2. Comparaison des profils UV à 254 nm des extraits de Xylariaceae sp. BSNB-0294 en culture seule et en compétition avec *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOCIC) pendant une, deux et trois semaines (du haut vers le bas).

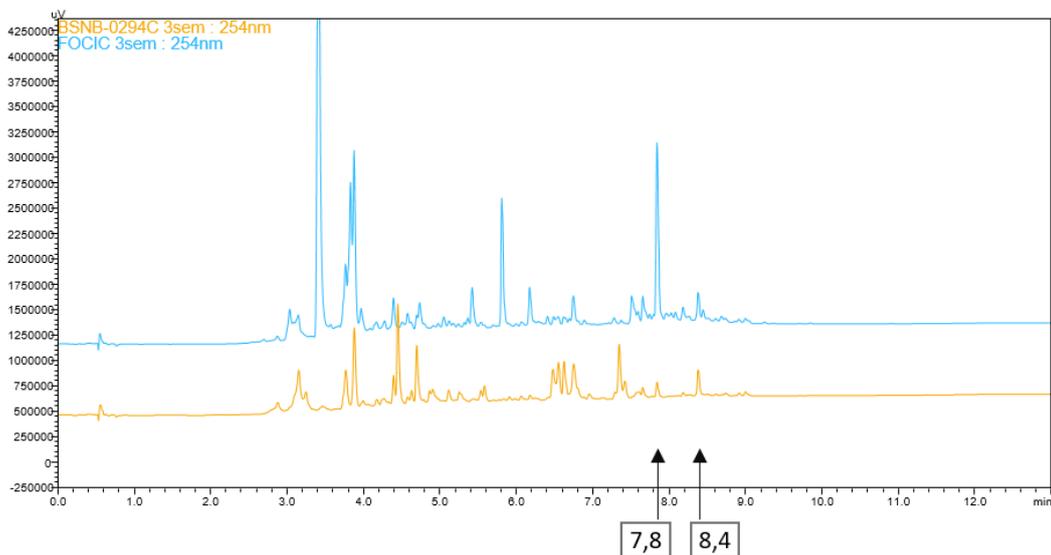


Figure IX. 3. Comparaison des profils UV à 254 nm des extraits de Xylariaceae sp. BSNB-0294C et *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOCIC) après trois semaines de compétition.

Concernant les extraits de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOCIC), le signal à 5,1 min, un des signaux majoritaires de l'extrait issu de la culture seule, voit son intensité diminuer lors de la compétition (Figure IX. 4). En revanche deux signaux à 6,2 et 6,7 min n'étaient pas détectés dans l'extrait issu de la culture seule et sont détectés dans les extraits à deux et trois semaines de compétition. L'ion moléculaire le plus intense associé à ces deux signaux sur le spectre MS est respectivement à  $m/z$  583,31 et 1286,79.

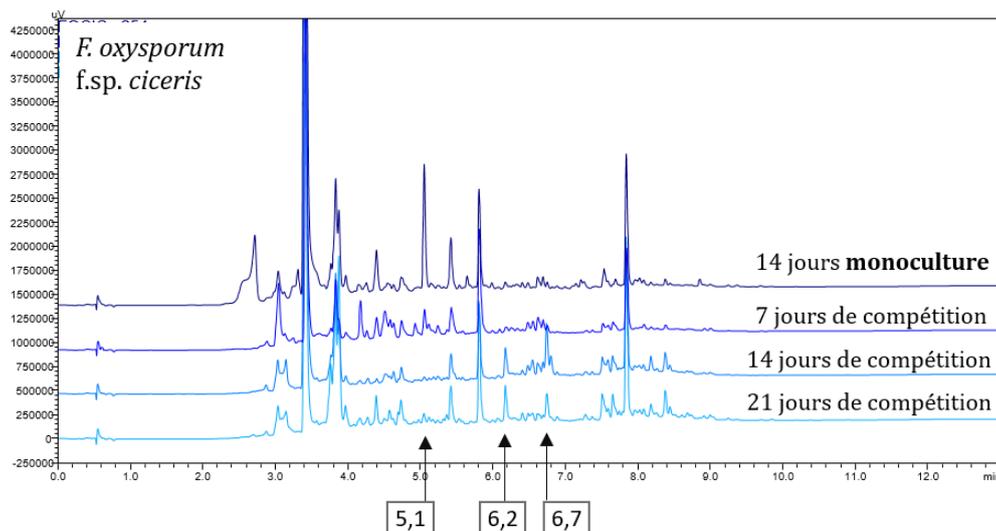


Figure IX. 4. Comparaison des profils UV à 254 nm des extraits de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOCIC) en culture seule et en compétition avec Xylariaceae sp. BSNB-0294 pendant une, deux et trois semaines.

Des extraits ont été réalisés et analysés de la même façon pour la co-culture de BSNB-0294 et la forme spéciale *F. oxysporum* f.sp. *albedinis*. Aucune différence n'a été observée entre les extraits réalisés en compétition et en culture seule d'après la comparaison des profils UHPLC (Annexe S61).

D'après l'observation des profils UHPLC, des variations de production métabolique se produisent donc uniquement lors de la co-culture de BSNB-0294 avec la forme spéciale *ciceris* de *F. oxysporum*. Nous avons choisi d'observer et analyser ce phénomène par visualisation des spectres UHPLC-MS/MS sous forme d'un réseau moléculaire, afin de commencer l'investigation de la diversité chimique de ces souches.

### 9.1.2. Analyse de la compétition par les réseaux moléculaires

Nous avons analysé en UHPLC-MS/MS les précédents extraits issus de la compétition de BSNB-0294 et *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOCIC). Un réseau moléculaire a ainsi été formé (2180 nœuds) après retraitement des données. La distribution de chaque ion dans les différents extraits est visualisée grâce à un filtre de couleur suivant le micro-organisme (BSNB-0294 ou FOCIC), les conditions de culture (seul ou en compétition) ainsi que le temps de co-culture (Annexe S62).

Plusieurs clusters regroupent des nœuds retrouvés dans tous les extraits. Ces métabolites sont extraits du milieu gélosé ou bien sont des métabolites communs aux deux espèces fongiques. À l'inverse, il est possible d'identifier des métabolites spécifiques soit à la souche FOCIC, soit à l'endophyte. La comparaison des spectres MS/MS avec les bases de données disponibles a permis l'identification d'analogues de beauvericine dans trois clusters (clusters 4, 5 et 9), ainsi que des analogues d'enniaines dans les extraits de FOCIC (Figure IX. 5). Certains de ces nœuds se retrouvent également dans les extraits de BSNB-0294 à deux et trois semaines de compétition, et indiquent une diffusion de ces métabolites à travers la gélose.

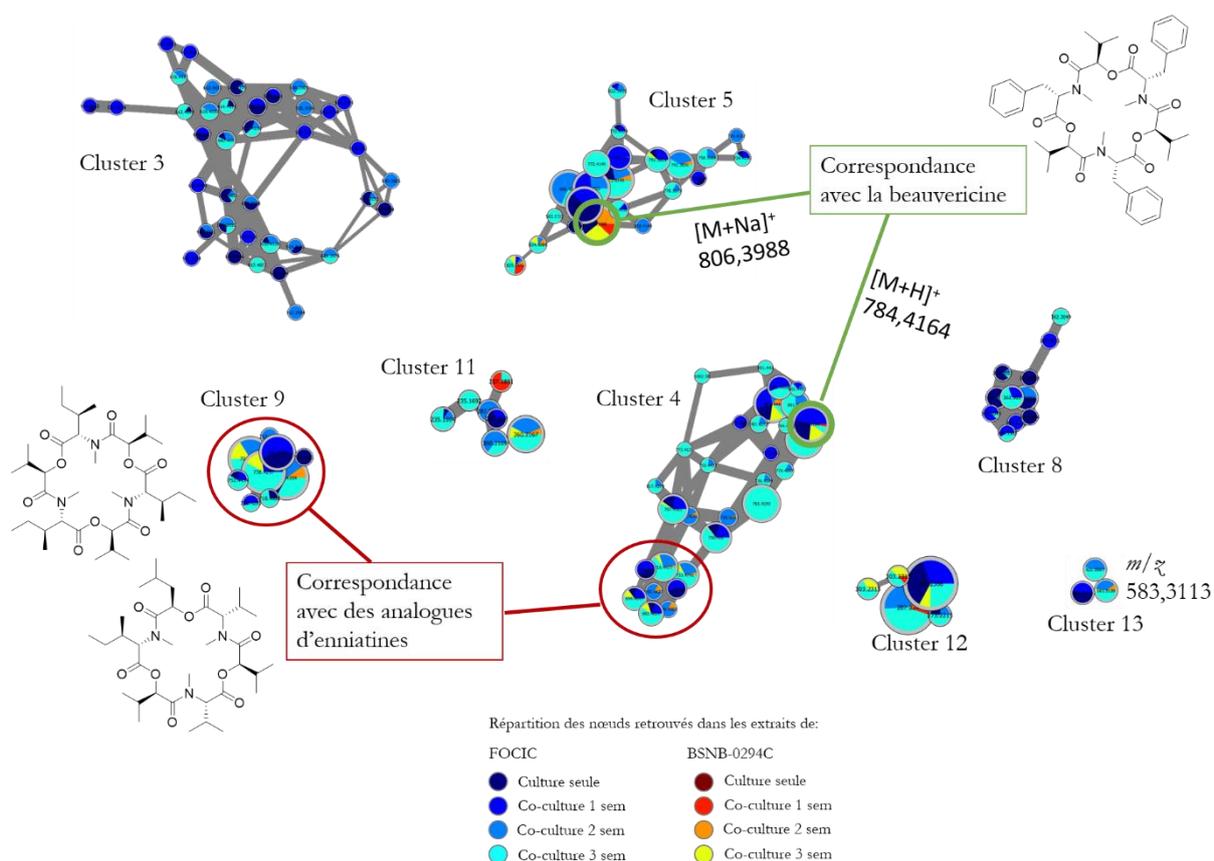


Figure IX. 5. Clusters spécifiques aux extraits du champignon phytopathogène issus du réseau moléculaire regroupant les données MS/MS des extraits de *F. oxysporum* f.sp *ciceris* (FOCIC) et Xylariaceae sp. BSNB-0294 en culture seule ou en co-culture de une, deux et trois semaines.

D'autres clusters spécifiques aux extraits de FOCIC sont observés mais les ions de ces nœuds n'ont pas pu être clairement identifiés par notre processus de déréplication. Les nœuds de certains de ces clusters ne se retrouvent pas dans les extraits de notre endophyte même après trois semaines de co-culture, révélant une absence de diffusion. La masse à  $m/z$  583,31 est retrouvée dans le cluster 13 et correspond au signal à 6,2 min dans le précédent profil UHPLC. Le spectre MS/MS de cet ion ne permet pas son annotation directe ou celles d'analogues par comparaison avec les spectres disponibles dans les bases de données. Ce métabolite semble donc original et fera l'objet d'un isolement et d'une identification structurale (Partie 9.2.2 p.172).

De la même façon, des clusters spécifiques aux extraits de l'endophyte BSNB-0294 sont observés : clusters 1, 2, 6, 7 et 10 (Figure IX. 6). Peu de nœuds peuvent être identifiés par comparaison des spectres MS/MS avec les bases de données. Des petits peptides de type dicétopipérazines semblent être produits ainsi que des métabolites de type alcaloïde mais sans identification précise (cluster 1). En effet, les masses exactes et spectres MS/MS de ces nœuds ne correspondent pas avec les analogues proposés dans les bases de données. Ce cluster ne contient que des nœuds issus de la culture de l'endophyte en compétition et non en culture seule. Parmi ce cluster, plusieurs nœuds de  $m/z$  324,13 sont retrouvés. Ces masses correspondent aux signaux à 4,4 et 4,7 min dans les extraits de BSNB-0294 dont la production est induite lors du phénomène de compétition.

Le cluster 7 contient des ions de masse plus importante ( $m/z \sim 1200$ ). Le cluster 2 contient des nœuds notés avec des ions doublement chargés ( $m/z \sim 600$ ). Comme précédemment, certains

nœuds majoritaires se retrouvent dans les extraits FOCIC à partir de deux semaines de compétition par diffusion à travers la gélose.

Ce réseau moléculaire permet de mieux appréhender l'origine des métabolites et leur diffusion au sein de la gélose. *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* semble produire des peptides analogues de beauvericine et enniatines. Xylariaceae sp. BSNB-0294 produit des métabolites de plus grande masse moléculaire ( $m/z \sim 1200$ ) qui sont également retrouvés par diffusion dans les extraits de phytopathogène. Ce phénomène explique donc l'apparition du signal à 6,7 min dans les extraits FOCIC à deux et trois semaines de co-culture. Afin d'appréhender ce phénomène de diffusion, nous avons choisi de suivre la biosynthèse des métabolites au cours du temps par imagerie en spectrométrie de masse lors de la compétition.

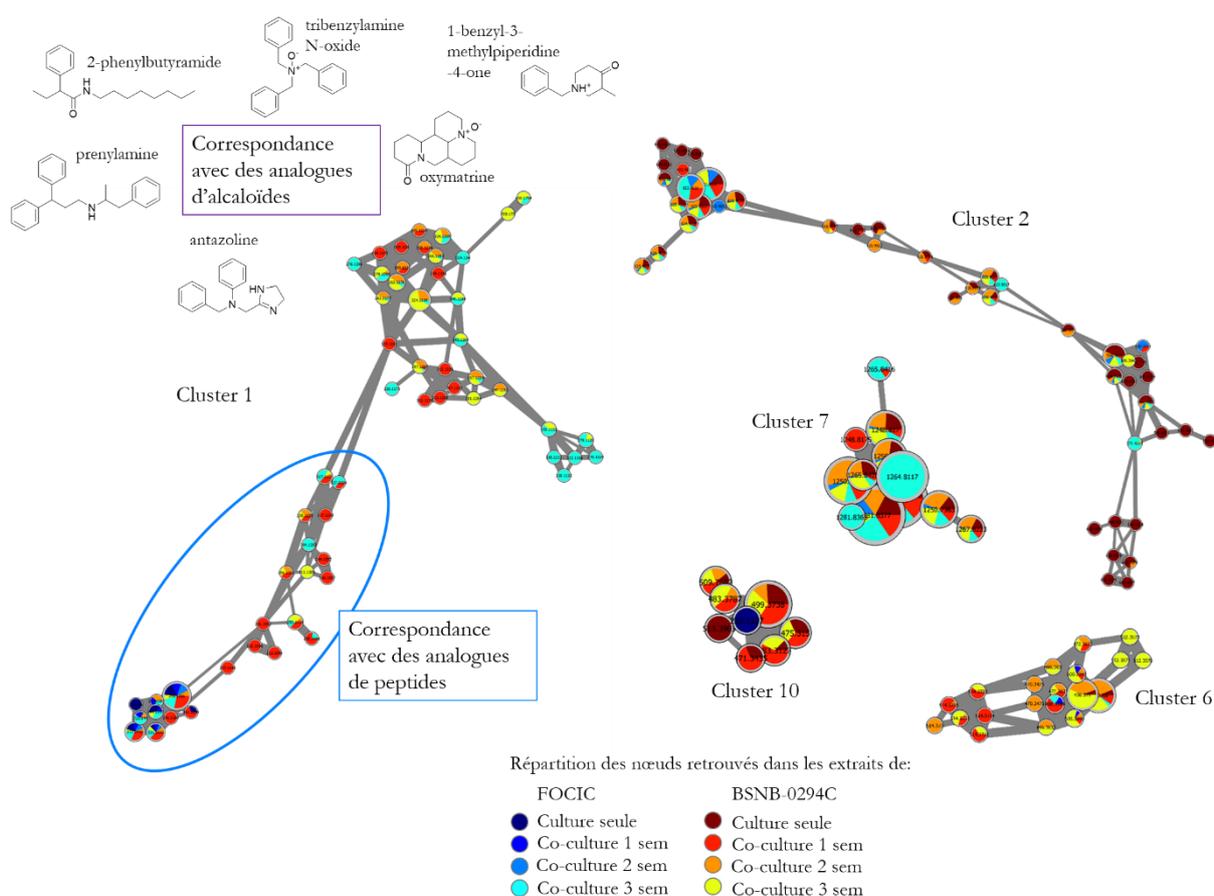


Figure IX. 6. Clusters spécifiques aux extraits de l'endophyte issus du réseau moléculaire regroupant les données MS/MS des extraits de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOCIC) et Xylariaceae sp. (BSNB-0294) en culture seule ou en co-culture de une, deux et trois semaines.

### 9.1.3. Analyse de la compétition par MALDI-TOF

#### 9.1.3.1. Imagerie de la co-culture

Une analyse directe de la compétition entre l'endophyte BSNB-0294 et le phytopathogène FOCIC a pu être réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF en effectuant une empreinte de la boîte de Pétri sur une lame spécifique. Les métabolites déposés sur la lame sont alors ionisés par l'appareil MALDI-TOF, permettant d'obtenir une empreinte spectrale par cartographie de la co-culture. Un suivi de la compétition a ainsi été effectué en analysant les empreintes de la

co-culture à 3, 4, 5, 6, 7, 10 et 23 jours. Avec l'ionisation des métabolites, il est possible d'observer une évolution de leur production et diffusion dans la gélose.

Premièrement, nous pouvons observer que cette technique d'imagerie ne permet pas d'accéder à toute la diversité chimique visible dans les réseaux moléculaires. Cette méthode est beaucoup moins sensible que l'UHPLC-MS/MS et seuls les composés majoritaires ont pu être observés, notamment des composés à  $m/z$  806,49, 987,68, 1145,7 et 1286,88.

Peu de métabolites de l'endophyte sont ionisés lors de l'analyse des empreintes à 3 et 4 jours du fait de la pousse lente de l'endophyte comparée à celle du phytopathogène (Figure IX. 7). L'ion de masse  $m/z$  806,49 précédemment identifié comme analogue de la beauvericine est bien retrouvé produit par le phytopathogène (Figure IX. 7).

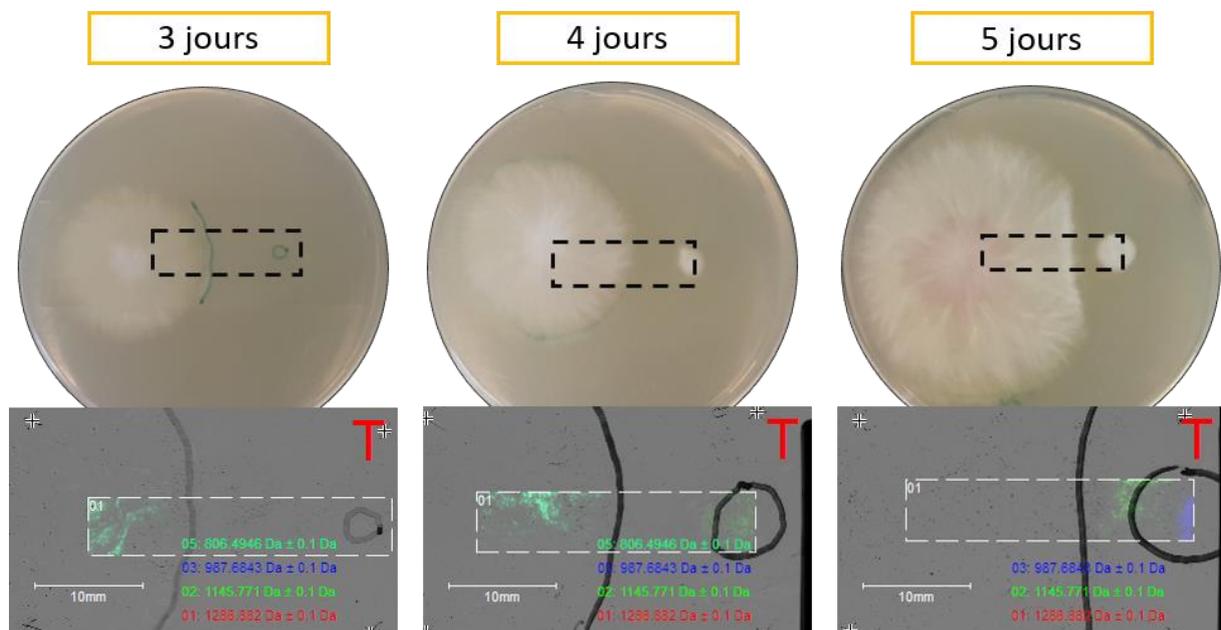


Figure IX. 7. Image par MALDI-TOF MS de la compétition entre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (gauche) et BSNB-0294 (droite) à 3, 4 et 5 jours de co-culture. Les quatre ions les plus intenses de la compétition y sont relevés :  $m/z$  806,49 (bleu clair), 987,68 (bleu foncé), 1145,71 (vert) et 1286,86 (rouge). Les traits noirs indiquent la zone de croissance des deux champignons.

Le début de l'inhibition de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* commence à cinq jours de co-culture lors de notre expérience (Figure IX. 7).

À cinq et six jours, des signaux correspondants à  $m/z$  987,68 et 1145,77 commencent à apparaître au niveau de l'endophyte et dans la gélose en bordure du phytopathogène pour le signal à  $m/z$  1145,77. Enfin à partir de 7 jours, il est possible de voir une intensité plus importante des signaux à  $m/z$  1145,77 et 1286,88 ainsi que leur diffusion au sein du phytopathogène (Figure IX. 8).

Le métabolite correspondant au signal à  $m/z$  987,68 ne semble pas diffuser dans la gélose compte tenu de la localisation de son signal (Figure IX. 8). Il n'est pas retrouvé lors d'une empreinte de la compétition à 23 jours (Annexe S63).

Les ions précédemment observés à  $m/z$  324,13 et 583,31 et dont la production semble élicitée par la compétition ne sont pas détectés par cette technique. L'ion à  $m/z$  1145,77 détecté en imagerie n'est cependant pas retrouvé dans les nœuds du précédent réseau moléculaire, ce qui suggérerait qu'il n'est pas présent dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche BSNB-0294.

Afin d'isoler ces molécules, nous avons alors effectué des extraits de l'endophyte BSNB-0294 avec des solvants de différentes polarités.

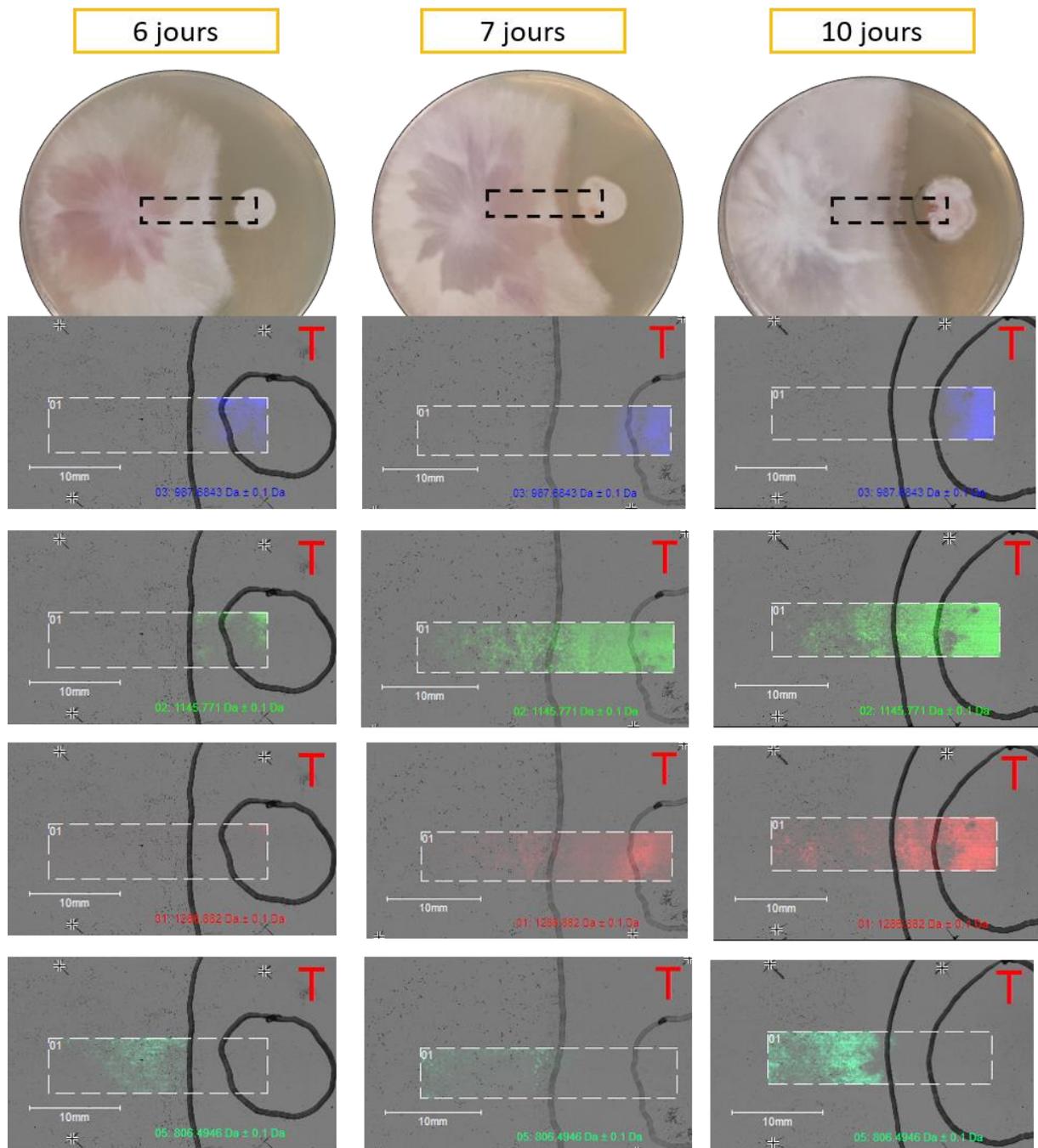


Figure IX. 8. Image par MALDI-TOF MS de la compétition entre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (gauche) et BSNB-0294 (droite) à 6, 7 et 10 jours de co-culture. Les quatre ions les plus intenses de la compétition y sont relevés :  $m/z$  806,49 (bleu clair), 987,68 (bleu foncé), 1145,77 (vert) et 1286,88 (rouge). Les traits noirs indiquent la zone de croissance des deux champignons.

### 9.1.3.2. Extraction de BSNB-0294 par différents solvants

En plus de l'extrait classiquement réalisé à l'acétate d'éthyle (AcOEt), plusieurs solvants ont été utilisés pour la réalisation de différents extraits de BSNB-0294 : butanol, méthanol, acétonitrile et cyclohexane. Un extrait à l'AcOEt non partitionné avec de l'eau a également été produit. Une comparaison des métabolites contenus dans ces extraits est effectuée par analyse MALDI-TOF. Cette analyse montre que selon les solvants utilisés, certains métabolites produits par BSNB-0294 ne sont pas extraits (Annexe S64). C'est notamment le cas des massifs isotopiques à  $m/z$  1123,74  $[M+H]^+$ , 1145,69  $[M+Na]^+$  et 1161,77  $[M+K]^+$ . Ce métabolite n'est pas extrait du micro-organisme lors d'une macération dans l'acétate d'éthyle mais est extrait par le butanol (Figure IX. 9). À l'inverse, le métabolite donnant les massifs à  $m/z$  1286,83  $[M+Na]^+$  et 1302,83  $[M+K]^+$  est peu soluble dans le butanol (Figure IX. 9).

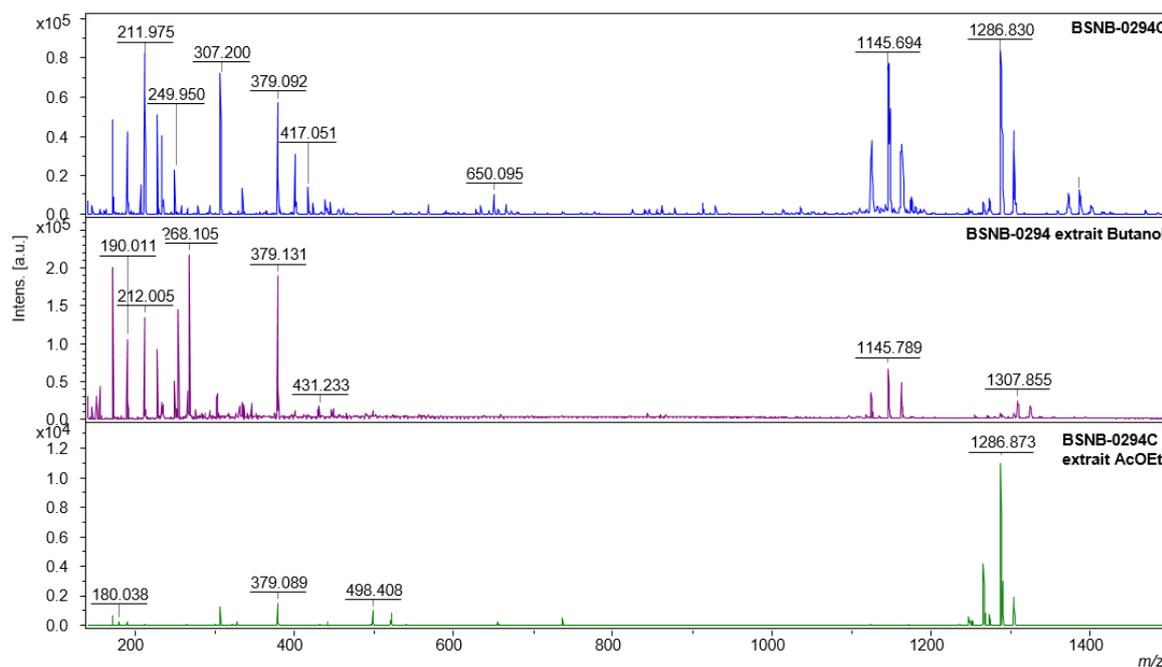


Figure IX. 9. Analyse MALDI-TOF MS d'une empreinte de BSNB-0294 en co-culture avec le phytopathogène à 2 semaines (bleu), de l'extrait butanol (violet) et de l'extrait AcOEt (vert) de BSNB-0294.

Au terme d'une co-culture de trois semaines des deux champignons, plusieurs zones des boîtes de Pétri sont séparément extraites à l'acétate d'éthyle : l'endophyte (zone 1), le milieu de culture autour de l'endophyte (zone 2), la zone de confrontation (zone 3) et le phytopathogène (zone 4) (Figure IX. 10).



Figure IX. 10. Zones récoltées de la compétition pour réaliser différents extraits.

Dans les quatre zones extraites, le massif à  $m/z$  1286,83 est retrouvé ce qui démontre également le phénomène de diffusion de ce métabolite de l'endophyte vers le phytopathogène (Annexe S65).

Ces comparaisons montrent que l'extrait à l'acétate d'éthyle classiquement étudié ne rend pas compte de l'ensemble de la diversité chimique de la souche BSNB-0294.

Avant de procéder à une étude métabolique, il est important de savoir si l'extrait à l'AcOEt de BSNB-0294 renferme les métabolites actifs contre *F. oxysporum*.

#### 9.1.4. Activité antifongique des extraits

Les extraits à l'AcOEt obtenus pour ces zones ont été testés contre le phytopathogène par diffusion en gélose (50  $\mu$ L d'extrait à la concentration de 10 mg/mL).

D'après les halos d'inhibition formés, l'extrait de l'endophyte (zone 1) possède une activité moins forte que l'extrait du milieu (zone 2) ou de la zone de confrontation (zone 3). L'extrait du phytopathogène en compétition possède également une activité contre lui-même.

Les extraits de BSNB-0294 obtenus suivant différents solvants sont également testés contre le phytopathogène par diffusion en gélose afin de voir si un solvant extrait préférentiellement les molécules actives de l'endophyte. Tous ces extraits montrent une activité antifongique plus ou moins marquée. Les extraits à l'acétate d'éthyle et au butanol sont ceux formant les halos d'inhibition les plus grands (Annexe S66).

#### 9.1.5. Discussion

Toutes ces analyses sur la co-culture entre BSNB-0294 et *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* permettent de cibler des molécules potentiellement bioactives lors de l'étude chimique de ces souches.

Tout d'abord, un phénomène de diffusion des molécules produites entre  $m/z$  1100 et 1300 par Xylariaceae sp. BSNB-0294 est observé dans la gélose. Cette diffusion s'observe en imagerie à partir de cinq jours de culture et corrèle avec le début d'inhibition de la pousse du phytopathogène *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Les tests d'activité des extraits suivant les différentes zones de la co-culture indiquent que les molécules actives de l'endophyte contre le phytopathogène diffusent bien à travers la gélose. En effet les extraits de la gélose, et de la zone de confrontation montrent un halo d'inhibition de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Ces molécules pourraient potentiellement être responsables de l'activité antifongique et ont donc été ciblées pour être isolées et identifiées. Aucun analogue de ces molécules n'a été proposé lors de la comparaison des spectres MS/MS avec les bases de données disponibles. Cependant, il a pu être aussi constaté que l'acétate d'éthyle ne permettait pas d'isoler l'ensemble des métabolites produits par la souche BSNB-0294.

Des analogues de beauvericine et d'enniatiines sont identifiés dans les extraits de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Ces molécules sont connues pour être produites par les champignons du genre *Fusarium*.<sup>390</sup>

Il a été également possible d'observer avec la comparaison des profils UHPLC de ces co-cultures une production exacerbée de certains métabolites comparé à leur production lorsque le micro-organisme pousse seul :

- deux signaux à  $m/z$  324,31 au sein des extraits de Xylariaceae sp.
- un signal à  $m/z$  583,31 au sein des extraits de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*.

<sup>390</sup> Liuzzi V. C., Mirabelli V., et al., Enniatin and Beauvericin biosynthesis in *Fusarium* species: production profiles and structural determinant prediction. *Toxins* **2017**, *9*, p. 45.

Les ions relatifs à ces masses sont retrouvés dans le réseau moléculaire formé avec les données MS/MS de ces extraits. D'autres ions sont également retrouvés mais n'étaient pas détectés dans les analyses des profils UHPLC. Il semblerait que les molécules ciblées de  $m/z$  324,311 soient des analogues d'alcaloïdes, en revanche, aucun analogue de l'ion à  $m/z$  583,31 n'a pu être proposé. Nous nous sommes intéressés à ce métabolite car il est produit par FOCIC en réaction à la présence de l'endophyte : sa production pourrait être impliquée dans un processus de défense du phytopathogène contre cette « agression » microbienne. L'isolement et l'identification de ces métabolites ont été effectués par la suite.

## 9.2. Etude chimique des extraits de BSNB-0294 et *F. oxysporum* lors de leur co-culture

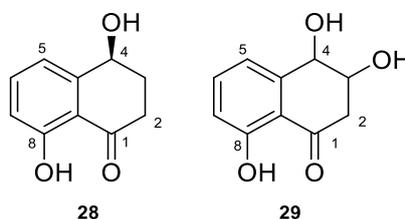
À l'issue d'une co-culture à grande échelle, deux extraits ont été obtenus :

- BSNB-0294C pour la partie « endophyte »
- FOCIC pour la partie « phytopathogène » des boîtes de Pétri.

Pour chaque extrait, un fractionnement par chromatographie flash a été réalisé permettant d'obtenir plusieurs fractions de polarités décroissantes (Partie 10.11 p.204).

### 9.2.1. Etude chimique de l'extrait BSNB-0294C

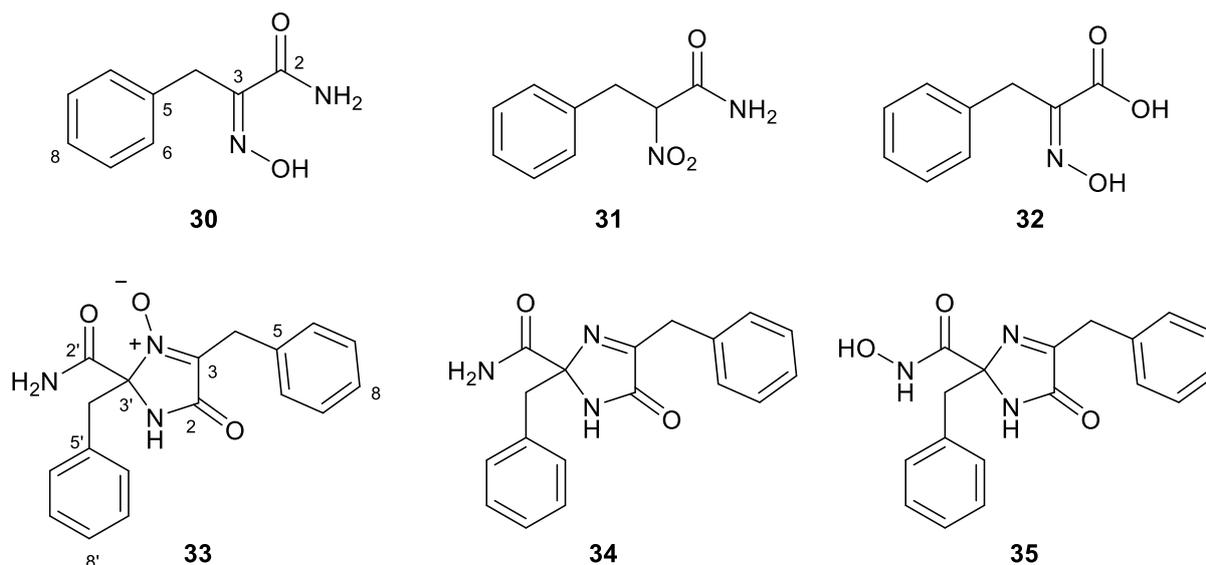
Le fractionnement de BSNB-0294C a permis d'obtenir neuf fractions notées de F1 à F9. La purification des fractions BSNB-0294C-F2 et -F3 a permis l'isolement et l'identification de deux dérivés naphthalénone : la (+)-(4*S*)-4,8-dihydroxy- $\alpha$ -tétralone (**28**) et la 3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphtalen-1(2*H*)-one (**29**).



Ces molécules ont été identifiées grâce aux données de spectrométrie de masse haute résolution et de RMN 1D (Annexes S67 et S69) et 2D. Une cyclisation est construite d'après la corrélation HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  entre H-4 et C-8a. La configuration absolue de la 4,8-dihydroxy- $\alpha$ -tétralone a été déterminée par comparaison de son pouvoir rotatoire avec la littérature.<sup>391</sup> En revanche, la présence de plusieurs signaux sur le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  de la 3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphtalen-1(2*H*)-one (**29**) pour les carbones à  $\delta_c$  120,1 (C-5) et 70,3 (C-3) indique un mélange de plusieurs configurations. La molécule isolée n'est donc pas énantiomériquement pure et la configuration n'a pas pu être déterminée.

La comparaison des profils UHPLC des extraits réalisés lors de la co-culture avec le profil des fractions a montré que les deux signaux identifiés précédemment à 4,4 et 4,7 min se retrouvent dans la fraction BSNB-0294C-F3. Cette dernière a donc été purifiée pour identifier les métabolites dont la production est stimulée lors de la compétition (Partie 9.1.1 p.157). La purification de cette fraction a permis d'isoler six métabolites. Les structures de ces molécules sont ici proposées d'après l'ensemble des données spectrométriques obtenues (Annexes S69 à S74).

<sup>391</sup> Talapatra S. K., Karmacharya B., *et al.*, (-)-Regiolone, an  $\alpha$ -tetralone from *Juglans regia*: structure, stereochemistry and conformation. *Phytochemistry* **1988**, 27, p. 3929–3932.



La molécule **30** présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  mesuré à  $m/z$  179,0816 ce qui correspond à une formule brute  $C_9H_{10}N_2O_2$  (calc.  $[M+H]^+$  179,0815, err. 0,56 ppm). Le spectre RMN- $^1H$  ainsi que le spectre HSQC  $^1H$ - $^{13}C$  permettent d'identifier la présence d'un cycle benzénique ( $\delta_H$  7,26-7,19 et  $\delta_C$  129,8, 129,4 et 127,2), un méthylène ( $\delta_H$  3,87 et  $\delta_C$  29,5) ainsi que trois protons échangeables ( $\delta_H$  9,58 / 6,71 et 5,74). Le spectre RMN- $^{13}C$  indique la présence de trois carbones quaternaires, un appartenant au cycle benzénique ( $\delta_C$  138,0) et deux autres de déplacement  $\delta_C$  153,6 et 165,9. Les corrélations HMBC  $^1H$ - $^{13}C$  lient le méthylène au cycle benzénique (Figure IX. 11). Ce méthylène corrèle également avec les deux carbones quaternaires à  $\delta_C$  153,6 et 165,9. Le spectre HSQC  $^1H$ - $^{15}N$  permet d'identifier une amine primaire à  $\delta_N$  92,0 et le spectre HMBC  $^1H$ - $^{15}N$  montre une corrélation entre les protons du méthylène et un deuxième azote à  $\delta_N$  373,5 pouvant coïncider avec le déplacement d'une amine tertiaire. Afin de respecter la formule brute, le carbone quaternaire à  $\delta_C$  165,9 correspondrait à une double liaison C=O et il y aurait la présence d'un hydroxyle OH. La 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanamide (**30**) est alors identifiée avec la présence d'une oxime, satisfaisant toutes les corrélations observées et les déplacements chimiques des protons, carbones et azotes. Ce métabolite a été précédemment isolé d'une souche d'*Aspergillus terreus* ce qui permet de confirmer cette identification.<sup>392</sup>

La molécule **31** présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  195,0772 permettant d'identifier la formule brute  $C_9H_{10}N_2O_3$  (calc.  $[M+H]^+$  195,0764, err. 4,10 ppm). Le spectre RMN- $^1H$  ainsi que le spectre HSQC  $^1H$ - $^{13}C$  permet d'identifier comme pour la molécule **30** la présence d'un cycle benzénique ( $\delta_H$  7,25-7,21 et  $\delta_C$  130,0, 129,7 et 128,3), un méthylène ( $\delta_H$  [3,41 / 3,29] et  $\delta_C$  36,7) et deux protons échangeables ( $\delta_H$  6,49 et 6,07). Une méthine est également identifiée ( $\delta_H$  5,35 et  $\delta_C$  90,5). De nouveau, une amine primaire  $\delta_N$  103,5 est identifiée par le spectre HSQC  $^1H$ - $^{15}N$ , le deuxième azote prédit par la formule brute est donc une amine tertiaire. D'après les corrélations COSY  $^1H$ - $^1H$ , la méthine H-3 et le méthylène H-4 sont placés à côté (Figure IX. 11). De la même façon que pour la molécule **30**, le cycle benzénique est placé à côté du méthylène. Le spectre HMBC  $^1H$ - $^{15}N$  montre des corrélations entre les protons H-3 et H-4 avec l'azote tertiaire à  $\delta_N$  79,8, cet azote est ainsi placé en position 3. Une fonction amide est identifiée, permettant de satisfaire les corrélations HMBC  $^1H$ - $^{13}C$  entre H-3, H-4 et  $\delta_C$  166,0 ainsi que la présence d'une amine primaire. Deux oxygènes restent à placer afin de respecter la formule brute de  $C_9H_{10}N_2O_3$ . L'azote tertiaire est alors identifié comme un nitro. Cependant, le déplacement de  $\delta_N$  79,8 est relativement faible par rapport aux prédictions usuelles d'une fonction nitro, usuellement de  $\delta_N$  autour de 300 ppm.

<sup>392</sup> Guo C.-J., Yeh H.-H., *et al.*, Biosynthetic pathway for the Epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, p. 7205–7213.

Des effets de conjugaison pourraient expliquer ce blindage de l'azote tertiaire. De plus, le spectre de masse de la molécule indique la présence d'un signal à  $m/z$  148,0750, pouvant correspondre à la perte du nitro sur la molécule. La 2-nitro-3-phénylpropanamide (**31**) est alors identifiée et n'avait jamais été décrite auparavant comme produite par un micro-organisme.

La molécule **32** présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  180,0659 permettant d'identifier la formule brute  $C_9H_9NO_3$  (calc.  $[M+H]^+$  180,0655, err. 2,22 ppm). Les spectres RMN- $^1H$  et  $^{13}C$  sont identiques avec ceux de la 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanamide (**30**) hormis les protons échangeables : aucun autre proton n'est visible sur le spectre RMN- $^1H$ . Un proton à  $\delta_H$  10,01 est légèrement distinguable. Les spectres HSQC et HMBC  $^1H$ - $^{15}N$  ne montrent aucune corrélation. Comparé à la molécule **30**, la fonction amide est remplacée par une fonction acide carboxylique pour la molécule **32**. L'acide 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanoïque (**32**) a donc pu être identifiée par comparaison des données RMN recensées dans la littérature.<sup>393</sup> Cette molécule a précédemment été isolée de l'éponge marine *Psammaplysilla purpurea*.

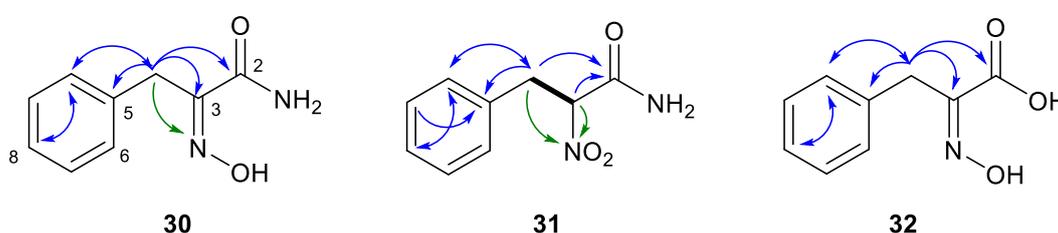


Figure IX. 11. Corrélations COSY  $^1H$ - $^1H$  (trait plein), HMBC  $^1H$ - $^{13}C$  (flèche bleue) et HMBC  $^1H$ - $^{15}N$  (flèche verte) visibles sur les spectres RMN 2D ayant permis la détermination des molécules **30**, **31** et **32**.

Les molécules **33**, **34** et **35** montrent sur leurs spectres RMN- $^1H$  la présence de deux cycles benzéniques, de deux méthylènes sous forme dédoublée ou de singulet et également des protons échangeables, ce qui laisserait supposer que ces molécules contiennent des motifs phénylalanines similaires aux molécules **30**, **31** et **32**.

La molécule **33** présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de  $m/z$  324,1345 permettant d'identifier la formule brute  $C_{18}H_{17}N_3O_3$  (calc.  $[M+H]^+$  324,1343, err. 0,62 ppm). Les deux méthylènes de son spectre RMN- $^1H$  sont sous forme dédoublée et trois protons échangeables sont observés. D'après le spectre HMBC  $^1H$ - $^{13}C$ , les protons H-4 (méthylène d'un premier groupement benzyle) corrélient avec deux carbones quaternaires à  $\delta_C$  139,5 et  $\delta_C$  164,0 (Figure IX. 12). Quant au méthylène du deuxième groupement benzyle, les protons H-4' corrélient aussi avec deux carbones quaternaires, l'un davantage blindé à  $\delta_C$  88,9 et l'autre à  $\delta_C$  166,8. Le spectre HSQC  $^1H$ - $^{15}N$  indique la présence d'une amine primaire  $\delta_N$  96,7 et d'une amine secondaire  $\delta_N$  113,9. Le troisième azote prédit par la formule brute est donc une amine tertiaire. Le spectre HMBC  $^1H$ - $^{15}N$  permet d'identifier son déplacement à  $\delta_N$  304,7. Les deux méthylènes corrélient avec cet azote tertiaire. Le méthylène H-4' corrélient également avec l'amine secondaire à  $\delta_N$  113,9. La structure de la molécule **33** proposée permet de satisfaire toutes les corrélations observées ainsi que les déplacements chimiques. Afin de correspondre à la formule brute de  $C_{18}H_{17}N_3O_3$ , un oxygène est placé sur l'azote tertiaire, celui-ci étant alors un azote quaternaire. La fonction nitrone est alors identifiée, c'est-à-dire une *N*-oxydation de l'imine. Ainsi nous avons pu identifier la 2,4-dibenzyl-2-carbamoyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole 3-oxide (**33**).

<sup>393</sup> Yagi H., Matsunaga S., *et al.*, Purpuramines A-I, new bromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Psammaplysilla purpurea*. *Tetrahedron* **1993**, 49, p. 3749-3754.

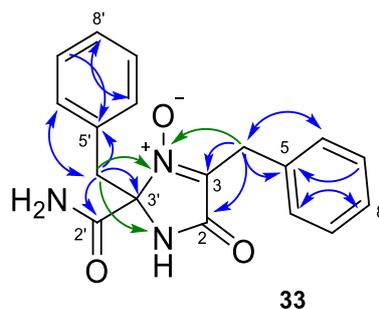


Figure IX. 12. Corrélations HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (flèche bleue) et HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (flèche verte) visibles sur les spectres RMN 2D ayant permis la détermination de la molécule **33**.

La molécule **34** présente un ion moléculaire  $[\text{M}+\text{H}]^+$  à  $m/z$  308,1407 permettant d'identifier la formule brute  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$  (calc.  $[\text{M}+\text{H}]^+$  308,1394, err. 4,21 ppm). Le spectre RMN- $^1\text{H}$  de cette molécule présente à nouveau les deux cycles benzyles. Trois protons échangeables sont visibles. Comme pour la molécule **33**, quatre carbones quaternaires sont visibles sur le spectre RMN- $^{13}\text{C}$  : trois carbones  $\text{sp}^2$  et un carbone  $\text{sp}^3$ . Le spectre HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  montre de la même façon que pour la molécule **33**, trois azotes : une amine primaire  $\delta_{\text{N}}$  99,5, une amine secondaire  $\delta_{\text{N}}$  136,0 et une amine tertiaire  $\delta_{\text{N}}$  136,7. Les corrélations HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  sont identiques à celle de la molécule **33**. Comparé à celle-ci, le déplacement de l'amine tertiaire est moindre et compte tenu de la prédiction de la formule brute indiquant un oxygène en moins, la molécule **34** correspondrait à la molécule **33** avec une fonction imine à la place de la nitrone. L'absence de cet oxygène sur l'azote expliquerait les variations de déplacements chimiques des carbones C-3 et C-4 par rapport à la molécule **33**. La 2,4-dibenzyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole-2-carboxamide (**34**) a ainsi pu être identifiée.

La molécule **35** est un isomère de la 2,4-dibenzyl-2-carbamoyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole 3-oxide **33** avec un ion moléculaire  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  324,1342 permettant d'identifier la formule brute de  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$  (calc.  $[\text{M}+\text{H}]^+$  324,1343, err. -0,31 ppm). Le spectre RMN- $^1\text{H}$  en revanche ne permet pas de distinguer facilement des protons échangeables, notamment les protons d'une amine primaire. Les spectres RMN 1D et 2D sont similaires à ceux de la molécule **34**. Afin de corréliser avec la formule brute prédite, une fonction acide hydroxamique est formée. La 2,4-dibenzyl-*N*-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole-2-carboxamide (**35**) est alors identifiée. Ces trois dernières molécules n'avaient jamais été précédemment identifiées dans la littérature.

La configuration des molécules ne peut pas être déterminée par les spectres NOESY précédemment réalisés dans l'acétonitrile deutéré, notamment celle de l'oxime pour les molécules **30** et **32**. Des spectres NOESY dans le DMF deutéré sont actuellement en cours de réalisation. Pour les molécules **33**, **34** et **35**, une comparaison des spectres de dichroïsme circulaire théorique et expérimental est également en cours afin d'obtenir la configuration du carbone asymétrique en position 3'.

La fraction BSNB-0294C-F5 a également été purifiée afin d'identifier les métabolites possédant une activité antifongique contre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*.

Ainsi, le composé majoritaire de l'extrait a été isolé. La mesure de spectrométrie de masse haute résolution à  $m/z$  1264,8052  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de cette molécule indique la formule brute  $\text{C}_{62}\text{H}_{109}\text{N}_{11}\text{O}_{16}$  (calc.  $[\text{M}+\text{H}]^+$  1264,8127, err. -5,93 ppm). La RMN- $^1\text{H}$  ainsi que l'expérience HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  nous permet d'identifier différents types de protons (Annexe S75). Tout d'abord quatre protons libres sont

détectés à des déplacements  $\delta_H$  8,94 / 8,14 / 8,02 et 7,89 ppm. L'intégration des pics permet également d'identifier six méthyles plutôt déblindés à des  $\delta_H$  de 3,14 / 3,11 / 3,04 / 2,91 / 2,90 et 2,79, dont le déplacement des carbones est  $\delta_C$  31,5 / 36,0 / 40,4 / 31,6 / 32,7 et 29,4 respectivement. Au vu de leur déplacement, ces méthyles seraient portés par des azotes. Entre  $\delta_H$  3,5 et 5,2, quinze protons méthines sont identifiés avec des  $\delta_C$  entre 52,6 et 74,6. Le déblindage de ces carbones indiquent une proximité avec des oxygènes ou des azotes. De même, un méthylène à  $\delta_H$  3,95 et 3,74 ppm de  $\delta_C$  49,0 serait proche d'un oxygène au vu de son déblindage. Enfin de nombreux méthyles sont identifiés dans la région entre  $\delta_H$  0,5 et 1,5 ainsi que plusieurs protons méthines ou méthylènes dans la région de  $\delta_H$  1,0 à 2,8.

Les corrélations visibles sur les spectres RMN 2D COSY  $^1H$ - $^1H$  et HMBC  $^1H$ - $^{13}C$ , permettent d'identifier douze acides aminés ou analogues : six possèdent un méthyle sur l'azote (une leucine, une alanine, deux thréonines et deux valines), cinq acides aminés sans modifications (une proline, une serine et trois valines) et le dernier correspond à l'acide leucique (HICA) où l'azote de la liaison peptidique est remplacé par un oxygène compte tenu du déplacement du carbone en  $\alpha$  à  $\delta_C$  74,6. La formule brute  $C_{62}H_{109}N_{11}O_{16}$  est ainsi respectée. Les thréonines et serine ont été identifiées avec le déblindage respectivement des méthylènes et du méthine ( $\delta_C$  entre 62,7 et 67,9) indiquant la présence d'un oxygène sur ces carbones.

Cette molécule est donc un depsipeptide dont la séquence reste à déterminer. Pour cela, des corrélations sur le spectre HMBC  $^1H$ - $^{13}C$  ont permis d'identifier deux morceaux de molécules. Ces corrélations se font soit entre les protons  $\alpha$  et les deux carbones des doubles liaisons C=O qui les entourent, soit entre le méthyle porté par l'azote et le carbone de la double liaison C=O de l'acide aminé suivant, soit enfin entre les protons  $\beta$  de l'acide aminé et le carbone de la double liaison C=O (Figure IX. 13).

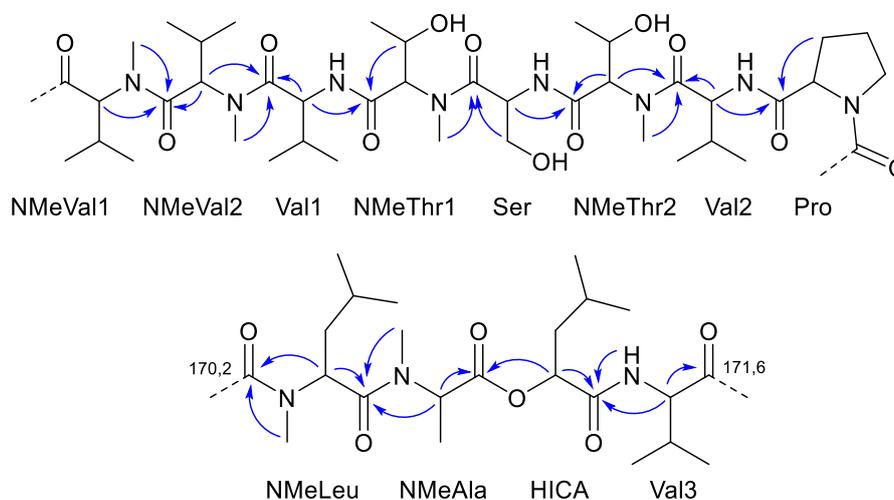
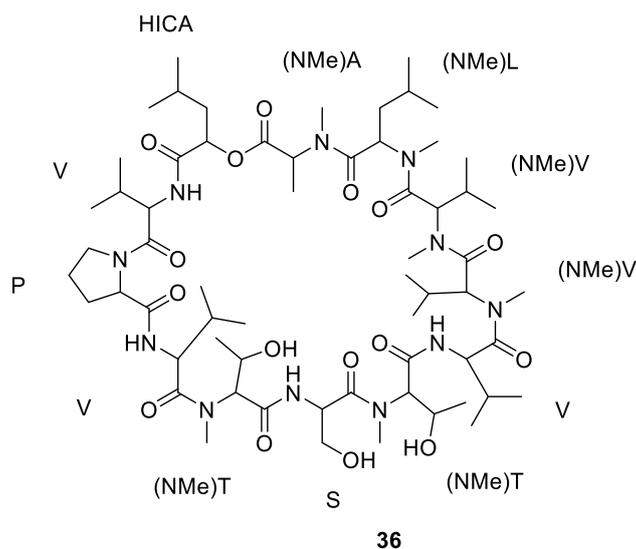


Figure IX. 13. Corrélations HMBC  $^1H$ - $^{13}C$  (flèche bleue) permettant de définir l'enchaînement des acides aminés qui composent la molécule **36**.

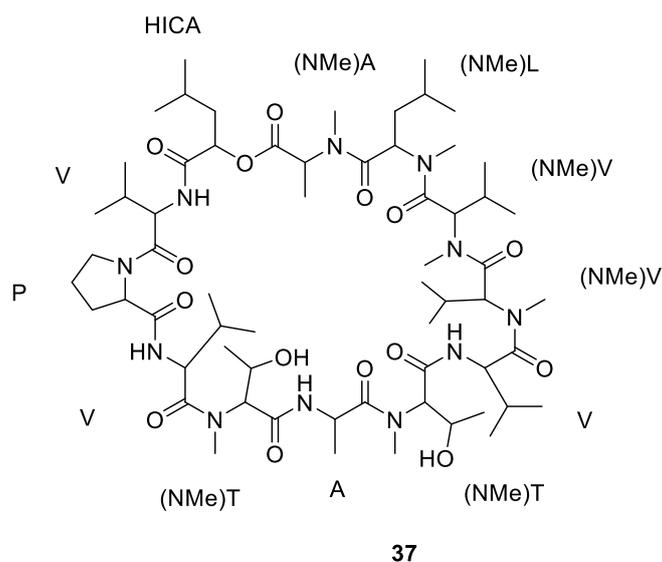
Cependant, la séquence ne peut pas être terminée avec les corrélations HMBC  $^1H$ - $^{13}C$  car les corrélations manquantes ne peuvent pas être distinguées : en effet, quatre protons  $\alpha$  ont le même déplacement à  $\delta_H$  4,94. Néanmoins, comme deux morceaux de chaîne ont été identifiés, un seul enchaînement est possible, afin de respecter les liaisons peptidiques, et permet de former la molécule **36**.



Grâce à la fragmentation MS/MS, la séquence peut être confirmée (Annexe S75). Ce depsipeptide cyclique, majoritaire de l'extrait est nommé xylariacéine A (**36**).

D'autres depsipeptides ont été isolés dans des quantités plus faibles lors du travail des fractions de cet extrait (entre 0,5 et 1,5 mg). Ces quantités n'ont pas permis une identification par RMN, cependant la masse mesurée en haute résolution et les spectres de fragmentation MS/MS donnent des indications sur ces analogues.

Un depsipeptide à  $m/z$   $[M+H]^+$  1248,8201 possède un spectre très similaire à la xylariacéine A (**36**). La formule brute prédite de  $C_{62}H_{109}N_{11}O_{15}$  (calc.  $[M+H]^+$  1248,8177, err. -1,92 ppm) indique la perte d'un oxygène. Les différences sur le spectre RMN- $^1H$  se situent sur l'absence du signal intégrant pour le méthylène de la sérine à  $\delta_H$  3,82 et sur une variation dans les déplacements des protons de la *N*-méthylthréonine (NMeThr2) : à la place de la sérine se trouve une alanine avec un méthyle à  $\delta_H$  1,37. Le spectre de fragmentation est alors analysé afin de confirmer cette hypothèse. Des fragments sont retrouvés correspondant à cette structure, et la xylariacéine B (**37**) a ainsi pu être identifiée (Annexe S76).



Plusieurs depsipeptides possèdent des masses à  $m/z$   $[M+H]^+$  1250,7516 indiquant la perte d'un  $CH_2$  sur un acide aminé par rapport à la xylariacéine A. Cependant, les structures de ces depsipeptides n'ont pas pu être prédites car les spectres RMN- $^1H$  et de fragmentation sont très

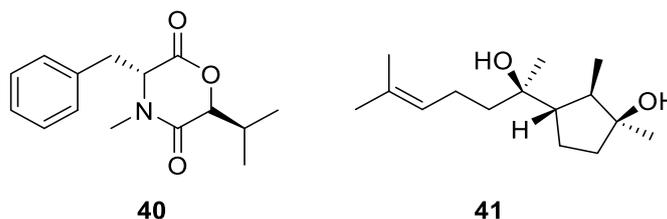
différents de la xylariacéine A et indiquent une composition et un enchaînement différents des acides aminés.

Enfin, deux acides gras ont pu être identifiés à partir des fractions les plus apolaires BSNB-0294C-F6 et F6-1 : le 1-linoléoyl glycérol (**38**) et l'acide linoléique (**39**). Ces acides gras ont pu être identifiés par les données HRMS, les spectres RMN et par comparaison avec la littérature (Annexe S77 et S78).<sup>394,395</sup> La configuration *E* des doubles liaisons est déterminée avec la constante de couplage *J* des méthylènes en position 8 et position 14.<sup>370</sup>

### 9.2.2. Etude chimique de l'extrait FOCIC

Le processus de déréplication lors de l'analyse du réseau moléculaire a montré la présence d'analogues de beauvericine et d'enniatiines dans l'extrait du phytopathogène étudié. En parallèle, la comparaison des extraits de la compétition au cours du temps a permis d'identifier un ion à *m/z* 583,31 dont le signal est plus intense lors de la compétition (Partie 9.1.1 p.157).

Cet ion à *m/z* 583,31 est présent dans la fraction FOCIC-F7. La purification de cette fraction a permis l'isolement de quatre molécules dont deux molécules connues : la bassiatine (**40**) et le (-)-cyclonerodiol (**41**). Ces molécules ont été identifiées par l'analyse des spectres RMN 1D et 2D, la mesure de la masse en haute résolution et la comparaison avec les données de la littérature (Annexes S79 et S80).<sup>396,397</sup> La xylariacéine A (**36**) produite par BSNB-0294 est également isolée suite à sa diffusion dans le milieu de culture d'après le spectre RMN-<sup>1</sup>H et la mesure de la masse en haute résolution.



La molécule **42** isolée est la molécule ciblée, possédant l'ion moléculaire à *m/z* 583,3135 qui détermine une formule brute C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>11</sub> (calc. [M+H]<sup>+</sup> 583,3113, err. 3,77 ppm) (Annexe S81). Le spectre RMN-<sup>1</sup>H ainsi que l'expérience 2D HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C permettent d'identifier quatre méthines associées à une insaturation ( $\delta_H$  6,09 / 6,02 / 5,56 et 5,20), neuf autres méthines, dont six étant plus déblindées ( $\delta_H$  4,69 / 4,65 / 3,41 / 3,39 / 3,36 / 3,28 / 2,53 / 1,85 et 1,69), cinq méthylènes dont un plus déblindé ( $\delta_H$  [3,80 et 3,70] / 2,57 / 2,43 / [1,36 et 1,09] / [1,48 et 1,05]) ainsi que six groupements méthyles. Le spectre RMN-<sup>13</sup>C indique en plus la présence de six carbones quaternaires ( $\delta_C$  173,1 / 165,1 / 164,2 / 163,3 / 132,6 et 123,7).

Les corrélations COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H permettent de relier les protons entre H-11 ( $\delta_H$  5,20  $\delta_C$  139,3) et H-18 ( $\delta_H$  0,89  $\delta_C$  11,6) (Figure IX. 14). Trois groupements méthyles ( $\delta_H$  0,92  $\delta_C$  20,3 /  $\delta_H$  0,88  $\delta_C$  17,6 et  $\delta_H$  0,87  $\delta_C$  16,0) sont ainsi placés sur cette chaîne respectivement sur la position 12, 14 et 16. Le

<sup>394</sup> Kawaguchi M., Fukuda T., *et al.*, A new ascochlorin derivative from *Cylindrocarpon* sp. FKI-4602. *J. Antibiot.* **2013**, 66, p. 23–29.

<sup>395</sup> Jiang J., Yu X., *et al.*, Chemical constituents of the roots of *Patrinia scabiosaeifolia* and the cytotoxicity of Patrineolignans A and B. *Chem. Nat. Compd.* **2017**, 53, p. 143–146.

<sup>396</sup> Kagamizono T., Nishino E., *et al.*, Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. *J. Antibiot.* **1995**, 48, p. 1407–1412.

<sup>397</sup> Langhanki J., Rudolph K., *et al.*, Total synthesis and biological evaluation of the natural product (-)-Cyclonerodiol, a new inhibitor of IL-4 signaling. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, p. 9707–9715.

déplacement carbone du méthine en position 15 à  $\delta_C$  83,7 indique la présence d'un oxygène. D'après les corrélations HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , le proton H-15 corrèle avec un carbone quaternaire à  $\delta_C$  173,1. Un groupement ester est ainsi placé en position 15, compte tenu du méthyle à  $\delta_H$  2,05  $\delta_C$  20,9 qui corrèle également avec le carbone quaternaire à  $\delta_C$  173,1. Les protons de H-6 à H-9 sont également reliés par les corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  indiquant ainsi l'enchaînement de deux méthylènes ( $\delta_H$  2,57 et 2,43) à une double liaison ( $\delta_H$  5,56  $\delta_C$  125,9 /  $\delta_H$  6,09  $\delta_C$  139,3) (Figure IX. 14).

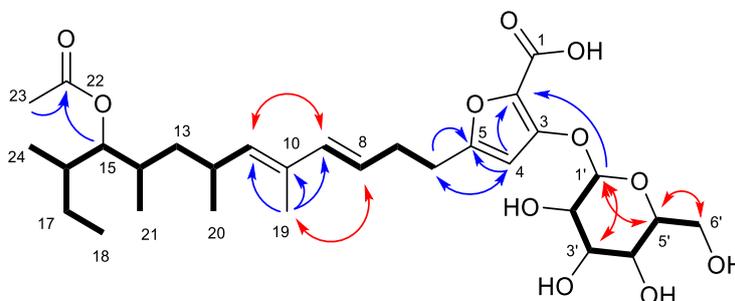


Figure IX. 14. Corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (trait plein), HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (flèche bleue) et NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (flèche rouge) visibles sur les spectres RMN 2D ayant permis la détermination de la molécule **42**.

Les corrélations HMBC permettent de placer le carbone quaternaire à  $\delta_C$  132,6 entre les protons CH insaturés H-9 ( $\delta_H$  6,09  $\delta_C$  137,8) et H-11 ( $\delta_H$  5,20  $\delta_C$  139,3). Une chaîne alkyle est ainsi formée, avec la succession de ces deux doubles liaisons. Le dernier groupement méthyle à  $\delta_H$  1,73  $\delta_C$  12,8 est placé sur ce carbone quaternaire compte tenu de ses corrélations HMBC avec C-9, C-10 et C-11 (Figure IX. 14).

La constante de couplage entre H-8 et H-9 est évaluée à 15,3 Hz ce qui atteste d'une configuration *E* de la double liaison.<sup>370</sup> Des corrélations NOESY permettent de déterminer la configuration de la double liaison en position 10 et 11 : les protons du groupement méthyle en position 19 corrèlent avec le proton H-8 et une corrélation NOESY est observée entre H-9 et H-11.

Un groupement hexose est également identifié d'après les déplacements caractéristiques des protons ( $\delta_H$  entre 4,70 et 3,20) et des carbones ( $\delta_C$  106,3 pour le proton anomérique,  $\delta_C$  62,2 pour le  $\text{CH}_2$  puis  $\delta_C$  entre 70 et 80 pour les méthines) ainsi que les corrélations COSY permettant de déterminer la succession d'un méthylène déblindé et de cinq méthines. Les corrélations NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  entre H-1' ( $\delta_H$  4,69) et H-5' ( $\delta_H$  3,28) permettent de déterminer la configuration  $\beta$  de ce sucre.

Afin de correspondre à la formule brute ainsi qu'aux spectres RMN, quatre carbones quaternaires ( $\delta_C$  165,1 / 164,2 / 163,3 et 123,7) restent à placer sur la molécule ainsi qu'une méthine insaturée ( $\delta_H$  6,01  $\delta_C$  103,1), trois oxygènes et un proton labile. Quatre autres insaturations restent à intégrer.

Compte tenu des corrélations HMBC entre les méthylènes en position 6 et 7 et le carbone à  $\delta_C$  163,3, la chaîne alkyle peut être rattachée à ce carbone quaternaire. Le déblindage de ce carbone laisse supposer la présence d'un oxygène sur ce dernier. Les corrélations HMBC entre le méthylène en position 6 et le dernier méthine ( $\delta_H$  6,02  $\delta_C$  103,1) permet de déterminer une double liaison en position 4 et 5.

Le proton de cette double liaison ainsi que le proton anomérique H-1' du sucre corrèlent tous deux avec le carbone quaternaire à  $\delta_C$  123,7 d'après le spectre HMBC. Les derniers carbones quaternaires à  $\delta_C$  165,1 et  $\delta_C$  164,2 ne sont en revanche vus par aucun proton sur le spectre HMBC.

Afin de respecter le nombre d'oxygène et de protons de cette molécule, un groupement carboxylique peut être associé à l'un de ces carbones quaternaires.

Ainsi la formation d'un cycle furane substitué par un acide carboxylique, un sucre et la chaîne alkyle précédemment identifiée permet de respecter le nombre d'insaturations ainsi que la formule brute de la molécule. En revanche, si la position de la chaîne alkyle est clairement déterminée par les corrélations HMBC, les positions du groupement carboxylique et du sucre restent à établir sachant que les spectres RMN n'apportent aucune indication.

Deux possibilités sont évaluées : soit l'acide carboxylique est en position 2 et le sucre en position 3, soit l'inverse. Les déplacements chimiques des carbones sont alors déterminants du fait du déblindage apporté par la présence des oxygènes. D'après les prédictions de ces déplacements (Figure IX. 15), la substitution du sucre en position 2 occasionnerait un déplacement chimique de C-2 avec un  $\delta_c$  autour de 167 et un déplacement de C-3 vers  $\delta_c$  90, ce qui est loin des déplacements observés. En revanche, la substitution du sucre en position 3 fait bien correspondre les déplacements à nos observations de  $\delta_c$  160,8. Le proton anomérique H-1' du sucre corrèle alors en  $J^4$  avec le carbone C-2 à  $\delta_c$  123,7.

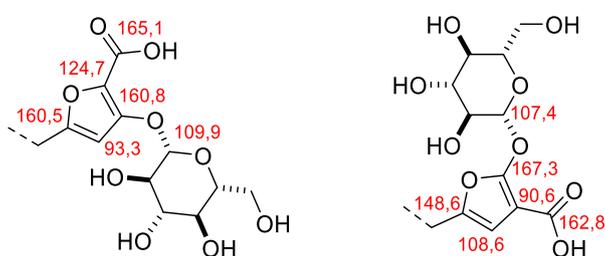
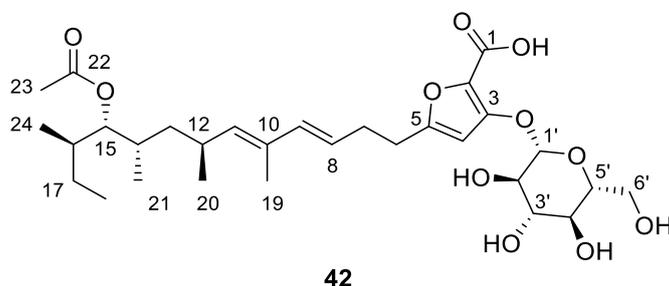


Figure IX. 15. Prédiction des déplacements carbonés pour les deux possibilités de structure envisagées.

Les corrélations NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de la molécule permettent de déterminer une configuration  $\beta$  du sucre. La configuration absolue de cette molécule contenant 9 centres asymétriques a été déterminée par le calcul des déplacements RMN- $^{13}\text{C}$  selon la méthode probabiliste DP4.<sup>398</sup> Un des stéréoisomères a été retenu avec 95% de probabilité (Annexe S81). Le dichroïsme circulaire de la molécule **41** a alors été comparé au spectre simulé de ce diastéoisomère. La superposition de ces deux spectres confirme la configuration absolue du composé **42**.

Cette molécule, nommée focicine (**42**), est ainsi formée d'un furane sur lequel sont substitués un sucre, un acide carboxylique et une chaîne insaturée ramifiée. Une telle molécule n'avait jamais été identifiée jusqu'alors dans la littérature.



<sup>398</sup> Smith S. G., Goodman J. M., Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: the DP4 probability. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, p. 12946–12959.

### 9.3. Activité biologique

#### 9.3.1. Activité antifongique des fractions

Chaque fraction de BSNB-0294C a été testée à 10 mg/mL contre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* par diffusion en gélose en regardant les halos d'inhibition formés à la surface de la gélose (Annexe S66). Les fractions ayant montré le plus d'activité sont la fraction BSNB-0294C-F5 ainsi que la fraction de rinçage de la colonne chromatographique (Figure IX. 16).



Figure IX. 16. Halo d'inhibition de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* formé par la présence de la fraction BSNB-0294C-F5 (gauche) et la fraction de rinçage THF de la colonne (droite) (50  $\mu$ L à 10 mg/mL).

Les fractions issues d'un sous-fractionnement de BSNB-0294C-F5 ont également été testées pour leur activité contre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* selon le même protocole. Trois fractions ont montré une activité antifongique, BSNB-0294C-F5-4, F5-5 et F5-6, ces deux dernières étant les plus actives (Figure IX. 17).



Figure IX. 17. Halo d'inhibition de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* formé par la présence des fractions : BSNB-0294C-F5, BSNB-0294C-F5-4, BSNB-0294C-F5-5 et BSNB-0294C-F5-6 (de gauche à droite).

#### 9.3.2. Activité antifongique des molécules

Etant donné que la xylariacéine A (**36**) est la molécule majoritaire de l'extrait de BSNB-0294, celle-ci a été testée pour son activité antifongique contre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Ce depsipeptide s'avère moins actif que la fraction F5 d'où il a été isolé, testée à la même concentration (10 mg/mL). Compte tenu de la plus faible quantité de produit obtenue pour le depsipeptides à  $m/z$  1248,8201, la xylériacéine B a été testée contre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* en déposant 50  $\mu$ L d'une solution à 5 mg/mL. À cette même concentration, la xylériacéine B (**37**) est plus active que la xylariacéine A (**36**) (Figure IX. 18).

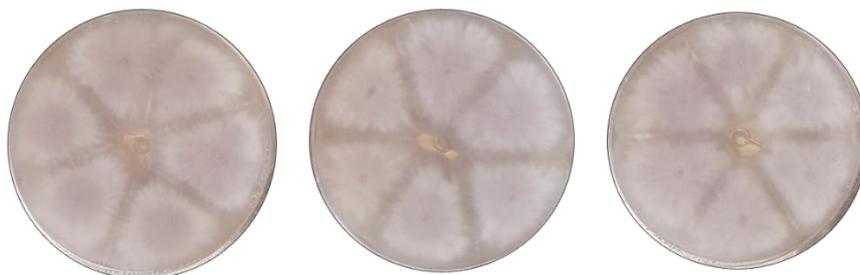


Figure IX. 18. Halo d'inhibition de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* formé par la présence des molécules : xylariacéine A (**36**) (10 mg/mL), xylariacéine A (**36**) (5 mg/mL) et xylariacéine B (**37**) (5 mg/mL).

L'activité de cette souche semble résider dans une combinaison de depsipeptides analogues à la xylariacéine A (**36**). Même si cette dernière est le depsipeptide majoritaire de l'extrait, elle ne montre pas la plus forte activité.

Le 1-linoléoyl glycérol (**38**) et l'acide linoléique (**39**) ont été testées et n'ont pas montré d'activité contre le phytopathogène.

#### 9.4. Discussion

La méthode OSMAC utilisée dans cette étude, consistant à cultiver la phytopathogène *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* avec Xylariaceae sp. BSNB-0294, n'a pas permis au premier abord d'améliorer l'activité antifongique de l'extrait de BSNB-0294. En effet, l'extrait à l'AcOEt de l'endophyte en compétition n'est pas plus actif que l'extrait de l'endophyte en culture seule.

Cependant, comme indiqué en partie 9.3.1.2, nous retrouvons une activité antifongique de l'extrait de la zone de contact et une légère activité de l'extrait du phytopathogène. Ce résultat indiquerait la diffusion des molécules actives à travers la gélose. Un suivi de la compétition par spectrométrie de masse MALDI-TOF nous permet d'avoir une visualisation de cette diffusion. Plusieurs signaux majoritaires ( $m/z$  987,68, 1145,77 et 1286,88) sont visibles et au bout du 5<sup>ème</sup> jour de compétition (Figure IX. 8), le signal à  $m/z$  1145,77 est détecté au niveau du contact avec le phytopathogène.

Les temps de croissance de ces deux champignons sont très différents : *F. oxysporum* pousse très vite et se propage sur la boîte de Pétri tandis que l'endophyte se développe peu et lentement.

Chaque jour une image de la compétition a été faite sur une boîte de Pétri différente. Afin de rendre ces résultats le plus représentatif, des suspensions des deux souches ont été préparées et déposées dans une même quantité et à un même endroit sur toutes les boîtes de Pétri. Ce protocole a eu pour but de rendre compte le mieux possible de l'évolution de cette compétition dans le temps. Néanmoins des décalages au niveau de la croissance des champignons ont pu se produire entre les boîtes utilisées pour l'image à 6 et 7 jours, et les cultures sur la boîte à 7 jours auraient pu être plus avancées. Par conséquent, il est difficile de savoir si la forte intensité observée pour les signaux à  $m/z$  1145,77 et 1286,88 à 7 jours reflète une augmentation brutale de la production de ces métabolites entre 6 et 7 jours de compétition.

L'étude chimique de Xylariaceae sp. BSNB-0294 a montré que des métabolites de haut poids moléculaire participent à l'activité inhibitrice de la pousse de *F. oxysporum*. Ces molécules sont des depsipeptides nommés xylariacéines. La xylariacéine A (**36**), correspondant au signal à  $m/z$  1286,88  $[M+Na]^+$  a été identifiée contenant 12 acides aminés. Sa configuration reste à déterminer et des essais de cristallisation n'ont pas abouti jusqu'à présent. Les molécules relatives aux signaux à  $m/z$  987,68 et 1145,77 n'ont pas été isolées car celle à  $m/z$  1145,77 n'est pas extraite dans l'acétate d'éthyle utilisé et celle à  $m/z$  987,68 n'est plus produite à trois semaines, temps de

culture à laquelle ont été réalisées les extractions. Néanmoins il semble probable que ces signaux soient également ceux de depsipeptides cycliques.

La xylariacéine A (**36**), molécule majoritaire de l'extrait, s'est révélée active contre *F. oxysporum* lors de test de diffusion par gélose d'une solution à 10 mg/mL soit 8  $\mu$ mol/mL. Cependant, elle n'est pas aussi active que la fraction testée à la même concentration ce qui laisse envisager la présence d'autres métabolites actifs.

L'étude chimique de l'extrait à l'AcOEt de Xylariaceae sp. a en effet montré la production d'analogues de xylariacéine A, dont la xylariacéine B (**37**) possédant une alanine à la place de la sérine. Cette différence serait responsable d'une activité plus forte de ce depsipeptide par rapport à la xylariacéine A (**36**). D'autres molécules entre 1100 et 1300 Da sont isolées mais en trop faible quantité pour une identification.

Cette méthode OSMAC a en revanche permis d'élucider la production de molécules qui n'étaient pas détectées sur les profils HPLC de l'extrait AcOEt des souches en culture seule. Ces molécules y étaient peut-être produites en faible quantité, en tout cas leur élucitation a permis de les cibler, les isoler et les identifier. Ainsi deux signaux à  $m/z$  324,13 ont été ciblés et sont relatifs à deux isomères : les 2,4-dibenzyl-2-carbamoyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-imidazole 3-oxide (**33**) et 2,4-dibenzyl-*N*-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1H-imidazole-2-carboxamide (**35**). L'étude chimique de la fraction d'où ils sont issus a également permis d'identifier un analogue, la 2,4-dibenzyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-imidazole-2-carboxamide (**34**), ainsi que la 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanamide (**30**), la 2-nitro-3-phénylpropanamide (**31**) et l'acide 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanoïque (**32**). Nous sommes circonspects face à la présence d'un groupement nitro sur la molécule **31** étant donné le faible déplacement  $\delta_N$  de l'azote tertiaire.

D'après leurs structures, il semblerait que les molécules **33**, **34** et **35** proviennent d'une dimérisation entre des motifs de phénylalanines, formant ainsi un noyau imidazolinone. Ce type de cyclisation entre des phénylalanines n'avait jusqu'alors jamais été décrit dans la littérature.

De la même façon, un signal détecté dans l'extrait de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* en compétition a été ciblé et a permis l'isolement et l'identification de la focicine (**42**), un métabolite nouveau présentant un noyau furane glycosylé et porteur d'une chaîne aliphatique. Une telle structure composée de tous ces éléments n'avait jamais été précédemment identifiée. Ce composé n'a pas montré d'activité cytotoxique sur MRC-5 ni d'activité antimicrobienne sur SARM et *T. rubrum*. Son activité contre l'endophyte BSNB-0294 est actuellement en cours d'évaluation.

## 9.5. Conclusion

L'étude de la souche Xylariaceae sp. BSNB-0294 a été initiée suite à la découverte d'un potentiel de défense face au phytopathogène *F. oxysporum*. Ce phytopathogène a été choisi pour mettre à jour un rôle écologique probable des souches endophytiques d'*A. sciophilum*. En effet, *F. oxysporum* est souvent parasite d'espèces de palmiers (Partie 5.1.2 p.98).

L'application d'une méthode OSMAC reposant sur la mise en compétition des deux souches lors de l'étude chimique de BSNB-0294, a été préférée afin de mieux représenter des conditions environnementales naturelles. Cette méthode a souvent fait ses preuves pour mettre à jour des métabolites produits lors d'interactions microbiennes ou face à des stress.

Il a rapidement été mis en évidence la présence de métabolites diffusant dans la gélose entre les souches lors de tests d'activité et par imagerie de la compétition. Ceux-ci ont par la suite été identifiés comme des depsipeptides cycliques, nommés xylariacéines, et deux ont été identifiés

comme étant actifs contre le phytopathogène. Nous estimons que de nombreux analogues sont produits dans des proportions différentes selon le temps de culture.

Différentes méthodes d'extractions et d'analyses (HPLC, UHPLC-MS/MS) ont été mises en place, permettant de voir une élévation de métabolites durant la compétition entre ces deux souches. Ainsi, deux métabolites de Xylariaceae sp. et un métabolite de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* ont été ciblés. L'endophyte BSNB-0294 s'est avéré produire des analogues de phénylalanines présentant des oximes ainsi que des métabolites nouveaux issus de la dimérisation de ces motifs. Un nouveau métabolite présentant un noyau furane glycosylé a été isolé de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Le fait que ces métabolites soient produits préférentiellement lors d'une compétition microbienne pourrait indiquer un potentiel rôle écologique de défense.

## Conclusion

Au cours de ce projet de doctorat, les endophytes provenant de palmiers *Astrocaryum sciophilum* ont été étudiés afin d'identifier des métabolites secondaires originaux et ayant un potentiel antimicrobien. Ce palmier est l'une des plantes modèles du projet ANR SECIL dans lequel s'insère cette thèse. En effet, du fait de la grande longévité de ses feuilles, il avait été postulé que les feuilles soumises depuis longtemps aux agressions environnementales pouvaient potentiellement abriter des endophytes plus compétitifs, ayant lutté pour s'établir de façon pérenne. Ces endophytes compétitifs peuvent potentiellement biosynthétiser des antimicrobiens.

197 souches d'endophytes ont été isolées et identifiées de six spécimens de palmiers, constituant une communauté globale. Toutefois, il s'est avéré que les micro-organismes présents sur les feuilles âgées ne montrent pas une compétitivité plus marquée que ceux présents sur des feuilles plus jeunes. En revanche, les feuilles fermées, encore non soumises à l'environnement extérieur, sont peu colonisées par des micro-organismes fongiques. Un premier élément limitant du travail sur les endophytes est la capacité de cultiver sur milieu gélosé synthétique ces micro-organismes environnementaux. Une première sélection s'établit alors avec la réelle diversité des endophytes présents dans ces feuilles. Malgré tout, des micro-organismes de genres nouveaux ont été isolés, compte tenu des séquences ITS très éloignées de genre connus. Cette constatation rejoint le fait que de nombreux micro-organismes sont encore méconnus de la littérature et représentent un domaine prometteur en chimie des substances naturelles. Une étude morphologique et génomique plus approfondie devrait être effectuée pour proposer une identification à ces souches originales.

Un extrait à l'acétate d'éthyle a été réalisé pour chacun de ces endophytes, puis testé sur les cibles sélectionnées dans le cadre du projet ANR SECIL : activité antimicrobienne et potentiel quorum quenching. Ces résultats d'activité ont déterminé deux premiers projets dans lesquels les métabolites secondaires des extraits actifs ont été étudiés.

Le premier projet s'est focalisé sur les souches du genre *Paraburkholderia* dont les extraits présentaient une activité quorum quenching. Une souche BSNB-0656 a été étudiée chimiquement et a permis l'identification d'acylhomosérines lactones (AHL) comme métabolites responsables de l'activité QQ. Cette activité pour ces molécules est déjà connue de la littérature.

Le deuxième projet concerne l'étude de la souche *Luteibacter* sp., genre bactérien jamais étudié chimiquement jusqu'alors. L'extrait de cette souche a montré une activité antibactérienne sur le pathogène humain *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. Un fractionnement bioguidé de cet extrait a conduit à l'identification de huit acides gras responsables de cette activité.

Ces deux projets se sont heurtés au problème d'isolement de métabolites actifs déjà connus, problème fréquemment retrouvé lors de l'étude de substances naturelles, même si les sources semblent originales (comme par exemple la bactérie *Luteibacter* sp.). L'analyse du profil UHPLC-MS/MS d'un extrait permet notamment une déréplication des métabolites présents et différentes familles chimiques peuvent être identifiées par une visualisation de ces données par l'établissement de réseaux moléculaires. Ainsi, des extraits issus de souches fongiques ont montré également une activité antibactérienne sur SARM mais ont été écartés au vu de la probabilité d'y isoler des métabolites connus.

Compte tenu du petit nombre d'extraits actifs contre ces premières cibles biologiques, nous avons choisis de diversifier nos projets afin d'isoler des métabolites secondaires originaux de notre collection d'endophytes.

La différence d'activité cytotoxique retrouvée entre les extraits de souches du genre fongique *Colletotrichum* nous a intrigué et a constitué un troisième cas d'étude permettant l'application de la méthodologie des réseaux moléculaires. L'extrait BSNB-0583 a ainsi été sélectionné pour sa potentielle originalité chimique et une nouvelle série de métabolites a été identifiée avec l'isolement de quatre molécules nommées colletamide A-D. Le(s) métabolite(s) responsables de l'activité cytotoxique observée de cet extrait n'ont pour autant pas été retrouvés.

Enfin, la souche de la famille Xylariaceae BSNB-0294 a été étudiée au cours d'un quatrième projet afin d'identifier les métabolites responsables de l'activité inhibitrice de croissance du champignon phytopathogène *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. En effet, BSNB-0294 semble avoir un rôle de protection contre des agressions fongiques. Cette activité est due à la présence de depsipeptides dont deux ont pu être identifiés : les xylériacéines A et B. Des métabolites produits spécifiquement lors de la compétition entre BSNB-0294 et le phytopathogène ont également été ciblés pour être isolés : ainsi trois nouveaux analogues comportant un noyau 3-imidazolinone ont été identifiés de BSNB-0294 et un nouveau métabolite nommé focicine comportant un furane glycosylé a été caractérisé de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Etant donné que la production de ces molécules est élicitée lors de la co-culture, il serait intéressant d'identifier leurs rôles au sein des deux champignons : communication, attaque, protection ? Des études complémentaires pourront être menées.

Ces quatre projets ont conduit à quatre publications dans des revues internationales. Une première a été acceptée dans la revue IJMS, deux sont en soumissions et la dernière en cours de préparation.

Au cours de ces quatre projets, nous avons pu constater que de nombreux facteurs impactent la croissance des micro-organismes et ainsi leur production en métabolites secondaires et l'activité biologique de leurs extraits qui peut en découler. Par exemple, la température de culture de deux bactéries à Gram négatif joue directement un rôle sur leur production en acylhomosérine lactones fonctionnalisées oxo/hydroxy ou hydrolysées. Nous avons remarqué au cours de ce projet et des projets ultérieurs de l'équipe, que les bactéries sont soumises à de nombreuses variabilités métaboliques, malgré des conditions de laboratoire fixes (milieu, température et temps de culture). Ainsi, l'activité biologique d'extrait de souches bactériennes est souvent « perdue ». L'étude des métabolites actifs de *Paraburkholderia* sp. BSNB-0656 et de *Luteibacter* sp. BSNB-0721 a principalement été menée par fractionnement bioguidé, conduisant à l'isolement de métabolites déjà connus : des acides gras et des AHLs. En revanche, lorsque la chimie des extraits d'endophyte a été analysée en amont du travail d'isolement, par une combinaison d'outils analytiques (comparaison de profils, réseaux moléculaires, imagerie par spectrométrie de masse), il a été possible de cibler avec précision des métabolites structurellement originaux. De plus, la mise en place de méthodes OSMAC comme la co-culture entre deux champignons réalisée au cours du quatrième projet, ajoute de l'information sur la production métabolique en condition « réelles » et permet d'isoler des métabolites jamais identifiés jusqu'alors. Malgré cela, les métabolites ciblés ne sont pas toujours isolés à cause de leur faible quantité dans les extraits, leur sensibilité aux méthodes de séparation ainsi que leur variabilité de production d'une culture à une autre.

Ces problèmes techniques énoncés montrent la difficulté de travailler sur des ressources naturelles issus d'organismes vivants, ainsi que l'obligation de diversifier les cibles biologiques et les méthodes d'analyses afin d'appréhender au mieux la complexité d'un extrait avant son étude chimique. Pour autant, les micro-organismes montrent leur potentiel en terme de diversité chimique comme l'a prouvé cette étude globale d'une communauté d'endophyte avec l'identification de 42 métabolites secondaires, dont dix sont originaux.

# Partie expérimentale

---

## X. Partie expérimentale

### 10.1. Matériel biologique

#### 10.1.1. Récolte, isolement et conservation des endophytes

Sur chaque spécimen d'*Astrocaryum sciophilum*, une foliole de trois feuilles d'âges différents a été récoltée : celle d'une feuille fermée, d'une feuille jeune (< 2 ans d'âge) et d'une feuille âgée (> 2 ans d'âge).

L'isolement des micro-organismes endophytes de ces folioles a été effectué suivant la procédure de Weber *et al.* partiellement modifiée.<sup>224</sup> Le matériel végétal est lavé avec de l'eau stérile puis stérilisé en surface par une immersion séquentielle dans de l'éthanol à 70% (3 min), puis dans une solution d'hypochlorite de sodium à 5% (5 min). Enfin, le matériel végétal est rincé à l'eau stérilisée. Ce matériel est découpé en morceaux de 0,5 cm<sup>2</sup> en dehors des nervures, puis ces morceaux sont déposés sur des boîtes de Pétri gélosés Potato Dextrose Agar (PDA, Difco®). Chaque hyphes ou bactérie émergente est prélevé et repiqué sur des boîtes de Pétri différentes afin d'isoler ces endophytes au fur et à mesure de leur apparition sur la gélose.

Chaque souche isolée a été déposée à l'ICSN, référencée au sein de la base de données BSNB sur la plateforme « Souchothèque » et cryo-conservée à -80°C en trois exemplaires dans un mélange glycérol/eau (1:1, v/v).

#### 10.1.2. Culture

La culture des endophytes a été réalisée sur milieu solide, en boîte de Pétri de 10 cm contenant des milieux gélosés PDA (Difco®). Ces milieux sont préparés par dissolution de la poudre dans de l'eau : agar 17 g/L et Potato Dextrose Broth 26,5 g/L. Le mélange est autoclavé pour stérilisation et coulé dans des boîtes de Pétri. Pour l'obtention d'un extrait brut d'un micro-organisme, entre 10 et 15 boîtes de Pétri sont ensemencées et mises en culture à 28°C pendant une semaine pour une bactérie et deux semaines pour un champignon.

#### 10.1.3. Identification génétique

Pour chaque endophyte, l'extraction de l'ADN, son amplification par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) et son séquençage ont été réalisés par Laurent Intertaglia au Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie Microbiennes (LBBM) à Banyuls/Mer.

Afin d'identifier ces souches microbiennes, les régions ribosomales ITS pour les champignons et 16S pour les bactéries ont été ciblées à l'aide d'amorces spécifiques.

Pour amplifier l'ITS, les amorces universelles ITS1F et ITS4R ont été utilisées.<sup>399</sup> Le séquençage a été effectué avec l'ITS4.

ITS1 (F) : AGGAGAAGTCGTAACAAGGT

ITS4 (R) : TCCTCCGCTTATTGATATGC

Pour amplifier les régions 16S, les amorces universelles 27Fmod et 1492Rmod ont été utilisées. Le séquençage a été effectué avec l'amorce inter 907R.<sup>400</sup>

27Fmod : AGRGTTTGATCMTGGCTCAG

1492Rmod : TACGGYTACCTTGTTAYGACTT

907R : CCGTCAATTCCTTTGAGTTT

<sup>399</sup> White T., Bruns T., *et al.*, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 1990, pp. 315–322.

<sup>400</sup> Fagervold S. K., Intertaglia L., *et al.*, *Saonia flava* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from coastal seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017, 67, p. 3246–3250.

Les séquences obtenues sont dans un premier temps comparées avec celles disponibles dans les banques de données par l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information). Cette comparaison permet d'obtenir un pourcentage de similarité entre les séquences isolées et les séquences référencées les plus proches.

Dans un second temps, des arbres phylogénétiques ont été réalisés sur la base du résultat du BLAST. Les séquences sont alignées avec l'outil en ligne MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). L'analyse résultante est téléchargée sous format Phylip4. Tous les arbres phylogénétiques ont été construits par une méthode de maximum de vraisemblance disponible sur le site CIPRES (<https://www.phylo.org>): la méthode RaxML-HPC2 sur XSEDE (8.2.10). La solidité d'une branche est évaluée par la valeur du bootstrap basée sur 1000 répliqués. Les arbres phylogénétiques ont été visualisés grâce au logiciel Figtree version 1.4.4.

Les séquences ITS ou 16S de chaque souche ont été déposées sur la base de données GenBank avec un numéro d'accèsion (Annexe S1).

#### 10.1.4. Extraits protéiques

L'extrait protéique de chaque endophyte est réalisé à partir de matériel biologique, suivant la procédure d'extraction décrite par Bruker Biotyper.

Environ 10 mg de matériel biologique (un morceau de champignon ou 10  $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne) à analyser sont suspendus dans un tube eppendorf contenant 300  $\mu\text{L}$  d'eau Milli-Q. 900  $\mu\text{L}$  d'éthanol (EtOH) y sont ajoutés. Après centrifugation à 13 000 rpm pendant 2 minutes, le surnageant est prélevé et jeté. 40  $\mu\text{L}$  d'acide formique (AF) à 70% sont alors ajoutés au culot de cellules et le mélange est vortexé. Enfin, 40  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile (ACN) sont ajoutés (Figure X. 1). Après une nouvelle centrifugation à 13 000 rpm pendant 2 minutes, le surnageant est directement analysé ou alors stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour une analyse dans les 10 jours.

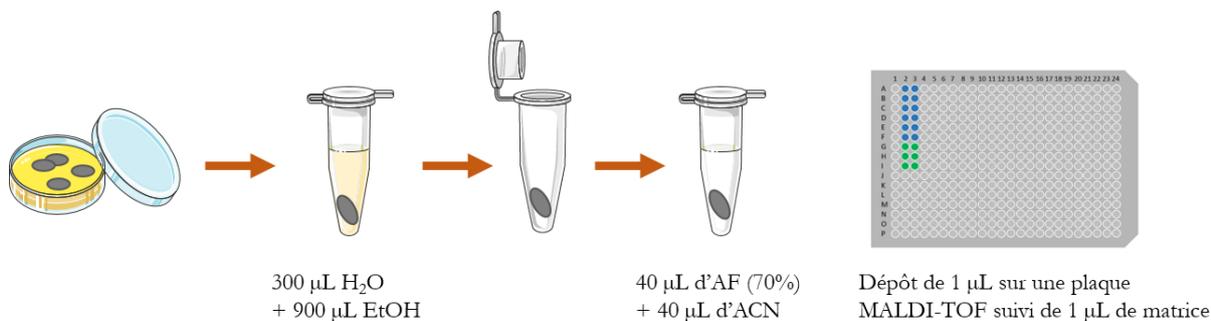


Figure X. 1. Préparation et dépôt sur plaque MALDI-TOF d'un extrait protéique d'endophyte.

#### 10.1.5. Extraits lipidiques

Afin de réaliser un extrait lipidique, le micro-organisme est repiqué dans un tube en gélose incliné de PDA. À l'issue d'une culture d'une semaine, 6 mL d'un mélange méthyl tert-butyl éther (MTBE) et méthanol (MeOH) (2:1, v/v) sont ajoutés. Après macération pendant 24h, la phase organique supérieure dans le tube est récupérée et séchée (Figure X. 2).

L'extrait lipidique est solubilisé dans 30  $\mu\text{L}$  d'un mélange chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ )/méthanol (MeOH) (2:1, v/v) avant d'être mélangé à la matrice pour obtenir une empreinte en spectrométrie de masse par MALDI-TOF.

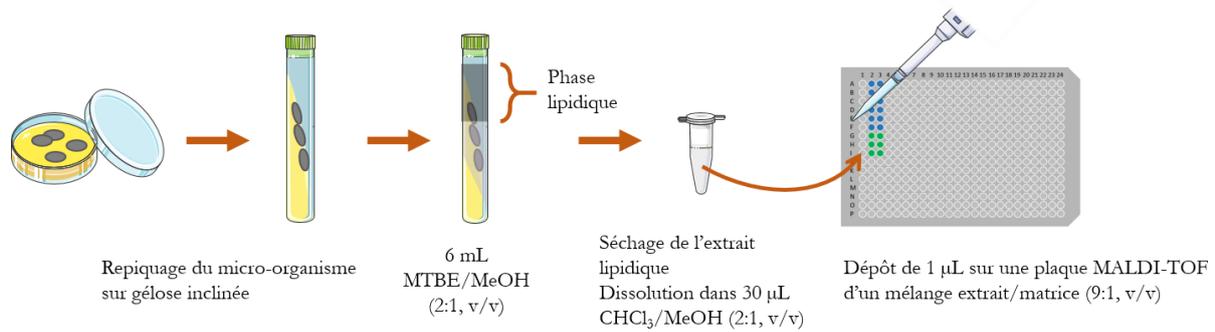


Figure X. 2. Préparation et dépôt sur plaque MALDI-TOF d'un extrait lipidique d'endophyte

### 10.1.6. Culture à grande échelle des endophytes

La culture « à grande échelle » permet d'obtenir en plus grande quantité l'extrait brut d'un endophyte. Pour cela, le micro-organisme est cultivé sur plusieurs centaines de boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre. La température d'incubation et le temps de culture reste identique : 28°C sur une semaine pour les bactéries et deux semaines pour les champignons.

### 10.1.7. Essais antimicrobiens sur pathogènes humains

Les activités antimicrobiennes contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM, ATCC33591) et un isolat clinique de *Trichophyton rubrum* (SNB-CN1) ont été évaluées par mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) selon le protocole suivant.

#### 10.1.7.1. Conservation des souches

Les pathogènes sont conservés sur gélose inclinée au laboratoire dans une étuve à 37°C. *S. aureus* résistant à la méticilline est cultivé sur milieu Mueller Hinton (MH, Difco®) tandis que *T. rubrum* est cultivé sur un milieu Sabouraud (Difco®). Les souches sont régulièrement repiquées pour être maintenus sur un milieu nutritif frais.

#### 10.1.7.2. Préparation des échantillons à tester

Les échantillons à tester (extraits bruts, fractions ou molécules pures) sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) afin de réaliser une solution stock. De manière générale, les extraits bruts et fractions sont préparés à la concentration de 10,24 mg/mL et les molécules à la concentration de 5,12 mg/mL.

Ces concentrations stock ont été choisies afin d'éviter un effet toxique du DMSO sur les cellules microbiennes lors des essais biologiques : le volume de DMSO ne doit pas excéder 5% du volume totale, soit 10 µL dans un volume de 200 µL (Partie 10.1.7.6 p.185).

#### 10.1.7.3. Préparation des témoins positifs

La vancomycine est utilisée comme témoin positif des tests d'activité contre SARM et l'antifongique fluconazole comme témoin positif des tests contre *T. rubrum*. Des solutions stock de vancomycine et de fluconazole sont respectivement préparées à 0,32 mg/mL et à 1,28 mg/mL dans du DMSO.

#### 10.1.7.4. Préparation des milieux

Le milieu utilisé pour le test antimicrobien est un milieu MH liquide pour SARM et un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) pour *T. rubrum*.

Le milieu MH se prépare par dissolution d'une préparation MH (Difco®) dans de l'eau milli-Q à 21 g/L, puis stérilisé par autoclavage. Le milieu RPMI se prépare par dissolution d'une préparation RPMI (Pan Biotech®) dans de l'eau milli-Q à 10,42 g/L puis tamponnage par une solution de MOPS (acide 3-(*N*-morpholino)-propane sulfonique à 0,165 mol/L) pour atteindre un

pH neutre. Le milieu est ensuite stérilisé par passage sur une membrane polyéthersulfone (0,22 µm).

#### 10.1.7.5. Préparation des solutions de pathogènes

Une solution mère de pathogène est réalisée pour chaque test par mise en suspension de colonie bactérienne pour SARM et de spores de champignons pour *T. rubrum* dans de l'eau milli-Q stérile.

Afin de contrôler la concentration de la suspension de SARM, la densité optique (DO) est mesurée à 600 nm et doit atteindre une DO entre 0,8 et 0,1 (correspondant à une concentration entre 1 et  $2 \times 10^8$  UFC/mL, soit le nombre de colonies). Cette solution est alors diluée au 100<sup>ème</sup> dans du milieu de culture MH pour former la suspension finale.

La suspension de *T. rubrum* est ajustée pour atteindre la densité optique correspondante à 0,5 McFarland. Cette suspension est alors dénombrée par comptage sur cellules de Malassez afin de vérifier la concentration entre 3,7 et  $5 \times 10^6$  spores/mL. La suspension est alors diluée au 10<sup>ème</sup> dans du milieu de culture RPMI pour former la suspension finale.

#### 10.1.7.6. Préparation du plan de plaque

Les essais sont réalisés selon les protocoles de référence établis par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Testing) pour les tests de susceptibilité antibactérienne et antifongique (CLSI guidelines M7-A8 et M38-A2).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque échantillon sur un pathogène est mesurée par dilution successive de la solution stock en plaque multi-puit. Cela permet d'évaluer la sensibilité du pathogène face à un mélange possédant une activité antimicrobienne et de déterminer la plus petite concentration permettant d'inhiber sa croissance.

Une gamme de six concentrations est ainsi réalisée pour chaque échantillon. Cette gamme de concentration est obtenue sur plaque 96 puits, par dilution en cascade : le premier puit contient 190 µL de milieu mélangés à 10 µL de la solution stock à tester puis les 5 puits suivants sont réalisés par dilution de 100 µL du puit précédent dans 100 µL de milieu. Enfin 100 µL de la suspension de pathogène sont ajoutés à chaque puit pour un volume total de 200 µL par puit.

La gamme de concentration testée d'une solution stock à 10,24 mg/mL s'étend ainsi de 256 à 8 µg/mL.

Sur la plaque 96 puits, une ligne sert de témoin de pousse du pathogène (chaque puit contenant 100 µL de milieu et 100 µL de la suspension de pathogène) et une ligne sert de témoin de stérilité du milieu (Figure X. 3).

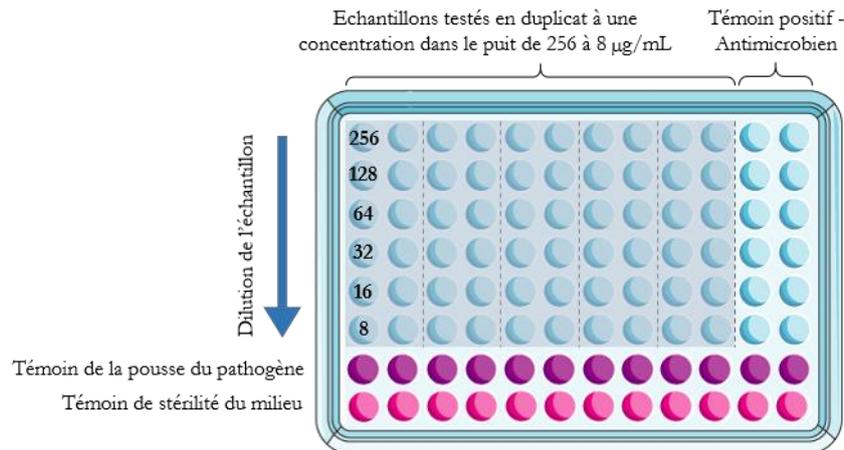


Figure X. 3. Plan d'une plaque multi-puits utilisé pour l'évaluation de la CMI de nos extraits AcOEt par micro-dilution.

Chaque échantillon est testé en duplicat. La CMI du témoin positif (vancomycine ou fluconazole) est également mesurée à chaque test et doit atteindre 1 µg/mL pour la vancomycine et 4 µg/mL pour le fluconazole (4<sup>ème</sup> puit de la gamme de concentration).

La lecture des CMIs se fait après 24h d'incubation à 37°C pour SARM et 5 jours pour *T. rubrum*.

### 10.1.8. Essais Quorum Quenching

Ces essais ont été réalisés par les laboratoires LBBM à Banyuls/Mer et par l'Unité de Microbiologie à l'Université de Genève.

#### 10.1.8.1. *Chromobacterium violaceum* CV026

La bactérie CV026 est ensemencée sur boîte de Pétri contenant du milieu de culture gélosé LB (bouillon lysogène) contenant 0,2 µM de C<sub>6</sub>-HSL. Les extraits à tester sont dissous à 5 mg/mL dans un mélange DMSO/milieu LB (50:50, v/v) puis 8 µL sont déposés sur des disques en papier à la surface de la boîte de Pétri. Après 48h d'incubation à 25°C, la présence d'un halo d'inhibition autour des disques est relevée et son diamètre mesuré. Le témoin positif utilisé est le cinnamaldéhyde à 128 nM.

#### 10.1.8.2. *Pseudomonas putida* F117 et *Escherichia coli* MT102

Dans un puit de plaque 96 puits, 100 µL de milieu LB contenant l'autoinducteur C<sub>6</sub>-HSL (pour la souche MT102) ou C<sub>10</sub>-HSL (pour la souche F117) à la concentration de 0,4 µM sont ajoutés à 95 µL d'une solution bactérienne et à 5µL de l'extrait à tester à 10 mg/mL dans le DMSO (représentant une concentration de 250 µg/mL dans le puit). La plaque est mise à incuber à 25°C et deux mesures de fluorescence sont réalisées après 6h et 24h. Le témoin positif utilisé est le cinnamaldéhyde à la concentration de 1,6 nM. Il est estimé qu'un extrait présente une activité QQ sur ces biosenseurs lorsque le pourcentage de fluorescence est mesuré en dessous de 60%.

Afin d'évaluer la toxicité des extraits, un test de viabilité est effectué à 6h d'incubation (réactif BacTiter-Glo™, Promega : dosage de l'ATP). Il est estimé qu'un extrait présente une possible activité toxique lorsque le pourcentage de bioluminescence est inférieur à 60%.

#### 10.1.8.3. *Staphylococcus aureus*

La souche *S. aureus* PR01 est utilisée pour ces expériences. 190 µL d'un milieu MH additionnés d'uracile (10 µg/mL), d'érythromycine (10 µg/mL), d'acide 5-fluoroootique (5-FOA à 200 µg/mL) et de l'extrait à tester (128 µg/mL) sont placés dans les puits d'une plaque 96-puits. 10 µL d'une solution bactérienne de PR01 contenant le vecteur sont ajoutés après normalisation à une DO mesurée à 1 à 600 nm. La plaque est mise à incuber à 37°C et une mesure de DO est faite après

15h d'incubation par un lecteur de plaque Synergy HT (BioTek®). Le témoin positif utilisé est le surnageant de *Staphylococcus caprae*.

#### 10.1.9. Co-culture avec le phytopathogène *F. oxysporum*

Afin de cribler leur activité antifongique contre *F. oxysporum*, une compétition de chaque endophyte avec les deux *formae speciales* disponibles de *F. oxysporum* (f.sp. *ciceris* et f.sp. *albedinis*) ont été effectuée sur milieu solide PDA.

Dans le cas d'un endophyte fongique, ce dernier est repiqué sur la boîte de Pétri en alternance avec le phytopathogène, et dans le cas d'un endophyte bactérien, la bactérie est ensemencée autour des points de repiquage du phytopathogène (Figure X. 4). Les co-cultures sont observées durant 5 semaines à 28°C afin d'observer un potentiel effet antifongique.

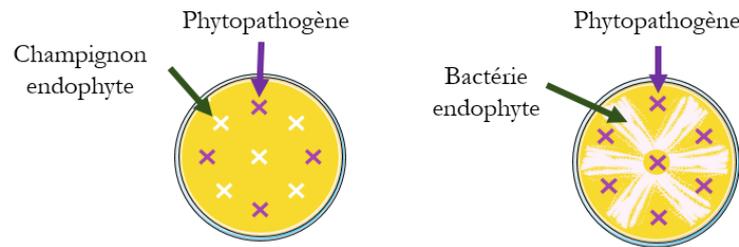


Figure X. 4. Schéma de la co-culture permettant le criblage de l'activité antifongique des bactéries et champignons endophytes contre le phytopathogène *F. oxysporum*.

Pour la réalisation d'extrait brut lors de co-culture, l'endophyte et le phytopathogène sont repiqués de chaque côté de la boîte de Pétri (Figure X. 5).

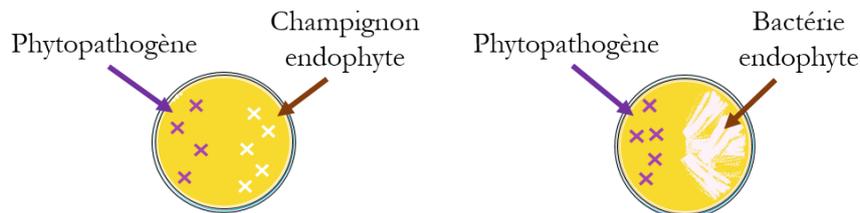


Figure X. 5. Schémas des co-cultures entre le phytopathogène *F. oxysporum* est un champignon ou une bactérie endophyte.

Afin de réaliser des images de la compétition entre un endophyte et *F. oxysporum* (Partie 10.4.1.1 p.189), des solutions de chaque champignon sont préparées dans de l'eau Milli-Q stérile. Afin d'obtenir une croissance identique des souches sur une quinzaine boîte de Pétri, la même quantité de solution est déposée aux mêmes endroits de la boîte. Chaque jour, une image de la compétition est obtenue et un suivi de cette compétition peut être effectué.

#### 10.1.10. Évaluation du potentiel antifongique sur *F. oxysporum* des COVs produits par les endophytes

Afin d'évaluer la production de Composés Organiques Volatils (COVs) possédant des activités antimicrobiennes, l'endophyte et *F. oxysporum* sont repiqués séparément sur boîte de Pétri PDA. Les boîtes sans couvercle sont fixées l'une face à l'autre, afin que les souches partagent

uniquement l'air entre les deux boîtes (Figure X. 6). La culture est laissée plusieurs semaines à 28°C.

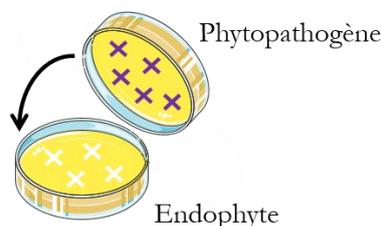


Figure X. 6. Schéma du montage des boîtes de Pétri pour mesurer l'activité antifongique des COVs. L'endophyte (blanc) est repiqué sur une boîte et le phytopathogène (violet) sur une autre.

#### 10.1.11. Essais antifongique sur *F. oxysporum* par diffusion en gélose

Les extraits, fractions et molécules sont testés contre *F. oxysporum* à 10 mg/mL ou 5 mg/mL dans du DMSO. Un puit est creusé dans la gélose au milieu d'une boîte de Pétri. 50 µL de l'échantillon à tester sont placés dans ce puit et le champignon *F. oxysporum* est repiqué autour. Le clotrinazole à 10 mg/mL est utilisé comme témoin positif de ce test. Les boîtes de Pétri sont placées à 28°C durant trois semaines afin d'observer une potentielle activité antifongique.

#### 10.1.12. Evaluation de l'activité cytotoxique

L'activité cytotoxique des extraits bruts, fractions et molécules a été évaluée sur la lignée cellulaire MRC-5 (cellules saines de poumons fœtal humain) à l'aide du test CellTiter Glo (Promega®) qui permet de mesurer par luminescence le nombre de cellules vivantes. Les extraits et fractions sont testés à la concentration de 10 µg/mL en triplicat. Le contrôle positif est effectué par la mesure de l'activité du docetaxel (Taxotère) ou de la doxorubicine.

### 10.2. Solvants

Différents solvants organiques ont été utilisés suivant les expériences. L'acétate d'éthyle utilisée pour les extractions est d'une pureté de 99% (Carlo Erba®). Des solvants de qualité HPLC (Carlo Erba®) sont utilisés pour les appareils de chromatographie. L'acide formique provient de VWR Chemicals® et est d'une pureté de 99-100 %. Si les systèmes d'analyses sont couplés à des spectromètres de masse HR-MS (High Resolution Mass Spectrometry), des solvants de qualité LC-MS sont utilisés. Pour les analyses RMN, des ampoules de solvants deutérés (Eurisotop®) sont utilisées. L'acide chlorhydrique concentré (HCl, 37%, w/w) provient de Carlo Erba®. L'eau milli-Q est obtenue par filtration sur un appareil Millipore Synergy®.

### 10.3. Extraction des endophytes

À l'issue d'une culture, les boîtes de Pétri sont découpées (contenant la gélose ainsi que le micro-organisme cultivé) et rassemblées dans un erlenmeyer où est ajouté le solvant d'extraction. L'acétate d'éthyle (AcOEt) est choisi comme solvant d'extraction de par sa large gamme de polarité. La macération est effectuée pendant 24h en plaçant l'erlenmeyer sur une table d'agitation. A l'issue de cette macération, le matériel biologique est enlevé du macérât par filtration. Cette phase organique est lavée trois fois à l'eau Milli-Q à l'aide d'une ampoule à décanter puis concentrée par évaporation du solvant pour aboutir à un extrait brut.

L'obtention d'un extrait brut suite à une culture à grande échelle se fait de manière similaire, en mettant à macérer le contenu des boîtes de Pétri dans des cuves en inox rempli de plusieurs litres d'AcOEt. En revanche, afin d'épuiser au maximum le matériel biologique en métabolites, trois

extractions successives sont réalisées à 24, 48 et 72h. De la même façon, le macérât est lavé à l'eau Milli-Q puis séché.

Les extraits de micro-organismes cultivés en co-culture sont réalisés en ne mettant à macérer que les parties où se trouve le micro-organisme d'intérêt. Par exemple, pour les extraits de la compétition entre BSNB-0294 et *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*, la boîte de Pétri est divisée en deux afin d'obtenir un extrait relatif à chaque champignon.

Pour réaliser des extraits de ces endophytes avec d'autres solvants d'extraction (acétonitrile, dichlorométhane et cyclohexane), les boîtes de Pétri sont découpées et mises à macérer pendant 24h et le macérât n'est pas lavé à l'eau Milli-Q. Des extractions au butanol et au méthanol sont obtenues par macération successive de 24 heures chacune après une première extraction de l'endophyte à l'acétate d'éthyle.

## 10.4. Appareillage

### 10.4.1. Système d'analyse

#### 10.4.1.1. MALDI-TOF MS

Le spectromètre de masse MALDI-TOF MS utilisé est un UltrafleXtreme (Bruker® Daltonics, Brême). Les données sont traitées par le logiciel FlexAnalysis et FleXImaging 4.1 (Bruker®, Daltonics, Brême).

##### 10.4.1.1.1. Analyse des empreintes protéiques

L'acquisition des empreintes protéiques est réalisée en mode d'ionisation positif et en mode linéaire pour l'analyseur à temps de vol. L'intensité du laser est fixée de manière à obtenir un spectre avec le meilleur rapport signal/bruit sans élargissement des pics. Le spectromètre de masse est calibré par étalonnage externe avec un mélange de protéines (insuline, cytochrome C, myoglobine et ubiquitine I). 1 µL de l'extrait protéique est déposé en duplicat sur la plaque MALDI-TOF, suivi par 1 µL de matrice acide α-cyano-4-hydroxycinamique (CHCA) préparée à 50 mg/mL dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) acidifié avec 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA).

##### 10.4.1.1.2. Analyse des empreintes lipidiques

L'acquisition des empreintes protéiques est réalisée en modes d'ionisation positif et négatif et en mode reflectron pour l'analyseur à temps de vol. L'intensité du laser est fixée de manière à obtenir un spectre avec le meilleur rapport signal/bruit sans élargissement des pics. Le spectromètre de masse est calibré par étalonnage externe avec un mélange ProMix3 et 4 et NaI. Les extraits lipidiques sont solubilisés dans un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:1, v/v) puis 1 µL de l'extrait est mélangé à 9 µL de matrice : DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) à 20 mg/mL dans du THF en mode positif et 9-AA (9-aminoacridine) à 10 mg/mL dans du MeOH en mode négatif. Une goutte de ce mélange est posée en duplicat sur la plaque MALDI-TOF pour l'analyse.

##### 10.4.1.1.3. Imagerie

L'imagerie MALDI-TOF des co-cultures se fait par empreinte sur une lame de verre ITO (Indium-tin oxide). La lame est déposée sur la boîte de Pétri puis pressée afin de permettre une empreinte de l'échantillon. Elle est ensuite séchée 15 min dans un dessiccateur. Le dépôt de matrice (CHCA à 10 mg/mL dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) acidifié avec 0,1% de TFA) se fait par pulvérisation avec un TM-Sprayer (HTX Imaging®) suivant un débit d'éthanol de 0,24 mL/min. Cette pulvérisation se fait sous 75°C à une pression d'azote de 10 psi.

La lame est ensuite analysée sur une gamme de *m/z* entre 140 et 1700. Le diamètre du laser est fixé à 70 µm (Large) et l'intensité entre 5 et 10%. L'image se fait avec une résolution de 90 µm. Un mélange de bradykinine, angiotensine et neurotensine (PepMix5) est utilisé comme calibrant pour un étalonnage externe.

#### 10.4.1.2. Chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC)

Les profils analytiques en UHPLC ont été réalisés sur une chaîne Shimadzu® reliée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) SEDEX LT90 (SEDERE®) et un détecteur UV SPD-M30A (Shimadzu®). La colonne utilisée est une colonne Phenomenex® Kinetex C<sub>18</sub> (1,7 µm ; 100A ; 150 x 2,1 mm). La phase mobile est un gradient d'élution entre l'eau et l'acétonitrile additionné d'acide formique à 0,1%. Un gradient d'élution à un débit de 0,6 mL/min est utilisé pour analyser les extraits bruts avec les proportions suivantes : (95/5, v:v) pendant 1 min, puis de (95/5, v:v) à (0/100, v:v) en 7 min et (0/100, v:v) pendant 5 min. Les échantillons sont solubilisés dans du méthanol (MeOH) à la concentration de 1 mg/mL et filtrés avec des pores de 0,2 µm avant injection.

#### 10.4.1.3. UHPLC-MS/MS

##### 10.4.1.3.1. Spectromètre de masse quadripôle-Orbitrap Q-Exactive™

Les analyses UHPLC-MS/MS réalisées à l'Université de Genève au sein du département de phytochimie et de substances naturelles ont été faites sur une chaîne UHPLC Acquity reliée à un spectromètre de masse quadripôle-Orbitrap Q-Exactive™ Plus (Thermo Scientific®) avec une sonde d'ionisation HESI-II (ThermoFisher®). Avant l'analyse, chaque extrait est filtré au travers d'une cartouche SPE (Solid Phase Extraction) en utilisant l'appareil Discovery® SPE en plaque 96 puits. Les extraits filtrés sont suspendus à une concentration de 4 mg/mL dans du méthanol pour l'analyse Orbitrap et le volume d'injection est de 1 µL. La détection se fait par un détecteur UV Acquity entre 200 et 500 nm. La colonne utilisée est une colonne Waters® BEH C<sub>18</sub> (1,7 µm ; 50 x 2,1 mm) à un débit de 0,6 mL/min. La phase mobile est un gradient d'élution entre l'eau et l'acétonitrile additionné d'acide formique à 0,1%. Le gradient linéaire se fait par une augmentation de la proportion en acétonitrile de 5 à 100% en 7 min, suivi d'un isocratique 100% d'une minute. Les paramètres du spectromètre de masse sont les suivants : source de tension, 3,5 kV ; débit de gaz (N<sub>2</sub>) de la gaine, 55 unités; pression gaz auxiliaire, 15 unités; température du capillaire, 275°C. Les traitements MS/MS sont réalisés sur les quatre ions les plus intenses détectés (Top3 experiment). Les analyses sont conduites en mode data-dependent MS/MS. Les paramètres de résolution sont les suivants : 35 000 en FullMS et 17 500 en MS/MS avec un maximum de temps d'injection de 50 ms. La largeur de la fenêtre de sélection du précurseur en mode MS/MS est de 1, et l'énergie de collision normalisée est fixée à 35 unités arbitraires avec une exclusion dynamique de 2 secondes. L'ion diisooctyl phthalate ( $m/z$  391,28429 [M+H]<sup>+</sup> C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>) est utilisé comme calibration interne de masse.

Les analyses réalisées à Banyuls/Mer (Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes) sont également obtenues sur un système Thermo UHPLC-HRMS muni d'un spectromètre de masse quadripôle-Orbitrap Q-Exactive™ Plus (Thermo Scientific®). La colonne utilisée est une colonne Phenomenex® Luna Omega Polar C<sub>18</sub> (1,6 µm ; 150 x 2,1 mm) à un débit de 0,4 mL/min à la température de 42°C. La phase mobile est un gradient d'élution entre l'eau et l'acétonitrile additionné d'acide formique à 0,1%. Le gradient linéaire se fait par une augmentation de la proportion en acétonitrile de 5 à 100% en 12 min, suivi d'un isocratique 100% de 5 minutes. L'analyse des extraits et des standards (injection de 5 µL) est faite en source electrospray en mode positif entre  $m/z$  133,4 et 2000 Da (mode centroïde). La préparation des échantillons et des concentrations est disponible en partie 10.4.2. Les paramètres du spectromètre de masse sont les suivants : source de tension, 3,0 kV ; débit de gaz (N<sub>2</sub>) de la gaine, 75 unités; pression gaz auxiliaire: 20 unités arbitraires; température du capillaire, 350°C. Les analyses ont été conduites en mode FullMS data-dependent MS/MS. Les paramètres en FullMS sont les suivants : résolution fixée à 70 000 et cible AGC à 3x10<sup>6</sup>. Les paramètres en MS/MS sont les suivants : résolution fixée à 17 500, cible AGC à 1x10<sup>5</sup>, largeur de la fenêtre de sélection du précurseur 0,4 et énergie de collision normalisée à 30 unités arbitraires avec une exclusion

dynamique de 10 secondes. Le bis(acétonitrile) copper(I) ( $m/z$  144,98215  $[M+H]^+$   $Cu(CH_3CN)_2^+$ ) est utilisé comme calibration interne de masse.

#### 10.4.1.3.2. Spectromètre de masse quadripôle-TOF 6540

Les analyses UHPLC-MS/MS réalisées au laboratoire ont été effectuées sur un système Dionex Ultimate 3000 RSLC couplé à un spectromètre de masse Agilent 6540 hybride quadripôle à temps de vol (Agilent®) avec une sonde d'ionisation ESI opérant en mode positif. La colonne utilisée est une colonne ThermoScientific® Accucore C<sub>18</sub> (2,6 µm ; 100 x 2,1 mm) à un débit de 0,35 mL/min à la température de 30°C. Le volume d'injection est de 5 µL. La phase mobile est un gradient d'élution entre l'eau et l'acétonitrile additionnés d'acide formique à 0,1%. Le gradient linéaire se fait par une augmentation de la proportion en acétonitrile de 20 à 100% en 20 min, suivi d'un isocratique 100%. Les paramètres du spectromètre de masse sont les suivants : source de tension, 3,5 kV ; débit de gaz (N<sub>2</sub>) de la gaine, 7 L.min<sup>-1</sup>; pression gaz auxiliaire, 30 psi; température du capillaire, 325°C ; débit du gaz de séchage, 10 L.min<sup>-1</sup>; température du gaz de séchage, 350°C ; tension du séparateur, 45 V ; tension du fragmenteur, 150 V et tension du cône, 500V. Les scans MS sont réalisés en mode full-scan entre  $m/z$  100 et 1000 (durée de scan 0,1 s) avec une résolution de 20 000 à  $m/z$  922. Les traitements MS/MS sont réalisés sur les cinq ions les plus intenses détectés dans le spectre MS, au-dessus du seuil de 3000. L'épaisseur de la fenêtre d'isolement de la MS/MS est de 1,3 unités arbitraires, et l'énergie de collision normalisée est fixée à 35 eV. La solution de calibration contient deux références internes : la purine ( $m/z$  121,0509 C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>) et HP-921 ( $m/z$  922,0098 C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>F<sub>4</sub>).

#### 10.4.2. Dosage des acylhomosérine lactones dans les extraits

Les extraits des souches BSNB-0661 et BSNB-0670 sont obtenus à partir d'une culture des souches sur 10 boîtes de Pétri PDA. Ces cultures ont été faites en décalé suivant les températures. Ainsi pour obtenir des résultats comparables lors du dosage des AHLs dans les extraits obtenus, chaque boîte de Pétri a étéensemencée avec 100 µL d'une solution de DO 1,7 à 600 nm ou par 200 µL d'une solution de DO 1,1 à 600 nm pour BSNB-0661 et BSNB-0670 respectivement.

##### 10.4.2.1. Acylhomosérine lactone (AHL)

Des solutions stock pour chaque standard AHL sont réalisées à 1 mg/mL dans l'acétonitrile ou dans le chloroforme dans le cas de la C<sub>16</sub>-HSL et la C<sub>18</sub>-HSL. Les solvants sont de qualité MS. A partir de ces solutions stock, des dilutions sont effectuées afin d'obtenir six solutions renfermant un mélange de tous les standards. Les concentrations finales de ces solutions sont de 2 ng/mL, 20 ng/mL, 300 ng/mL, 600 ng/mL, 1000 ng/mL et 2000 ng/mL. L'analyse UHPLC-MS/MS de ces solutions permet d'établir des courbes d'étalonnages pour chaque AHL.

Ainsi, il est possible de doser ces mêmes standards dans les extraits analysés des souches endophytiques. Les extraits sont solubilisés dans 0,5 mL d'acétonitrile puis injectés pour analyse UHPLC-MS/MS. Les signaux correspondants aux AHLs sont identifiés par comparaison du temps de rétention avec les standards, de la masse associée et du spectre de fragmentation. L'intégration des aires de pics se fait avec le logiciel Xcalibur (Thermo Scientific®).

##### 10.4.2.2. Acylhomosérine lactone hydrolysée

Une solution à 20% d'hydroxyde de lithium LiOH est préparée dans de l'eau. Par dilution dans du tétrahydrofurane (THF), des mélanges de standards sont préparés à des concentrations finales de 2 ng/mL, 20 ng/mL, 300 ng/mL et 600 ng/mL. 20 µL de solution LiOH sont ajoutés à 1 mL de chaque solution d'AHLs puis le mélange est exposé aux ultrasons pendant 10 min (Figure X. 7). Quatre heures après, les solutions sont analysées en UHPLC-MS/MS et les masses des AHLs

hydrolysées sont recherchées. Si la saponification n'est pas aboutie, la réaction est laissée toute la nuit. Les solutions sont analysées en UHPLC-MS/MS.

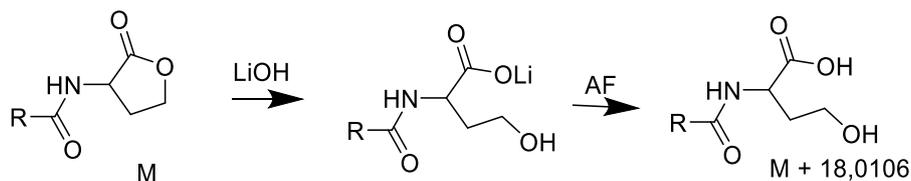


Figure X. 7. Dégradation de la lactone par ajout d'hydroxyde de lithium LiOH.

Des droites de calibration pour chaque standard peuvent être tracées. Dans le cas des 3-OH-HSL, un mélange racémique se forme avec des produits *R* & *S* sur la position 3 et *D* & *L* sur la position de la lactone. Un double pic apparaît alors pour l'hydrolyse de ces produits.

Afin de doser les AHLs hydrolysés dans les extraits bruts, ces derniers sont solubilisés dans 0,5 mL de THF puis injectés pour analyse UHPLC-MS/MS. Les signaux correspondants aux AHLs hydrolysées sont identifiés par comparaison du temps de rétention avec les standards, de la masse associée et du spectre de fragmentation. L'intégration des aires de pics se fait avec le logiciel Xcalibur (Thermo Scientific®).

#### 10.4.3. Pré-traitement des données MS/MS

Les fichiers bruts sont convertis en fichier MzXML en utilisant le logiciel MSConvert. Le pré-traitement de ces fichiers a été réalisé grâce au logiciel MZmine.<sup>349</sup> Les paramètres de détection (mass detection), de création de la liste de pics (chromatogram builder), de déconvolution (chromatogram deconvolution), de la suppression des isotopes (isotopic peaks grouper) et d'alignement (alignment) sont optimisés suivant les fichiers analysés. Une recherche d'adduits ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{ACN}^+$ ) peut être effectuée. Le pré-traitement de ces données conduit à l'obtention d'un fichier de format mgf.

#### Paramètres des différents pré-traitements

Descripti on Des extraits AcOEt	22 <i>Paraburkholder ia</i> sp.	BSNB-0661 ( <i>Paraburkholde ria</i> sp.) cultivée à différentes températures	BSNB-0670 ( <i>Paraburkholde ria</i> sp.) cultivée à différentes températures	131 champignons endophyte	66 bactéries endophyte	42 <i>Colletotrichum</i> sp.	BSNB-0294 et <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> en culture seule ou sur trois semaines de co- culture
<b>Mass detection</b>							
	Centroid Noise level : 1.0E5	Centroid Noise level : 1.0E6	Centroid Noise level : 1.0E6	Centroid Noise level : 5.0E5	Centroid Noise level : 5.0E5	Centroid Noise level : 1.0E5	Centroid Noise level : 1.0E2
<b>Chromatogram builder</b>							
	<b>ADAP</b> Min group size in # of scans : 5.00 Group intensity threshold : 5.0E5 Min highest intensity : 5.0E5 <i>m/z</i> tolerance : 0.005 or 10.0 ppm	Min time span (min) : 0.1 Min height : 3.0E4 <i>m/z</i> tolerance : 0.008 or 10.0 ppm	Min time span (min) : 0.1 Min height : 3.0E4 <i>m/z</i> tolerance : 0.008 or 10.0 ppm	<b>ADAP</b> Min group size in # of scans : 5.00 Group intensity threshold : 5.0E5 Min highest intensity : 5.0E5 <i>m/z</i> tolerance : 0.002 or 5.0 ppm	<b>ADAP</b> Min group size in # of scans : 5.00 Group intensity threshold : 5.0E5 Min highest intensity : 5.0E5 <i>m/z</i> tolerance : 0.002 or 5.0 ppm	<b>ADAP</b> Min group size in # of scans : 5.00 Group intensity threshold : 1.0E5 Min highest intensity : 1.0E5 <i>m/z</i> tolerance : 0.005 or 10.0 ppm	<b>ADAP</b> Min group size in # of scans : 5.00 Group intensity threshold : 1.0E2 Min highest intensity : 1.0E2 <i>m/z</i> tolerance : 0.005 or 10.0 ppm

Chromatogram deconvolution							
	<b>Wavelets ADAP</b> S/N threshold : 10 S/N estimator : Intensity window Min feature height : 1000 Coefficient/area threshold : 100 Peak duration range : 0.01 – 0.5 RT wavelet range : 0.0-0.05  <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da) : 0.008 RT range for MS2 scan pairing (min) : 0.3	<b>Local Minimum search</b> Chromatographic threshold : 90% Search minimum in RT range (min) : 0.1 Min relative height : 0.1 Min absolute height : 1.0E6 Min ratio of peak top/edge : 1.5 Peak duration range : 0.0 – 2.0  <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da) : 0.008 RT range for MS2 scan pairing (min) : 0.3	<b>Local Minimum search</b> Chromatographic threshold : 90% Search minimum in RT range (min) : 0.1 Min relative height : 0.1 Min absolute height : 1.0E6 Min ratio of peak top/edge : 1.5 Peak duration range : 0.0 – 2.0  <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da) : 0.008 RT range for MS2 scan pairing (min) : 0.3	<b>Wavelets ADAP</b> S/N threshold : 10 S/N estimator : Intensity window Min feature height : 1000 Coefficient/area threshold : 100 Peak duration range : 0.01 – 0.5 RT wavelet range : 0.01-0.05  <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da) : 0.001 RT range for MS2 scan pairing (min) : 0.3	<b>Wavelets ADAP</b> S/N threshold : 10 S/N estimator : Intensity window Min feature height : 1000 Coefficient/area threshold : 100 Peak duration range : 0.01 – 0.5 RT wavelet range : 0.01-0.05  <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da) : 0.001 RT range for MS2 scan pairing (min) : 0.3	<b>Wavelets ADAP</b> S/N threshold : 100 S/N estimator : Intensity window Min feature height : 1000 Coefficient/area threshold : 100 Peak duration range : 0.01 – 0.5 RT wavelet range : 0.0-0.05  <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da) : 0.008 RT range for MS2 scan pairing (min) : 0.3	<b>Wavelets ADAP</b> S/N threshold : 100 S/N estimator : Intensity window Min feature height : 1000 Coefficient/area threshold : 10 Peak duration range : 0.01 – 2.0 RT wavelet range : 0.0-0.05  <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da) : 0.008 RT range for MS2 scan pairing (min) : 0.3
Isotope peaks grouper							
<i>m/z</i> tolerance	0,003 ou 5,0 ppm	0,003 ou 5,0 ppm	0,003 ou 5,0 ppm	0,003 ou 5,0 ppm	0,003 ou 5,0 ppm	0,003 ou 5,0 ppm	0,003 ou 5,0 ppm
Retention time tolerance	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Maximum charge intensity	1 (Most intense)	1 (Most intense)	1 (Most intense)	2 (Most intense)	2 (Most intense)	2 (Most intense)	1 (Most intense)
Alignement (join aligner)							
<i>m/z</i> tolerance	0,002 ou 5,0 ppm	0,005 ou 10,0 ppm	0,005 ou 10,0 ppm	0,001 or 5,0 ppm	0,001 or 5,0 ppm	0,001 or 5,0 ppm	0,005 ou 10,0 ppm
Weight for <i>m/z</i>	0,002	0,003	0,003	0,001	0,001	0,001	0,003
Retention time tolerance	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5
Weight for RT	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3

#### 10.4.4. Réseau moléculaire

Le fichier sortant sous format mgf est analysé par le logiciel MetGem afin de créer un réseau moléculaire.<sup>204</sup> Les réseaux sont générés avec les paramètres suivants : *m/z* tolerance de 0,02 ; Minimum Matched Peaks de 4 ; topK de 10, Cosine Score entre 0,6 et 0,7 ; Max Connected Component Size de 100. Une cartographie du réseau par des couleurs peut être réalisée et dans ce cas, la quantification relative de chaque ion est représentée par un diagramme circulaire pour lequel la proportion est basée sur l'aire respective de cet ion dans les chromatogrammes d'où il est extrait. La comparaison avec les bibliothèques de spectres se fait par MetGem qui intègre les bases de données MS/MS disponibles publiquement. Le réseau moléculaire peut également être retraité sur le logiciel Cytoscape 3.7.0.

### 10.4.5. Système de purification

#### 10.4.5.1. Chromatographie Flash

Les fractionnements par chromatographie flash sont réalisés sur un appareil Grace Reveleris® équipé d'un système de détection UV dual aux longueurs d'onde de 210 et 270 nm ainsi que d'un DEDL.

Le fractionnement des extraits bruts s'est effectué sur colonne C<sub>18</sub> Reveleris® de 120 g par un système d'élution eau/acétonitrile acidifié avec 0,1% d'acide formique avec un débit de 80 mL/min. Le gradient d'élution se fait par palier avec augmentation de la proportion en acétonitrile (ACN) à chaque palier. Le dépôt se fait sous forme solide, par adsorption de l'extrait brut sur de la silice C<sub>18</sub>. A la fin du gradient d'élution, deux lavages de la colonne sont réalisés et constituent deux fractions supplémentaires : un premier lavage avec un mélange acétonitrile/dichlorométhane (50:50, v/v) et un deuxième composé de 100% de dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La colonne et le dépôt solide sont finalement rincés au tétrahydrofurane (THF).

Les sous-fractionnement se font selon le même principe, avec un changement au niveau de la taille des colonnes C<sub>18</sub> et du débit : colonne de 12 g avec un débit de 30 mL/min, et colonne de 40 g avec un débit de 40 mL/min. Le gradient d'élution est déterminé en amont par optimisation de la séparation des signaux sous HPLC.

Les rendements des fractions obtenues sont calculés suivant la masse d'extrait engagée dans le fractionnement.

#### 10.4.5.2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Les analyses et purifications par chromatographie liquide haute performance ont été réalisées sur une chaîne Gilson® 322 équipée d'un détecteur UV à barrettes de diodes Gilson® 171 et d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) prepELS™II (Gilson®).

Les colonnes utilisées sont des colonnes Phenomenex Luna® C<sub>18</sub> et Phenomenex Luna® C<sub>8</sub>. En analytique, les dimensions des colonnes sont de 250 x 4,6 mm (5 µm) pour un débit de 1 mL/min et en préparative, les dimensions des colonnes sont de 250 x 21,2 mm (5 µm) pour un débit de 21 mL/min. La phase mobile est un gradient d'élution entre l'eau et l'acétonitrile additionnés d'acide formique à 0,1%. Les échantillons analysés en analytique sont préparés dans du méthanol (MeOH) à la concentration de 10 ou 5 mg/mL pour les extraits bruts et les fractions respectivement. Les extraits sont passés sur colonne SPE avant leur injection en HPLC.

Les échantillons purifiés en préparative sont préparés dans du MeOH à la concentration maximale de 50 mg/mL. Les échantillons sont filtrés sur 0,45 µm avant injection.

### 10.4.6. Préparation des FAMES (Fatty acid methyl ester) et analyse

La préparation des FAMES a été menée selon le protocole de méthanolisation/méthylation par l'acide chlorhydrique (HCl) concentré décrite par Ichihara et Fukubayashi.<sup>401</sup> Une solution d'HCl à 8% (w/v) est préparée par dilution d'HCl concentrée (9,1 mL) dans du méthanol (40,9 mL). Chaque acide gras est dissout dans du toluène à la concentration de 5 mg/mL. Puis, 7,5 fois plus de méthanol est ajouté ainsi que 1,5 fois plus d'HCl à 8%. Le mélange est mis à agiter à 45°C pendant 24h. Après retour à température ambiante, de l'hexane et de l'eau sont ajoutés afin d'extraire les acide gras méthylés.

Afin d'être analysés, les acide gras méthylés sont dilués dans du dichlorométhane à la concentration de 2 mg/mL puis dilués dans l'acétonitrile pour atteindre la concentration de

---

<sup>401</sup> Ichihara K., Fukubayashi Y., Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, p. 635-640.

200 µg/mL. Ces solutions sont analysées par MS/MS par injection directe à un débit de 10 µL/min dans un spectromètre de masse Q-TOF 6540 équipé d'une source d'ions APCI en mode positif. Le courant corona est fixé à 2 µA, la pression du nébuliseur à 60 psig et un débit d'azote de 8 L/min chauffé à 300°C est utilisé pour la désolvatation. Les tensions du capillaire, fragmenteur et cône sont fixées à 3000, 100 et 45 V respectivement.

#### 10.4.7. Identification structurale

##### 10.4.7.1. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ( $\alpha_D$ ) ont été mesurés à une température de 20°C à l'aide d'un polarimètre Anton Paar® MCP300 dans une cuve de 100 mm pouvant contenir 350 µL. La source lumineuse monochromatique est la raie D du sodium ( $\lambda = 589,3$  nm).

##### 10.4.7.2. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un spectropolarimètre Jasco® J-810 et traités via le logiciel SpectroManager®. Les analyses ont été faites dans une cuve en quartz de 1 cm à la température de 20°C.

##### 10.4.7.3. Spectrométrie de masse haute résolution

Les mesures de masse haute résolution des molécules isolées ont été réalisées à l'aide d'un système UHPLC Acquity Waters® équipé d'un détecteur PDA Waters (longueur d'onde entre 210 et 410 nm). La chaîne est couplée à un spectromètre de masse LCT-Premier XE Waters® muni d'une source ESI (Electro Spray Ionisation) et équipé d'un analyseur à temps de vol TOF (Time Of Flight). Les échantillons sont soit analysés en by-pass selon un système d'élution isocratique eau/acétonitrile (50:50, v/v) additionné de 0,1% d'acide formique, soit séparés par une colonne BEH C<sub>18</sub> (1,7 µm ; 2,1 x 50 mm) par un gradient eau/acétonitrile additionnés de 0,1% d'acide formique de (95:5, v/v) à (0:100, v/v) en 5,5 minutes avant de passer dans le spectromètre de masse. Le traitement des données est effectué via le logiciel MassLynx®.

##### 10.4.7.4. Résonance magnétique nucléaire

Les expériences 1D et 2D de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été effectuées sur des appareils Bruker Avance 300, 500 et 600 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et calibrés par rapport aux solvants utilisés pour l'analyse : méthanol-*d*<sub>4</sub> (CD<sub>3</sub>OD), chloroforme-*d* (CDCl<sub>3</sub>), acétonitrile-*d*<sub>3</sub> (CD<sub>3</sub>CN) ou diméthylsulfoxyde-*d*<sub>6</sub> ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO). Les constantes de couplage (*J*) sont exprimées en Hertz (Hz) et la multiplicité par les abréviations suivantes : m (multiplet), s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), quin (quintuplet) et non (nonuplet). Le traitement des spectres a été effectué par le logiciel TopSpin 3.5 (Bruker®). Pour certaines molécules, l'attribution complète des protons et carbones a pu être obtenues et est indiquée.

#### 10.5. Etude par fractionnement bio-guidé de la souche BSNB-0656

Une étude chimique de la souche BSNB-0656 a été réalisée du fait de l'activité quorum quenching (QQ) sur *S. aureus* de son extrait brut lors du criblage. Également l'extrait montre une activité QQ sur les autres biosenseurs MT102, F117 et CV026. La souche BSNB-0656 a été identifiée sur la base d'un séquençage de la région 16S comme appartenant au genre *Paraburkholderia*.

Deux cultures à grande échelle de la bactérie ont été réalisées sur milieu gélosé PDA en ensemençant 348 et 375 boîtes de Pétri. Après trois extractions successives des cultures à l'acétate d'éthyle (AcOEt), lavage à l'eau de la phase organique et séchage, un total de 2,01 g d'extrait brut est obtenu.

1,48 g d'extrait ont été engagés pour un fractionnement sur chromatographie flash en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Le gradient d'éluion est un gradient par palier de 5 minutes entre l'eau et l'acétonitrile acidifiés à 0,1% d'acide formique (v/v, 95:5, 75:25, 50:50, 20:80 et 0:100). Sept fractions ont été ainsi générées suivant la détection UV et DEDL : F1 (19,9 mg, 1,3%), F2 (77,5 mg, 5,2%), F3 (188,9 mg, 12,8%), F4 (155,8 mg, 10,5%), F5 (32,0 mg, 2,2%), F6 (64,4 mg, 4,4%) et F7 (53,8 mg, 3,6%). Les deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de deux fractions additionnelles : F8 (264,6 mg, 17,9%) et F9 (368,2 mg, 24,9%). Une fraction F10 (362,3 mg, 24,5%) a été formée avec l'éluion de THF dans la colonne.

BSNB-0656-F2 (77,5 mg) a été purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; éluion par gradient isocratique 85:15; débit 21 mL/min) pour isoler trois dicétopipérazines : les cyclo-(*S*-Pro-*S*-Ile) (**7**) (1,4 mg, t<sub>R</sub>= 13,8 min), cyclo-(*S*-Pro-*R*-Leu) (**8**) (1,5 mg, t<sub>R</sub>= 17,0 min) et cyclo-(*S*-Pro-*R*-Phe) (**9**) (3,4 mg, t<sub>R</sub>= 26,5 min).

BSNB-0656-F3 (188,9 mg) a été purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; éluion par gradient isocratique 70:30 pendant 15 min puis gradient linéaire de 70:30 à 50:50 en 10 min puis gradient isocratique 50:50 pendant 5 min; débit 21 mL/min) pour isoler trois molécules pures : les *N*-(3-hydroxydécanyl)-homosérine lactone (**3**) (5,3 mg, t<sub>R</sub>= 25,7 min), *N*-(3-hydroxydodécanyl)-homosérine lactone (**5**) (4,7 mg, t<sub>R</sub>= 27,5 min) et *N*-(3-oxodécanyl)-homosérine lactone (**2**) (2,8 mg, t<sub>R</sub>= 28,8 min).

BSNB-0656-F4 (155,8 mg) a été purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; éluion par gradient isocratique 50:50 pendant 4 min puis gradient linéaire de 50:50 à 0:100 en 21 min puis gradient isocratique 0:100 pendant 5 min; débit 21 mL/min) pour isoler cinq molécules pures : les *N*-(3-oxodécanyl)-homosérine lactone (**2**) (1,4 mg, t<sub>R</sub>= 9,0 min), *N*-(3-hydroxydodécanyl)-homosérine lactone (**5**) (16,8 mg, t<sub>R</sub>= 11,8 min), *N*-(3-oxododécanyl)-homosérine lactone (**4**) (9,4 mg, t<sub>R</sub>= 14,3 min), *N*-(3-hydroxytétradécanyl)-homosérine lactone (**1**) (4,0 mg, t<sub>R</sub>= 17,2 min) et *N*-(3-oxotétradécanyl)-homosérine lactone (**6**) (4,0 mg, t<sub>R</sub>= 19,4 min).

***N*-(3-hydroxytétradécanyl)-homosérine lactone (1)** (3-OH-C<sub>14</sub>-HSL) : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,64 (1H, dd, *J* = 10,9, 9,2, **H-2'**), 4,44 (1H, td, *J* = 9,0, 1,4, **H-4'**), 4,30 (1H, m, **H-4'**), 3,97 (1H, m, **H-3**), 2,56 (1H, m, **H-3'**), 2,36 (2H, m, **H-2**), 2,26 (1H, m, **H-3'**), 1,47 (4H, m, **H-4**, **H-5**), 1,30 (16H, br s, **H-6**, **H-7**, **H-8**, **H-9**, **H-10**, **H-11**, **H-12**, **H-13**), 0,90 (3H, t, *J* = 6,7, **H-14**); RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 177,4 (**C-1'**), 174,4 (**C-1**), 69,7 (**C-3**), 67,2 (**C-4'**), 49,9 (**C-2'**), 44,7 (**C-2**), 38,2 (**C-4**), 33,1 (**C-12**), 30,8-30,4 (**C-6**, **C-7**, **C-8**, **C-9**, **C-10**, **C-11**, **C-12**), 29,8 (**C-3'**), 26,6 (**C-5**), 23,7 (**C-13**), 14,4 (**C-14**). HR-ESI-MS : 328,2504 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 328,2482, err. 6,70 ppm), 677,4720 ([2M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>36</sub>H<sub>66</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 677,4711, err. 1,33 ppm).

***N*-(3-oxodécanyl)-homosérine lactone (2)** (3-oxo-C<sub>10</sub>-HSL) : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,62 (1H, t, *J* = 9,8), 4,45 (1H, t, *J* = 9,0), 4,30 (1H, q, *J* = 8,5), 2,58 (3H, m), 2,29 (1H, quin, *J* = 10,6), 1,57 (2H, m), 1,30 (10H, br s), 0,90 (3H, t, *J* = 6,7). HR-ESI-MS : 270,1718 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 270,1700, err. 6,66 ppm), 292,1528 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 292,1519, err. 3,08 ppm), 561,3140 ([2M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 561,3146, err. -2,85 ppm).

***N*-(3-hydroxydécanyl)-homosérine lactone (3)** (3-OH-C<sub>10</sub>-HSL) : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,64 (1H, t, *J* = 10,1), 4,44 (1H, t, *J* = 9,0), 4,29 (1H, m), 3,97 (1H, m), 2,56 (1H, m), 2,36 (2H, m), 2,26 (1H, quin, *J* = 10,5), 1,48 (4H, m), 1,32 (10H, br s), 0,90 (3H, t, *J* = 6,7). HR-ESI-MS : 272,1855 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 272,1856, err. -0,37 ppm), 294,1672 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 294,1676, err. -1,36 ppm), 565,3446 ([2M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 565,3459, err. -2,30 ppm).

**N-(3-oxododécanoïl)-homosérine lactone (4)** (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,62 (1H, t, J = 9,8), 4,45 (1H, t, J = 8,7), 4,30 (1H, q, J = 8,8), 2,58 (3H, m), 2,29 (1H, quin, J = 10,8), 1,56 (2H, m), 1,30 (14H, br s), 0,90 (3H, t, J = 6,7). HR-ESI-MS : 298,2034 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 298,2013, err. 7,04 ppm), 320,1852 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 320,1832, err. 6,23 ppm), 617,3777 ([2M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 617,3772, err. 0,81 ppm).

**N-(3-hydroxydodécanoïl)-homosérine lactone (5)** (3-OH-C<sub>12</sub>-HSL) : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,64 (1H, t, J = 10,1), 4,44 (1H, t, J = 8,8), 4,30 (1H, m), 3,97 (1H, m), 2,56 (1H, m), 2,37 (2H, m), 2,26 (1H, quin, J = 10,6), 1,48 (4H, m), 1,31 (12H, br s), 0,90 (3H, t, J = 6,7). HR-ESI-MS : 300,2184 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 300,2169, err. 5,00 ppm), 322,2007 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 322,1989, err. 5,59 ppm), 621,4095 ([2M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>32</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 621,4085, err. 1,61 ppm).

**N-(3-oxotétradécanoïl)-homosérine lactone (6)** (3-oxo-C<sub>14</sub>-HSL) : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,62 (1H, t, J = 10,1), 4,45 (1H, t, J = 8,9), 4,30 (1H, m), 2,58 (3H, m), 2,29 (1H, m), 1,57 (2H, m), 1,29 (18H, s), 0,90 (3H, t, J = 6,7). HR-ESI-MS : 326,2342 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 326,2326, err. 4,90 ppm), 348,2163 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 348,2145, err. 5,17 ppm), 673,4402 ([2M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>36</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 673,4398, err. 0,59 ppm).

**Cyclo-(S-Pro-S-Ile) (7)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -194 (c 0,1 g/100mL, EtOH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,19 (1H, t, J = 7,2), 4,07 (1H, s), 3,56 (1H, m), 3,50 (1H, m), 2,32 (1H, m), 2,16 (1H, m), 2,05-1,92 (4H, m), 1,45 (1H, m), 1,07 (3H, d, J = 7,4), 0,94 (3H, t, J = 7,4). HR-ESI-MS : 211,1451 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 211,1441, err. 4,73 ppm), 252,1720 ([M+ACN+H]<sup>+</sup>, C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 252,1707, err. 5,16 ppm).

**Cyclo-(S-Pro-R-Leu) (8)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -77 (c 0,1 g/100mL, EtOH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,26 (1H, t, J = 7,6), 4,13 (1H, m), 3,52 (2H, m), 2,30 (1H, m), 2,05-1,88 (6H, m), 1,53 (1H, m), 0,97 (3H, d, J = 6,4), 0,96 (3H, d, J = 6,4). HR-ESI-MS : 211,1449 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 211,1441, err. 3,79 ppm), 252,1718 ([M+ACN+H]<sup>+</sup>, C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 252,1707, err. 4,36 ppm).

**Cyclo-(S-Pro-R-Phe) (9)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -108 (c 0,1 g/100mL, EtOH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,26 (5H, m), 4,45 (1H, t, J = 5,0), 4,08 (1H, m), 3,55 (1H, m), 3,38 (1H, m), 3,18 (2H, m), 2,10 (2H, m), 1,81 (2H, m). HR-ESI-MS : 245,1308 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 245,1285, err. 9,38 ppm), 286,1563 ([M+ACN+H]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 286,1550, err. 4,54 ppm).

## 10.6. Etude par fractionnement bio-guidé de la souche BSNB-0721

La souche BSNB-0721 est une bactérie du genre *Luteibacter*, dont l'extrait brut a montré une activité antimicrobienne sur SARM (CMI de 64 µg/mL) sans cytotoxicité.

Une culture à grande échelle de la bactérie a été réalisée sur milieu gélosé PDA en ensemençant 210 boîtes de Pétri. Après trois extractions successives de la culture à l'acétate d'éthyle (AcOEt), lavage à l'eau de la phase organique et séchage, 2,0 g d'extrait brut sont obtenus.

1,8 g d'extrait ont été engagés pour un fractionnement sur chromatographie flash en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Le gradient d'éluion est un gradient par palier de 5 minutes entre l'eau et l'acétonitrile acidifiés à 0,1% d'acide formique (v/v, 95:5, 75:25, 50:50, 20:80 et 0:100). Six fractions ont été ainsi générées suivant la détection UV et DEDL : F1 (22,2 mg, 1,2%), F2 (165,5 mg, 9,2%), F3 (93,6 mg, 5,2%), F4 (41,0 mg, 2,3%), F5 (46,3 mg, 2,6%) et F6 (563,8 mg, 31,3%). Les deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de deux fractions additionnelles : F7 (334,4 mg, 18,6%) et F8 (91,8 mg, 5,1%). Une fraction F9 (173,0 mg, 9,6%) a été formée avec l'éluion de THF dans la colonne.

BSNB-0721-F4 (35,0 mg) a été purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; élution par gradient isocratique 60:40 pendant 6 min puis gradient linéaire de 60:40 à 0:100 en 13 min puis gradient isocratique 0:100 pendant 5 min; débit 21 mL/min) pour isoler l'acide (*R*)-3-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque (**14**) (0,2 mg, t<sub>R</sub>= 26,5 min).

BSNB-0721-F5 (41,4 mg) a été purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>8</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; élution par gradient isocratique 40:60 pendant 6 min puis gradient linéaire de 40:60 à 0:100 en 13 min puis gradient isocratique 0:100 pendant 5 min; débit 21 mL/min) pour isoler l'acide (*R*)-2-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque (**10**) (3,7 mg, t<sub>R</sub>=14,0 min), l'acide (*R*)-3-hydroxy-14-méthylpentadécanoïque (**11**) (1,5 mg, t<sub>R</sub>= 15,3 min), l'acide (*S*)-β-hydroxypalmitique (**12**) (1,9 mg, t<sub>R</sub>= 15,6 min) et l'acide 9Z-hexadécanoïque (**16**) (0,4 mg, t<sub>R</sub>= 21,5 min).

BSNB-0721-F6 (258,0 mg) a été purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>8</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; élution par gradient isocratique 35:65; débit 21 mL/min) pour isoler quatre molécules pures : l'acide (*R*)-3-hydroxy-15-méthylhexadécanoïque (**13**) (7,2 mg, t<sub>R</sub>= 15,0 min), l'acide 9Z-hexadécanoïque (**16**) (30,7 mg, t<sub>R</sub>= 21,0 min), l'acide 13-méthyltétradécanoïque (**15**) (62,2 mg, t<sub>R</sub>= 24,0 min) et l'acide 15-méthyl-9Z-hexadécanoïque (**17**) (63,8 mg, t<sub>R</sub>= 27,0 min).

**Acide (*R*)-2-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque (10)** : White powder. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -5,6 (c 0,5 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 4,07 (1H, dd, *J* = 7,4, 4,4, **H-2**), 1,75 (1H, m, **H-3**), 1,63 (1H, m, **H-3**), 1,52 (1H, non, *J* = 6,7, **H-13**), 1,44 (2H, m, **H-4**), 1,30 (14H, br s, **H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11**), 1,17 (2H, m, **H-2**), 0,88 (6H, d, *J* = 6,8, **H-14, H-15**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 178,6 (**C-1**), 71,9 (**C-2**), 40,4 (**C-12**), 35,7 (**C-3**), 31,2-30,8 (**C-6, C-7, C-8, C-9, C-10**), 30,7 (**C-5**), 29,3 (**C-13**), 28,7 (**C-11**), 26,3 (**C-4**), 23,2 (**C-14, C-15**). HR-ESI-MS : 257,2109 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>; calc. 257,2122, err. -5,05 ppm), 515,4294 ([2M-H]<sup>-</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>59</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>; calc. 515,4317, err. -4,46 ppm).

**Acide (*R*)-3-hydroxy-14-méthylpentadécanoïque (11)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -5,6 (c 0,5 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3,96 (1H, m, **H-3**), 2,42 (1H, dd, *J* = 15,1, 4,7, **H-2**), 2,35 (1H, dd, *J* = 15,1, 8,2, **H-2**), 1,53 (1H, non, *J* = 6,7, **H-14**), 1,47 (4H, m, **H-4, H-5**), 1,30 (14H, br s, **H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12**), 1,18 (2H, m, **H-13**), 0,88 (6H, d, *J* = 6,8, **H-15, H-16**). RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 176,7 (**C-1**), 69,6 (**C-3**), 43,7 (**C-2**), 40,4 (**C-13**), 38,2 (**C-4**), 31,2-30,9 (**C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11**), 29,3 (**C-14**), 28,7 (**C-12**), 26,8 (**C-5**), 23,2 (**C-15, C-16**). HR-ESI-MS : 271,2274 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>; calc. 271,2279, err. -1,84 ppm), 543,4611 ([2M-H]<sup>-</sup>, C<sub>32</sub>H<sub>63</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>; calc. 543,4630, err. -3,50 ppm).

**Acide (*S*)-β-hydroxypalmitique (12)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +18 (c 0,1 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3,97 (1H, m, **H-3**), 2,43 (1H, dd, *J* = 15,1, 4,7, **H-2**), 2,36 (1H, dd, *J* = 15,1, 8,2, **H-2**), 1,47 (4H, m, **H-4, H-5**), 1,30 (20H, br s, **H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15**), 0,90 (3H, t, *J* = 7,2, **H-16**). RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 176,1 (**C-1**), 69,5 (**C-3**), 43,5 (**C-2**), 38,3 (**C-4**), 33,2 (**C-14**), 30,9-30,6 (**C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13**), 26,8 (**C-5**), 23,9 (**C-15**), 14,6 (**C-16**). HR-ESI-MS : 271,2274 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>; calc. 271,2279, err. -1,84 ppm), 543,4611 ([2M-H]<sup>-</sup>, C<sub>32</sub>H<sub>63</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>; calc. 543,4630, err. -3,50 ppm).

**Acide (*R*)-3-hydroxy-15-méthylhexadécanoïque (13)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -20 (c 0,1 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3,96 (1H, m, **H-3**), 2,43 (1H, dd, *J* = 15,1, 4,7, **H-2**), 2,35 (1H, dd, *J* = 15,2, 8,2, **H-2**), 1,53 (1H, non, *J* = 6,7, **H-15**), 1,47 (2H, m, **H-4**), 1,30 (18H, br s, **H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13**), 1,18 (2H, m, **H-14**), 0,88 (6H, d, *J* = 6,6, **H-16, H-17**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 176,5 (**C-1**), 69,7 (**C-3**), 43,7 (**C-2**), 40,4 (**C-14**), 38,3 (**C-4**), 31,2-30,9 (**C-6,**

**C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12**, 29,3 (**C-15**), 28,7 (**C-12**), 26,8 (**C-5**), 23,2 (**C-15, C-16**). HR-ESI-MS : 285,2431 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>; calc. 285,2435, err. -1,40 ppm), 571,4926 ([2M-H]<sup>-</sup>, C<sub>34</sub>H<sub>67</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>; calc. 571,4943, err. -2,97 ppm).

**Acide (R)-3-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque (14)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -15 (c 0,1 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 3,89 (1H, s, **H-3**), 2,34 (1H, m, **H-2**), 2,25 (1H, m, **H-2**), 1,52 (1H, m, **H-13**), 1,45 (4H, s, **H-4, H-5**), 1,31 (12H, br s, **H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11**), 1,18 (2H, s, **H-12**), 0,88 (6H, d, *J* = 6,6, **H-14, H-15**). RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 176,5 (**C-1**), 70,4 (**C-3**), 45,3 (**C-2**), 40,4 (**C-12**), 38,2 (**C-4**), 31,2-30,9 (**C-6, C-7, C-8, C-9, C-10**), 29,3 (**C-13**), 28,7 (**C-11**), 26,8 (**C-5**), 23,1 (**C-14, C-15**). HR-ESI-MS : 257,2101 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>; calc. 257,2122, err. -8,16 ppm), 515,4285 ([2M-H]<sup>-</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>59</sub>O<sub>6</sub><sup>-</sup>; calc. 515,4317, err. -6,21 ppm).

**Acide 13-méthyltétradécanoïque (15)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 2,27 (1H, t, *J* = 7,4, **H-2**), 1,60 (1H, m, **H-3**), 1,52 (1H, non, *J* = 6,6, **H-13**), 1,30 (16H, br s, **H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11**), 1,18 (1H, m, **H-12**), 0,88 (6H, d, *J* = 6,7, **H-14, H-15**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 177,9 (**C-1**), 40,4 (**C-11**), 35,2 (**C-2**), 31,2-30,4 et 28,7 (**C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10**), 29,3 (**C-13**), 26,3 (**C-3**), 23,2 (**C-14, C-15**). HR-ESI-MS : 241,2168 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>; calc. 241,2173, err. -2,07 ppm), 483,4432 ([2M-H]<sup>-</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>59</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>; calc. 483,4419, err. 2,69 ppm).

**Acide 9Z-hexadécenoïque (16)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5,34 (2H, dt, *J* = 11,3, 6,2, **H-9, H-10**), 2,27 (2H, t, *J* = 7,5, **H-2**), 2,04 (4H, m, **H-8, H-11**), 1,60 (2H, m, **H-3**), 1,33 (16H, br s, **H-4, H-5, H-6, H-7, H-12, H-13, H-14, H-15**), 0,90 (3H, t, *J* = 6,9, **H-16**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 178,0 (**C-1**), 131,1 (**C-10**), 130,9 (**C-11**), 35,3 (**C-2**), 33,1 (**C-14**), 31,0 (**C-13**), 31,0-30,2 (**C-4, C-5, C-6, C-7, C-8**), 28,3 (**C-9, C-12**), 26,3 (**C-3**), 23,9 (**C-15**), 14,6 (**C-16**). HR-ESI-MS : 255,2326 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 255,2319, err. 2,74 ppm), 253,2164 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>; calc. 253,2162, err. 0,79 ppm), 507,4426 ([2M-H]<sup>-</sup>, C<sub>32</sub>H<sub>59</sub>O<sub>4</sub><sup>-</sup>; calc. 507,4408, err. 3,55 ppm).

**Acide 15-méthyl-9Z-hexadécenoïque (17)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5,35 (2H, dt, *J* = 11,3, 6,2, **H-10, H-11**), 2,27 (2H, t, *J* = 7,4, **H-2**), 2,04 (4H, m, **H-9, H-12**), 1,60 (2H, m, **H-3**), 1,53 (1H, non, *J* = 6,7, **H-15**), 1,33 (12H, br s, **H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9**), 1,19 (2H, m, **H-14**), 0,89 (6H, d, *J* = 6,6, **H-16, H-17**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 177,9 (**C-1**), 131,0 (**C-10, C-11**), 40,3 (**C-14**), 35,2 (**C-2**), 31,3-30,3 (**C-4, C-5, C-6, C-7, C-8**), 29,3 (**C-15**), 28,3 (**C-9, C-11**), 28,3 (**C-13**), 26,3 (**C-3**), 23,2 (**C-16, C-17**). HR-ESI-MS : 269,2484 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 269,2475, err. 3,34 ppm), 267,2334 ([M-H]<sup>-</sup>, C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>; calc. 267,2330, err. 1,50 ppm), 535,4756 ([2M-H]<sup>-</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>; calc. 535,4721, err. 6,54 ppm).

## 10.7. Etude de la souche BSNB-0730

BSNB-0730 est une bactérie identifiée *Bacillus* sp., dont l'extrait brut a montré une activité antimicrobienne sur SARM (CMI à 64 µg/mL) et *T. rubrum* (CMI < 8 µg/mL) sans cytotoxicité.

Une culture à grande échelle de la bactérie a été réalisée sur milieu gélosé PDA en ensemençant 511 boîtes de Pétri. Après trois extractions successives de la culture à l'acétate d'éthyle (AcOEt), lavage à l'eau de la phase organique et séchage, 3,9 g d'extrait brut est obtenu.

L'extrait (3,8 g) est fractionné sur chromatographie flash en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Le gradient d'élution est un gradient par palier de 5 minutes entre l'eau et l'acétonitrile acidifiés à 0,1% d'acide formique (v/v, 95:5, 75:25, 50:50, 20:80 et 0:100). Huit fractions ont été ainsi générées suivant la détection UV et DEDL : F1 (48,5 mg, 1,3%), F2 (27,9 mg, 0,7%), F3 (97,1 mg, 2,6%), F4 (41,8 mg, 1,1%), F5 (529,7 mg, 13,9%), F6 (22,8 mg, 0,6%), F7 (54,3 mg, 1,4%) et F8 (27,1 mg, 0,7%). Les deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de trois fractions additionnelles : F9 (200,8 mg, 5,3%), F10 (211,8 mg, 5,6%)

et F11 (14,7 mg, 0,4%). Une fraction F12 (287,5 mg, 7,6%) a été formée avec l'élution de THF dans la colonne.

L'activité antibactérienne sur SARM de l'extrait brut issu de la grande échelle n'a pas été retrouvée, de même les fractions ont été testées et n'ont pas montré d'activité. Compte tenu du changement de profil chimique entre l'extrait brut qui a servi au criblage et l'extrait brut obtenu après la culture à grande échelle, l'étude chimique de BSNB-0730 a alors été arrêtée.

### 10.8. Etude de la souche BSNB-0580

BSNB-0580 est une souche fongique du genre *Colletotrichum*. Son extrait brut a montré une forte cytotoxicité sur les cellules MRC-5 corrélée avec la potentielle présence de cyclopeptides dans l'extrait.

Une culture à grande échelle du champignon a été réalisée sur milieu gélosé PDA en ensemençant 226 boîtes de Pétri. Après trois extractions successives de la culture à l'acétate d'éthyle (AcOEt), lavage à l'eau de la phase organique et séchage, 4,7 g d'extrait brut sont obtenus.

4,5 g d'extrait sont alors engagés pour un fractionnement sur chromatographie flash en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Le gradient d'élution est un gradient par palier de 5 minutes entre l'eau et l'acétonitrile acidifiés à 0,1% d'acide formique (v/v, 80:20, 50:50, 35:65, 20:80 et 0:100). Six fractions ont été ainsi générées suivant la détection UV et DEDL : F1 (158,7 mg, 3,5%), F2 (1,29 g, 28,7%), F3 (120,1 mg, 2,7%), F4 (531,6 mg, 11,8%), F5 (71,3 mg, 1,6%) et F6 (144,5 mg, 3,2%). Les deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de quatre fractions additionnelles : F7 (271,9 mg, 6,0%), F8 (105,2 mg, 2,3%), F9 (381,9 mg, 8,5%) et F10 (114,7 mg, 2,5%). Une fraction F11 (0,46 g, 10,2%) a été formée avec l'élution de THF dans la colonne.

La fraction BSNB-0580-F4 est sélectionnée pour être purifiée de par son activité cytotoxique. BSNB-0656-F4 a été purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; élution par gradient isocratique 65:35; débit 21 mL/min) pour isoler trois cyclopeptides : cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Val) (**18**) (3,1 mg, t<sub>R</sub>= 9,4 min), cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Leu) (**19**) (2,9 mg, t<sub>R</sub>= 11,0 min) et cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Ile) (**20**) (265,5 mg, t<sub>R</sub>= 12,0 min).

**Cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Val) (18)** : RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ Phénylalanine 8,33 (1H, s, NH), 7,22 (2H, m, H-5), 7,17 (2H, m, H-6), 7,16 (1H, m, H-7), 4,53 (1H, dd, J = 15,2, 7,6, H-2), 3,00 (1H, dd, J = 13,2, 7,6, H-3), 2,69 (1H, dd, J = 13,2, 7,3, H-3); Leucine1 8,48 (1H, d, J = 7,9, NH), 4,26 (1H, dd, J = 15,2, 7,4, H-2), 1,41 (1H, m, H-3), 1,28 (1H, m, H-3), 1,23 (1H, m, H-4), 0,79 (3H, m, H-5), 0,76 (3H, m, H-6); Leucine2 8,60 (1H, s, NH), 4,20 (1H, m, H-2), 1,54 (1H, m, H-4), 1,49 (2H, m, H-3), 0,87 (3H, t, J = 6,5, H-5), 0,79 (3H, m, H-6); Leucine3 8,40 (1H, s, NH), 4,33 (1H, dd, J = 16,3, 8,0, H-2), 1,49 (2H, m, H-3), 1,45 (1H, m, H-4), 0,87 (3H, t, J = 6,5, H-5), 0,85 (3H, d, J = 6,2, H-6); Valine 8,88 (1H, s, NH), 3,58 (1H, m, H-2), 2,13 (1H, m, H-3), 0,79 (3H, m, H-4), 0,67 (3H, d, J = 6,7, H-5). RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ Phénylalanine 170,4 (C-1), 137,8 (C-4), 129,1 (C-5, C-9), 128,0 (C-6, C-8), 126,1 (C-7), 53,4 (C-2), 37,5 (C-3); Leucine1 170,9 (C-1), 51,0 (C-2), 39,4 (C-3), 24,1 (C-4), 22,6 (C-5), 22,4 (C-6); Leucine2 171,5 (C-1), 52,7 (C-2), 40,6 (C-3), 24,4 (C-4), 22,9 (C-5), 21,2 (C-6); Leucine3 171,1 (C-1), 52,6 (C-2), 41,1 (C-3), 24,6 (C-4), 22,4 (C-5), 22,3 (C-6); Valine 171,0 (C-1), 62,5 (C-2), 29,4 (C-3), 19,2 (C-4, C-5). HR-ESI-MS : 586,3959 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>; calc. 586,3963, err. -0,68 ppm), 1171,7887 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>64</sub>H<sub>103</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>; calc. 1171,7892, err. -0,43 ppm).

**Cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Leu) (19)** : RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ Phénylalanine 8,34 (1H, s, NH), 7,22 (2H, m, H-6), 7,17 (2H, m, H-5), 7,16 (1H, m, H-7), 4,48 (1H, dd, *J* = 15,5, 8,0, H-2), 3,02 (1H, dd, *J* = 13,2, 7,6, H-3), 2,70 (1H, dd, *J* = 13,2, 7,0, H-3) ; Leucine1 8,34 (1H, d, *J* = 8,2, NH), 4,25 (1H, m, H-2), 1,41 (1H, m, H-3), 1,29 (1H, m, H-3), 1,23 (1H, m, H-4), 0,78 (3H, m, H-5), 0,76 (3H, d, *J* = 6,5, H-6) ; Leucine2 8,46 (1H, m, NH), 4,21 (1H, m, H-2), 1,52 (2H, m, H-3), 1,44 (1H, m, H-4), 0,87 (3H, m, H-5), 0,84 (3H, m, H-6) ; Leucine3 8,50 (1H, s, NH), 4,30 (1H, m, H-2), 1,46 (2H, m, H-3), 1,41 (1H, m, H-4), 0,87 (3H, m, H-5), 0,79 (3H, m, H-6) ; Leucine4 8,94 (1H, s, NH), 4,07 (1H, m, H-2), 1,47 (1H, m, H-3), 1,44 (1H, m, H-4), 1,36 (1H, m, H-3), 0,83 (3H, m, H-5), 0,77 (3H, m, H-6). RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ Phénylalanine 170,4 (C-1), 137,9 (C-4), 129,3 (C-5, C-9), 128,0 (C-6, C-8), 126,1 (C-7), 53,5 (C-2), 37,3 (C-3) ; Leucine1 171,6 (C-1), 50,8 (C-2), 39,4 (C-3), 24,1 (C-4), 22,8 (C-5), 22,3 (C-6) ; Leucine2 170,9 (C-1), 52,8 (C-2), 40,7 (C-3), 24,6 (C-4), 22,8 (C-5), 22,2 (C-6) ; Leucine3 171,1 (C-1), 52,6 (C-2), 40,6 (C-3), 24,5 (C-4), 23,0 (C-5), 21,3 (C-6) ; Leucine4 172,0 (C-1), 53,9 (C-2), 40,5 (C-3), 24,6 (C-4), 22,3 (C-6), 21,8 (C-5). HR-ESI-MS : 600,4113 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>33</sub>H<sub>54</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>; calc. 600,4119, err. -1,00 ppm), 1199,8197 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>66</sub>H<sub>107</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>; calc. 1199,8166, err. 2,58 ppm).

**Cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Ile) (20)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ Phénylalanine 7,99 (1H, d, *J* = 8,9, NH), 7,24 (2H, m, H-5, H-9), 7,18 (2H, m, H-6, H-8), 7,17 (1H, m, H-7), 4,65 (1H, dd, *J* = 15,3, 8,5, H-2), 2,91 (1H, dd, *J* = 13,6, 6,4, H-3), 2,72 (1H, dd, *J* = 13,5, 8,6, H-3) ; Leucine1 8,56 (1H, d, *J* = 8,0, NH), 4,17 (1H, dd, *J* = 14,4, 7,2, H-2), 1,42 (1H, m, H-3), 1,34 (1H, m, H-3), 1,31 (1H, m, H-4), 0,91 (3H, d, *J* = 5,8, H-5), 0,84 (3H, d, *J* = 5,9, H-6) ; Leucine2 7,32 (1H, d, *J* = 5,5, NH), 4,10 (1H, m, H-2), 1,60 (1H, m, H-4), 1,52 (2H, m, H-3), 0,87 (3H, d, *J* = 6,3, H-5), 0,78 (3H, m, H-6) ; Leucine3 8,63 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, NH), 4,32 (1H, dd, *J* = 15,5, 7,4 Hz, H-2), 1,52 (1H, m, H-3), 1,46 (2H, m, H-3, H-4), 0,87 (3H, d, *J* = 6,3, H-5), 0,78 (3H, m, H-6) ; Isoleucine 8,42 (1H, d, *J* = 7,0, NH), 3,30 (1H, m, H-2), 2,23 (1H, m, H-4), 1,39 (1H, m, H-4), 1,01 (1H, sept, *J* = 7,3, H-3), 0,77 (3H, m, H-6), 0,62 (3H, d, *J* = 6,7, H-5) ; RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) δ Phénylalanine 171,6 (C-1), 137,3 (C-4), 129,1 (C-5), 127,9 (C-6), 126,2 (C-7), 52,8 (C-2), 38,4 (C-3) ; Leucine1 171,5 (C-1), 51,8 (C-2), 38,7 (C-3), 24,0 (C-4), 22,2 (C-5), 22,4 (C-6) ; Leucine2 171,5 (C-1), 52,2 (C-2), 40,0 (C-3), 24,3 (C-4), 23,0 (C-5), 20,7 (C-6) ; Leucine3 171,0 (C-1), 51,9 (C-2), 40,3 (C-3), 24,6 (C-4), 22,6 (C-5), 22,2 (C-6) ; Isoleucine 171,1 (C-1), 62,7 (C-2), 33,2 (C-3), 25,1 (C-4), 15,1 (C-6), 9,8 (C-5). HR-ESI-MS : 600,4111 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>33</sub>H<sub>54</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>; calc. 600,4119, err. -1,33 ppm), 1199,8179 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>66</sub>H<sub>107</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>; calc. 1199,8166, err. -1,08 ppm).

### 10.9. Etude de la souche BSNB-0536

BSNB-0536 est une souche fongique du genre *Colletotrichum*. Son extrait brut a montré une forte cytotoxicité sur les cellules MRC-5 corrélée avec la potentielle production de cytochalasines par la souche.

Une culture à grande échelle du champignon a été réalisée sur milieu gélosé PDA en ensemençant 220 boîtes de Pétri. Après trois extractions successives de la culture à l'acétate d'éthyle (AcOEt), lavage à l'eau de la phase organique et séchage, 5,4 g d'extrait brut est obtenu.

5,2 g d'extrait sont alors engagés pour un fractionnement sur chromatographie flash en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Le gradient d'éluion est un gradient par palier de 5 minutes entre l'eau et l'acétonitrile acidifiés à 0,1% d'acide formique (v/v, 95:5, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70, 20:80, 10:90 et 0:100). Six fractions ont été ainsi générées suivant la détection UV et DEDL : F1 (32,8 mg, 0,6%), F2 (4,0 g, 76,9%), F3 (329,7 mg, 6,3%), F4 (49,9 mg, 1,0%), F5 (128,0 mg, 2,5%) et F6 (28,0 mg, 0,5%). Les deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de deux fractions additionnelles : F7 (271,1 mg, 5,2%) et F8 (152,6 mg, 2,9%). Une fraction F9 (172,0 mg, 3,3%) a été formée avec l'éluion de THF dans la colonne.

Deux grammes de BSNB-0536-F2 sont fractionnés sur chromatographie flash en phase inverse sur une colonne C<sub>18</sub> de 40 g. Le gradient d'éluion est un gradient par palier de 5 minutes entre l'eau et l'acétonitriles acidifié à 0,1% d'acide formique (v/v, 80:20, 65:35, 50:50, 35:65, 20:80, 10:90 et 0:100). Treize fractions ont ainsi été générées suivant la détection UV et DEDL : F2-A (99,3 mg, 5,0%), F2-B (297,5 mg, 14,9%), F2-C (47,5 mg, 2,4%), F2-D (92,5 mg, 4,6%), F2-E (133,6 mg, 6,7%), F2-F (185,4 mg, 9,3%), F2-G (160,4 mg, 8,0%), F2-H (319,8 mg, 16,0%), F2-I (194,9 mg, 9,7%), F2-J (216,6 mg, 10,8%), F2-K (312,1 mg, 15,6%), F2-L (224,2 mg, 11,2%) et F2-M (221,0 mg, 11,0%). Deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de deux fractions additionnelles : F2-N (74,7 mg, 3,7%) et F2-O (2,7 mg, 0,1%). Une fraction F2-P (46,7 mg, 2,3%) a été formée avec l'éluion de THF dans la colonne.

138,2 mg de la fraction BSNB-0536-F2-J sont fractionnés sur chromatographie flash en phase inverse sur une colonne C<sub>18</sub> de 40 g. Le gradient d'éluion est un gradient linéaire entre l'eau et l'acétonitrile acidifié à 0,1% d'acide formique (v/v, 60:40 pendant 5 min puis de 60:40 à 0:100 en 20 min puis palier 0:100 pendant 5 min). Trois molécules ont été alors isolées d'après la détection UV et DEDL : la cytochalasine D (**21**) (40,4 mg, t<sub>R</sub> = 7,0 min), la cytochalasine C (**22**) (2,9 mg, t<sub>R</sub> = 10,2 min) et l'hirsutatine A (**23**) (21,5 mg, t<sub>R</sub> = 12,8 min).

**Cytochalasine D (21)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -40 (c 0,33 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7,30 (2H, m, **H-3'**), 7,23 (1H, m, **H-4'**), 7,18 (2H, m, **H-2'**), 5,98 (1H, dd, J = 15,9, 2,6, **H-20**), 5,55 (1H, dd, J = 15,9, 10,0, **H-13**), 5,42 (1H, t, J = 2,5, **H-21**), 5,27 (1H, m, **H-14**), 5,24 (1H, dd, J = 15,9, 2,4, **H-19**), 5,17 (1H, s, **H-12**), 4,98 (1H, s, **H-12**), 3,75 (1H, d, J = 10,2, **H-7**), 3,28 (1H, m, **H-3**), 2,86 (1H, m, **H-10**), 2,83 (1H, m, **H-8**), 2,81 (1H, m, **H-16**), 2,71 (1H, dd, J = 13,3, 7,8, **H-10**), 2,62 (1H, m, **H-5**), 2,37 (1H, m, **H-15**), 2,29 (3H, s, **H-25**), 2,17 (1H, dd, J = 4,0, 2,6, **H-4**), 2,00 (1H, m, **H-15**), 1,48 (3H, s, **H-23**), 1,14 (3H, d, J = 6,8, **H-22**), 0,56 (3H, d, J = 6,8, **H-11**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 211,7 (**C-17**), 176,5 (**C-1**), 171,8 (**C-24**), 150,9 (**C-6**), 138,4 (**C-1'**), 134,4 (**C-14**), 133,4 (**C-20**), 131,8 (**C-13**), 130,9 (**C-2'**, **C-6'**), 129,6 (**C-3'**, **C-5'**), 128,9 (**C-19**), 127,9 (**C-4'**), 113,7 (**C-12**), 79,3 (**C-9**), 78,2 (**C-21**), 72,3 (**C-7**), 54,9 (**C-3**), 49,7 (**C-4**), 47,8 (**C-8**), 44,9 (**C-10**), 43,4 (**C-16**), 39,4 (**C-15**), 33,4 (**C-5**), 24,6 (**C-23**), 20,6 (**C-25**), 19,7 (**C-22**), 13,5 (**C-11**). HR-ESI-MS : 508,2681 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>; calc. 508,2694, err. -2,58 ppm), 530,2490 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 530,2513, err. -4,34 ppm), 1015,5299 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>60</sub>H<sub>65</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup>; calc. 1015,5315, err. -1,58 ppm).

**Cytochalasine C (22)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -16 (c 0,33 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7,31 (2H, m, **H-3'**, **H-5'**), 7,24 (1H, m, **H-4'**), 7,23 (2H, m, **H-2'**, **H-6'**), 5,95 (1H, dd, J = 15,7, 2,3, **H-20**), 5,87 (1H, t, J = 2,2, **H-21**), 5,72 (1H, dd, J = 10,2, 15,7, **H-13**), 5,28 (1H, dd, J = 15,8, 2,3, **H-19**), 5,26 (1H, m, **H-14**), 3,72 (1H, d, J = 9,3, **H-7**), 3,31 (1H, m, **H-3**), 3,03 (1H, dd, J = 13,3, 5,2, **H-10**), 2,87 (1H, dd, J = 13,3, 9,9, **H-10**), 2,83 (1H, m, **H-16**), 2,47 (2H, m, **H-4**, **H-9**), 2,40 (1H, q, J = 11,0, **H-15**), 2,30 (3H, s, **H-25**), 2,01 (1H, m, **H-15**), 1,60 (3H, s, **H-23**), 1,50 (3H, s, **H-11**), 1,15 (3H, d, J = 6,8, **H-22**), 1,04 (3H, s, **H-11**). RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 211,6 (**C-17**), 176,9 (**C-1**), 172,0 (**C-24**), 139,0 (**C-1'**), 134,2 (**C-14**), 134,2 (**C-6**), 133,1 (**C-20**), 132,1 (**C-13**), 130,7 (**C-2'**, **C-6'**), 129,8 (**C-3'**, **C-5'**), 129,3 (**C-19**), 127,9 (**C-4'**), 127,9 (**C-5**), 79,4 (**C-18**), 76,7 (**C-21**), 70,1 (**C-7**), 60,2 (**C-3**), 54,8 (**C-9**), 50,5 (**C-8**), 50,3 (**C-4**), 44,9 (**C-10**), 43,4 (**C-16**), 39,5 (**C-15**), 24,6 (**C-23**), 20,7 (**C-25**), 19,8 (**C-22**), 17,1 (**C-12**), 14,5 (**C-11**). HR-ESI-MS : 508,2681 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>; calc. 508,2694, err. -2,58 ppm), 530,2490 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 530,2513, err. -4,38 ppm), 1015,5299 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>60</sub>H<sub>65</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup>; calc. 1015,5315, err. -1,58 ppm).

**Hirsutatine A (23)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -63 (c 0,2 g/100mL, CH<sub>3</sub>OH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ Phénylalanine 7,27 (5H, m, **H-5**, **H-6**, **H-7**, **H-8**, **H-9**), 5,20 (1H, dd, J = 8,8, 4,9, **H-2**), 3,05 (1H, m, **H-3**), 2,96 (1H, dd, J = 13,2, 4,9, **H-3**) ; N-MéthylLeucine 3,61 (1H, t, J = 7,8, **H-2**), 3,07 (3H, s, **N-Me**), 1,73 (2H, m, **H-3**), 1,31 (1H, hept, J = 6,6, **H-4**), 0,93 (3H, d, J = 6,7, **H-6**), 0,87 (3H, d, J = 6,6, **H-5**) ; Thréonine 4,46 (1H, ddd, J = 12,9, 6,4, 1,7, **H-3**), 4,19 (1H, d, J = 1,7, **H-2**), 1,23 (3H, d, J = 6,4, **H-4**) ; Serine 4,83 (1H, m, **H-2**), 4,25 (1H, dd, J = 11,4, 3,3, **H-3**), 3,98 (1H, dd, J = 11,4, 2,5, **H-3**) ;

acide 2-hydroxyisovalérique 4,62 (1H, d,  $J = 5,7$ , **H-2**), 2,20 (1H, oct,  $J = 6,7$ , **H-3**), 1,06 (3H, d,  $J = 6,7$ , **H-5**), 1,04 (3H, d,  $J = 6,7$ , **H-4**) ; acide 2-hydroxyisocaproïque 5,26 (1H, dd,  $J = 9,6, 4,0$ , **H-2**), 1,73 (1H, m, **H-3**), 1,41 (1H, ddd,  $J = 14,0, 9,1, 4,0$ , **H-3**), 1,61 (1H, m, **H-4**), 0,93 (3H, d,  $J = 6,7$ , **H-5**), 0,90 (3H, d,  $J = 6,6$ , **H-6**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ Phénylalanine 172,7 (**C-1**), 137,5 (**C-4**), 130,8, (**C-5, C-9**), 129,6, (**C-6, C-8**), 128,1 (**C-7**), 52,3 (**C-2**), 39,8 (**C-3**) ; *N*-MéthylLeucine 172,7 (**C-1**), 67,4 (**C-2**), 40,5 (**N-Me**), 38,1 (**C-3**), 26,0 (**C-4**), 23,5 (**C-5**), 22,3 (**C-6**) ; Thréonine 173,5 (**C-1**), 67,1 (**C-3**), 61,0 (**C-2**), 21,1 (**C-4**) ; Serine 171,7 (**C-1**), 63,8 (**C-3**), 55,3 (**C-2**) ; 2-acide hydroxyisovalérique 169,7 (**C-1**), 80,3 (**C-2**), 31,4 (**C-3**), 18,8 (**C-4**), 18,2 (**C-5**) ; acide 2-hydroxyisocaproïque 171,9 (**C-1**), 74,7 (**C-2**), 42,6 (**C-3**), 25,5 (**C-4**), 23,4 (**C-5**), 21,8 (**C-6**). HR-ESI-MS : 677,3734 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>; calc. 677,3756, err. -3,25 ppm), 699,3550 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>10</sub><sup>+</sup>; calc. 699,3576, err. -3,72), 1353,7488 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>68</sub>H<sub>105</sub>N<sub>8</sub>O<sub>20</sub><sup>+</sup>; calc. 1353,7440, err. 3,55 ppm).

### 10.10. Etude de la souche BSNB-0583

BSNB-0583 est une souche fongique du genre *Colletotrichum*. Son extrait brut a montré une forte cytotoxicité sur les cellules MRC-5 corrélée avec une diversité chimique intéressante.

Une culture à grande échelle du champignon a été réalisée sur milieu gélosé PDA en ensemençant 232 boîtes de Pétri. Après trois extractions successives de la culture à l'acétate d'éthyle (AcOEt), lavage à l'eau de la phase organique et séchage, 1,5 g d'extrait brut est obtenu.

1,4 g d'extrait sont alors engagés pour un fractionnement sur chromatographie flash en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>. Le gradient d'éluion est un gradient par palier de 5 minutes entre l'eau et l'acétonitrile acidifiés à 0,1% d'acide formique (v/v, 95:5, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70, 20:80, 10:90 et 0:100). Douze fractions ont été ainsi générées suivant la détection UV et DEDL : F1 (16,7 mg, 1,2%), F2 (31,7 mg, 2,3%), F3 (74,7 mg, 5,3%), F4 (96,5 mg, 6,9%), F5 (29,8 mg, 2,1%), F6 (42,6 mg, 3,0%), F7 (35,9, 2,6%), F8 (27,3 mg, 2,0%), F9 (64,0 mg, 4,6%), F10 (16,7 mg, 1,2%), F11 (161,0 mg, 11,5%) et F12 (7,6 mg, 0,5%). Les deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de deux fractions additionnelles : F13 (430,4 mg, 30,7%) et F14 (172,1 mg, 12,3%). Une fraction F15 (77,5 mg, 5,5%) a été formée avec l'éluion de THF dans la colonne.

Les fractions BSNB-0583-F5 et BSNB-0583-F6 sont purifiées par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub> ; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF ; éluion par gradient isocratique 50:50 pour F5 et 45:55 pour F6 ; débit 21 mL/min) pour isoler quatre molécules : deux de F6 nommées colletamide A (**24**) (1,7 mg, t<sub>R</sub> = 12,0 min) et colletamide B (**25**) (3,5 mg, t<sub>R</sub> = 13,8 min) et deux de F5 nommées colletamide C (**26**) (1,5 mg, t<sub>R</sub> = 12,8 min) et colletamide D (**27**) (0,6 mg, t<sub>R</sub> = 14,5 min).

**Colletamide A (24)** (2*E*,8*E*)-*N*-[(1*S*,2'*R*,2*R*,4'*R*,4*R*,7*S*)-dihydro-5',6-dioxospiro-(3,8-dioxatricyclo(5.1.0.0<sup>2,4</sup>)octane-5,2'-(3'*H*)-furan-4'-yl)]-deca-2,8-dienamide: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -3 (c 0,1 g/100mL, CH<sub>3</sub>OH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6,82 (1H, dt,  $J = 15,2, 7,1$ , **H-3**), 5,93 (1H, d,  $J = 15,3$ , **H-2**), 5,42 (2H, m, **H-8, H-9**), 4,34 (1H, t,  $J = 10,1$ , **H-2'**), 4,15 (1H, dd,  $J = 3,6, 1,8$ , **H-7'**), 4,00 (1H, dd,  $J = 3,9, 2,0$ , **H-8'**), 3,66 (1H, d,  $J = 4,3$ , **H-9'**), 3,62 (1H, d,  $J = 4,3$ , **H-6'**), 2,83 (1H, dd,  $J = 13,7, 9,5$ , **H-3'**), 2,53 (1H, dd,  $J = 13,7, 11,0$ , **H-3'**), 2,22 (2H, m, **H-4**), 2,00 (2H, m, **H-7**), 1,63 (3H, d,  $J = 4,3$ , **H-10**), 1,47 (2H, m, **H-5**), 1,39 (2H, m, **H-6**); RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 198,9 (**C-5'**), 175,0 (**C-1'**), 168,5 (**C-1**), 147,5 (**C-3**), 132,2 (**C-8**), 126,0 (**C-9**), 123,6 (**C-2**), 84,6 (**C-4'**), 59,0 (**C-7'**), 57,2 (**C-9'**), 56,5 (**C-6'**), 53,8 (**C-8'**), 49,2 (**C-2'**), 34,2 (**C-3'**), 33,3 (**C-7**), 32,9 (**C-4**), 30,2 (**C-6**), 28,8 (**C-5**), 18,1 (**C-10**). HR-ESI-MS : 362,1621 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>; calc. 362,1598, err. 6,35 ppm),

425,1692 ([M+ACN+Na]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 425,1683, err. 2,12 ppm), 745,2950 ([2M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 745,2953, err. -0,40 ppm).

**Colletamide B (25)** (2*E*,8*E*)-*N*-[1-(4-hydroxy-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)-2-phenylethyl]deca-2,8-dienamide: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -24 (c 0,1 g/100mL, CH<sub>3</sub>OH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7,26 (2H, m, **H-9'**), 7,25 (2H, m, **H-8'**), 7,18 (1H, m, **H-10'**), 6,72 (1H, dt, *J* = 15,1, 7,0, **H-3**), 5,88 (1H, d, *J* = 15,1, **H-2**), 5,41 (2H, m, **H-8**, **H-9**), 4,71 (1H, ddd, *J* = 8,3, 4,3, 2,9, **H-4'**), 4,40 (1H, ddd, *J* = 9,3, 7,3, 2,8, **H-5'**), 4,32 (1H, dd, *J* = 8,2, 7,1, **H-2'**), 2,99 (1H, dd, *J* = 14,0, 6,1, **H-6'**), 2,85 (1H, dd, *J* = 14,0, 9,3, **H-6'**), 2,41 (1H, ddd, *J* = 13,7, 8,6, 4,3, **H-3'**), 2,17 (3H, m, **H-3'**, **H-4'**), 1,98 (2H, m, **H-7**), 1,63 (3H, d, *J* = 4,1, **H-10**), 1,43 (2H, m, **H-5**), 1,35 (2H, m, **H-6**); RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  178,4 (**C-1'**), 169,0 (**C-1**), 146,8 (**C-3**), 139,0 (**C-7'**), 132,2 (**C-8**), 130,2 (**C-8'**), 129,5 (**C-9'**), 127,6 (**C-10'**), 126,0 (**C-9**), 124,0 (**C-2**), 80,7 (**C-4'**), 68,0 (**C-2'**), 54,7 (**C-5'**), 38,6 (**C-6'**), 34,6 (**C-3'**), 33,3 (**C-7**), 32,9 (**C-4**), 30,1 (**C-6**), 28,8 (**C-5**), 18,1 (**C-10**). HR-ESI-MS : 372,2182 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 372,2169, err. 3,49 ppm), 394,1998 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 394,1989, err. 2,28 ppm), 743,4272 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>44</sub>H<sub>59</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>; calc. 743,4266, err. 0,81 ppm).

**Colletamide C (26)** (S)-2-[(2*E*,8*E*)-deca-2,8-dienamido]-3-(2-hydroxyphenyl)propionic acid: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -8 (c 0,1 g/100mL, CH<sub>3</sub>OH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7,08 (1H, dd, *J* = 7,5, 1,2, **H-9'**), 7,03 (1H, td, *J* = 7,6, 1,2, **H-7'**), 6,75 (1H, d, *J* = 7,6, **H-6'**), 6,74 (1H, t, *J* = 7,5, **H-8'**), 6,69 (1H, dt, *J* = 15,2, 7,0, **H-3**), 5,89 (1H, d, *J* = 15,3, **H-2**), 5,41 (2H, m, **H-8**, **H-9**), 4,67 (1H, dd, *J* = 8,7, 5,2, **H-2'**), 3,21 (1H, dd, *J* = 13,9, 5,0, **H-3'**), 2,98 (1H, dd, *J* = 13,9, 8,9, **H-3'**), 2,17 (2H, ddd, *J* = 14,0, 7,3, 1,2, **H-4**), 1,99 (2H, m, **H-7**), 1,63 (3H, d, *J* = 3,7, **H-7**), 1,44 (2H, m, **H-5**), 1,37 (2H, m, **H-6**); RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  176,9 (**C-1'**), 168,4 (**C-1**), 156,7 (**C-5'**), 145,7 (**C-3**), 132,3 (**C-8**), 132,2 (**C-9'**), 128,9 (**C-7'**), 125,9 (**C-9**), 125,4 (**C-4'**), 124,7 (**C-2**), 120,5 (**C-8'**), 116,2 (**C-6'**), 55,6 (**C-2'**), 33,6 (**C-3'**), 33,4 (**C-7**), 32,9 (**C-4**), 30,2 (**C-6**), 28,9 (**C-5**), 18,1 (**C-10**). HR-ESI-MS : 332,1859 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 332,1856, err. 0,90 ppm), 395,1948 ([M+ACN+Na]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 395,1941, err. 1,77 ppm), 663,3648 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>38</sub>H<sub>51</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>; calc. 663,3640, err. 1,21 ppm).

**Colletamide D (27)** 4-[(2*E*,8*E*)-deca-2,8-dienamido]-3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid : [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> -5 (c 0,1 g/100mL, CH<sub>3</sub>OH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7,25 (2H, m, **H-7'**), 7,23 (2H, m, **H-8'**), 7,14 (1H, m, **H-9'**), 6,68 (1H, dt, *J* = 15,3, 7,0, **H-3**), 5,94 (1H, d, *J* = 15,4, **H-2**), 5,42 (2H, m, **H-8**, **H-9**), 4,14 (1H, m, **H-4'**), 4,02 (1H, m, **H-3'**), 2,97 (1H, dd, *J* = 13,4, 6,4, **H-5'**), 2,81 (1H, dd, *J* = 13,4, 8,4, **H-5'**), 2,30 (2H, m, **H-2'**), 2,16 (2H, m, **H-4**), 1,99 (2H, m, **H-7**), 1,63 (3H, d, *J* = 4,0, **H-10**), 1,44 (2H, m, **H-5**), 1,34 (2H, m, **H-6**). RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  179,7 (**C-1'**), 168,6 (**C-1**), 145,7 (**C-3**), 140,2 (**C-6'**), 132,2 (**C-8**), 130,3 (**C-7'**), 129,3 (**C-8'**), 127,2 (**C-9'**), 126,0 (**C-9**), 124,7 (**C-2**), 70,1 (**C-3'**), 56,3 (**C-4'**), 41,6 (**C-2'**), 38,3 (**C-5'**), 33,4 (**C-7**), 32,9 (**C-4**), 30,2 (**C-6**), 28,9 (**C-5**), 18,1 (**C-10**). HR-ESI-MS : 360,2170 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 360,2169, err. 0,28 ppm), 382,1995 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 382,1989, err. 1,57 ppm), 719,4293 ([2M+H]<sup>+</sup>, C<sub>42</sub>H<sub>59</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>; calc. 719,4266, err. 3,75 ppm).

### 10.11. Etude de la compétition entre BSNB-0294 et *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*

Il a été montré *in vitro* que BSNB-0294 avait une activité antifongique contre *F. oxysporum* lors de l'observation de co-cultures entre les deux champignons.

Une co-culture à grande échelle a été réalisée sur milieu gélosé PDA en ensemençant 330 boîtes de Pétri. A l'issue de trois semaines de culture à 28°C, la co-culture est mise à macérer dans de l'acétate d'éthyle (AcOEt), en séparant le côté où a poussé le champignon endophyte du côté où a poussé le phytopathogène. Après trois extractions successives de chaque champignon, lavage à l'eau de la phase organique et séchage, un extrait brut de 3,53 g est obtenu pour BSNB-0294 et de 2,63 g pour *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (FOCIC).

Un fractionnement sur flash chromatographie en phase inverse a été mené sur chaque extrait brut, suivant un gradient d'élution par palier de 5 minutes entre l'eau et l'acétonitrile acidifiés à 0,1% d'acide formique (v/v, 95:5, 75:25, 50:50, 20:80 et 0:100). Le fractionnement de 3,5 g d'extrait de BSNB-0294 a permis de générer sept fractions suivant la détection UV et DEDL : F1 (8,2 mg, 0,2%), F2 (45,3 mg, 1,3%), F3 (102,9 mg, 2,9%), F4 (18,4 mg, 0,5%), F5 (718,2 mg, 20,5%), F6 (70,9 mg, 2,0%) et F6-1 (93,0 mg, 2,7%). Les deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de deux fractions additionnelles : F7 (953,7 mg, 27,2%) et F8 (765,8 mg, 21,9%). Une fraction F9 (449,4 mg, 12,8%) a été formée avec l'élution de THF dans la colonne.

Le fractionnement de 2,5 g d'extrait de FOCIC a permis de générer onze fractions suivant la détection UV et DEDL : F1 (3,5 mg, 0,1%), F2 (11,3 mg, 0,5%), F3 (100,8 mg, 4,0%), F4 (152,5 mg, 6,1%), F5 (47,9 mg, 1,9%), F6 (33,5 mg, 1,3%), F7 (125,3 mg, 5,0%), F8 (148,7 mg, 5,9%), F9 (354,0 mg, 14,2%), F10 (60,1 mg, 2,4%) et F11 (165,2 mg, 6,6%). Les deux rinçages de la colonne ACN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50:50, v/v) et CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% ont abouti à la formation de deux fractions additionnelles : F12 (453,3 mg, 18,1%) et F13 (338,3 mg, 13,5%). Une fraction F14 (241,5 mg, 9,7%) a été formée avec l'élution de THF dans la colonne.

BSNB-0294-F2 est purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; gradient linéaire : palier de 90:10 pendant 4 min puis de 90:10 à 80:20 en 21 min ; débit 21 mL/min) pour isoler une molécule : la 3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphtalen-1(2*H*)-one (**29**) (3,6 mg, t<sub>R</sub>= 21 min).

BSNB-0294-F3 est purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; gradient linéaire : palier de 65:25 pendant 8 min puis de 65:25 à 55:45 en 21 min ; débit 21 mL/min). Sept molécules ont été isolés et identifiées : la (+)-(4*S*)-4,8-dihydroxy- $\alpha$ -tetralone (**28**) (2,1 mg, t<sub>R</sub>= 11,7 min), la 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanamide (**30**) (3,2 mg, 14,0 min), l'acide 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanoïque (**32**) (2,5 mg, 17,5 min), la 2-nitro-3-phénylpropanamide (**31**) (3,0 mg, 20,3 min), la 2,4-dibenzyl-2-carbamoyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole 3-oxide (**33**) (4,5 mg, 21,8 min), la 2,4-dibenzyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole-2-carboxamide (**34**) (1,6 mg, 24,8 min) et la 2,4-dibenzyl-*N*-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole-2-carboxamide (**35**) (3,2 mg, 26,0 min).

180 mg de BSNB-0294-F5 sont purifiés par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF; gradient isocratique 60:40 ; débit 21 mL/min). La molécule majoritaire de l'extrait est ainsi isolée et nommée xylariacéine A (**36**) (28,4 mg, t<sub>R</sub>= 17-19 min). D'autres molécules ont pu être isolées mais seule la xylariacéine B (1,2 mg, t<sub>R</sub>= 9,1 min) a été prédite par la suite d'après le spectre RMN-<sup>1</sup>H, la mesure de la masse haute résolution et la fragmentation MS/MS.

Environ 350 mg de fraction BSNB-0294C-F5 sont fractionnés par flash chromatographie en phase inverse sur une colonne de 12 g. Le gradient d'élution s'est fait par des paliers de 3 min entre l'eau et l'acétonitrile acidifiés à 0,1% d'acide formique (v/v, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 20:80 et 0:100). Neuf fractions ont été générées suivant la détection UV et DEDL : F5-F1 (7,1 mg, 0,2%), F5-F2 (6,4 mg, 0,18%), F5-F3 (6,8 mg, 0,19%), F5-F4 (10,2 mg, 0,29%), F5-F5 (228,1 mg, 6,5%), F5-F6 (12,3 mg, 0,35%), F5-F7 (5,6 mg, 0,16%), F5-F8 (4,4 mg, 0,13%) et F5-F9 (3,2 mg, 0,09%).

BSNB-0294-F6 est purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub>; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1% AF/ACN+0,1% AF; gradient linéaire : palier de 25:75 pendant 4 min puis de 25:75 à 0:100 en 21 min ; débit 21 mL/min). Le peptide majoritaire de F5 (xylariacéine A (**36**)) est à

nouveau isolé (1,9 mg,  $t_R$  = 6,7 min) ainsi que plusieurs esters de propylène-glycol d'acides gras dont le 1-linoléoyl glycérol (**38**) est le seul à avoir été isolé pur et identifié (2,6 mg,  $t_R$  = 18 min).

La fraction BSNB-0294-F6-1 s'est révélée pure et a permis l'identification de l'acide linoléique (**39**).

FOCIC-F7 est purifiée par HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub> ; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF ; gradient linéaire : palier de 50:50 pendant 12 min puis de 50:50 à 0:100 en 13 min puis 0:100 de 5 min ; débit 21 mL/min). Trois molécules pures sont isolées de cette purification : la bassiatine (**40**) (5,8 mg,  $t_R$  = 9,5 min), la focicine (**42**) (9,1 mg,  $t_R$  = 19 min) et la xylariacéine A (**36**). La collecte du signal entre  $t_R$  = 10,5 et 11 min (19,5 mg) est à nouveau purifiée sur HPLC préparative (Luca C<sub>18</sub> ; phase mobile H<sub>2</sub>O+0,1%AF/ACN+0,1%AF ; gradient isocratique 60:40 pendant 25 min ; débit 21 mL/min) pour isoler le (-)-cyclonerodiol (**41**) (7,1 mg,  $t_R$  = 22 min).

**(+)-(4S)-4,8-dihydroxy- $\alpha$ -tétralone (28)** :  $[\alpha]_D^{20}$  +2,7 (c 0,15 g/100mL, EtOH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  12,43 (1H, s, OH), 7,52 (1H, t,  $J$  = 7,9, H-6), 7,07 (1H, d,  $J$  = 7,4, H-5), 6,85 (1H, d,  $J$  = 8,1, H-7), 4,83 (1H, q,  $J$  = 3,8, H-4), 2,86 (1H, ddd,  $J$  = 17,8, 7,0, 4,6, H-2), 2,65 (1H, ddd,  $J$  = 17,8, 9,8, 4,9, H-2), 2,28 (1H, m, H-3), 2,07 (1H, m, H-3) ; RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  205,0 (C-1), 163,2 (C-8), 148,1 (C-4a), 137,7 (C-6), 118,4 (C-5), 117,3 (C-7, C-8a), 67,7 (C-4), 35,9 (C-2), 32,2 (C-3). HR-ESI-MS : 179,0694 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 179,0703, err. -5,03 ppm).

**3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphtalen-1(2H)-one (29)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7,53 (1H, t,  $J$  = 8,0, H-6), 7,11 (1H, d,  $J$  = 7,6, H-5), 6,86 (1H, d,  $J$  = 8,2, H-7), 4,84 (1H, m, H-4), 4,28 (1H, m, H-3), 2,97 (1H, dd,  $J$  = 17,2, 7,2, H-2), 2,87 (1H, dd,  $J$  = 17,3, 3,8, H-2) ; RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  203,1 (C-1), 163,2 (C-8), 145,7 (C-4a), 137,9 (C-6), 120,1 (C-5), 117,9 (C-7), 116,5 (C-8a), 71,3 (C-4), 70,3 (C-3), 43,9 (C-2). HR-ESI-MS : 195,0671 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 195,0652, err. 9,74 ppm), 236,0938 ([M+ACN+H]<sup>+</sup>, C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 236,0917, err. 8,89 ppm).

**2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanamide (30)** : RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  9,58 (1H, s, OH), 7,27 (2H, m, H-6), 7,25 (2H, m, H-7), 7,19 (1H, m, H-8), 6,71 (1H, s, NH-1), 5,74 (1H, s, NH-1), 3,87 (2H, s, H-4) ; RMN-<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>CN, 600 MHz)  $\delta$  165,9 (C-2), 153,6 (C-3), 138,0 (C-5), 129,8 (C-6), 129,4 (C-7), 127,2 (C-8), 29,5 (C-4) ; RMN-<sup>15</sup>N (CD<sub>3</sub>CN, 600 MHz)  $\delta$  373,5 (N-OH), 92,0 (NH<sub>2</sub>). HR-ESI-MS :  $m/z$  179,0816 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 179,0815, err. 0,56 ppm), 201,0654 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 201,0634, err. 9,95 ppm),  $m/z$  242,0914 ([M+ACN+H]<sup>+</sup>, C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 242,0900, err. 5,78 ppm).

**2-nitro-3-phénylpropanamide (31)** :  $[\alpha]_D^{20}$  -16 (c 0,1 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  7,25 (2H, m, H-7), 7,21 (3H, m, H-6, H-8), 6,49 (1H, s, NH-1), 6,07 (1H, s, NH-1), 5,35 (1H, dd,  $J$  = 8,5, 6,8, H-3), 3,41 (1H, dd,  $J$  = 14,2, 8,7, H-4), 3,29 (1H, dd,  $J$  = 14,3, 6,6, H-4) ; RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  166,0 (C-2), 136,1 (C-5), 130,0 (C-6), 129,7 (C-7), 128,3 (C-8), 90,5 (C-3), 36,7 (C-4) ; RMN-<sup>15</sup>N (CD<sub>3</sub>CN, 600 MHz)  $\delta$  103,5 (NH<sub>2</sub>), 79,8 (NO<sub>2</sub>). HR-ESI-MS :  $m/z$  195,0771 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 195,0764, err. 4,10 ppm).

**Acide 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanoïque (32)** :  $[\alpha]_D^{20}$  11 (c 0,1 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  7,29-7,28 (4H, m, H-6, H-7), 7,21 (1H, m, H-8), 3,88 (2H, s, H-4) ; RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  164,7 (C-2), 151,7 (C-3), 137,4 (C-5), 129,7 (C-6), 129,4 (C-7), 127,4 (C-8), 30,6 (C-4). HR-ESI-MS :  $m/z$  180,0659 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 180,0655, err. 2,22 ppm),  $m/z$  221,0946 ([M+ACN+H]<sup>+</sup>, C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 221,0921, err. 11,30 ppm).

**2,4-dibenzyl-2-carbamoyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-imidazole 3-oxide (33)** :  $[\alpha]_D^{20}$  -5,7 (c 1,0 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  7,79 (1H, s, NH-1), 7,50 (1H, s, NH-1'), 7,20 (4H, m, H-7, H-8, H-8'), 7,10 (2H, m, H-7'), 7,06 (2H, m, H-6'), 6,92 (1H, m, H-6), 6,34 (1H, s, NH-1'), 3,68 (1H, d,  $J$  = 14,6, H-4), 3,59 (1H, d,  $J$  = 14,4, H-4'), 3,54 (1H, d,  $J$  = 14,8, H-4), 3,31 (1H, d,  $J$  = 14,5,

**H-4'**) ; RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 166,8 (**C-2'**), 164,0 (**C-2**), 139,5 (**C-3**), 135,4 (**C-5**), 132,3 (**C-5'**), 131,3 (**C-6'**), 129,6 (**C-7**), 129,5 (**C-6**), 129,2 (**C-7'**), 128,7 (**C-8'**), 127,8 (**C-8**), 88,9 (**C-3'**), 41,5 (**C-4'**), 28,4 (**C-4**) ; RMN-<sup>15</sup>N (600 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 304,7 (**N<sup>+</sup>-O**), 113,9 (**NH**), 96,7 (**NH<sub>2</sub>**). HR-ESI-MS : *m/z* 324,1345 ([**M+H**]<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 324,1343, err. 0,62 ppm), *m/z* 647,2586 ([**2M+H**]<sup>+</sup>, C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>; calc. 647,2613, err. -4,17 ppm).

**2,4-dibenzyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-imidazole-2-carboxamide (34)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +0,5 (c 1,0 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 8,26 (1H, s, **NH-1**), 7,28 (2H, m, **H-7**), 7,24 (1H, m, **H-8**), 7,22 (1H, m, **H-8'**), 7,19 (2H, m, **H-7'**), 7,05 (2H, m, **H-6'**), 7,04 (2H, m, **H-6**), 6,39 (1H, s, **NH-1'**), 6,11 (1H, s, **NH-1'**), 3,69 (1H, d, *J* = 15,7, **H-4**), 3,66 (1H, d, *J* = 15,9, **H-4**), 3,42 (1H, d, *J* = 13,8, **H-4'**), 3,27 (1H, d, *J* = 13,7, **H-4'**) ; RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 171,1 (**C-2**), 170,8 (**C-2'**), 165,4 (**C-3**), 136,3 (**C-5**), 134,2 (**C-5'**), 132,0 (**C-6'**), 130,1 (**C-6**), 129,4 (**C-7**), 128,8 (**C-7'**), 128,0 (**C-8'**), 127,6 (**C-8**), 87,4 (**C-3'**), 43,0 (**C-4'**), 34,9 (**C-4**) ; RMN-<sup>15</sup>N (600 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 136,7 (**N**), 136,0 (**NH**), 99,5 (**NH<sub>2</sub>**). HR-ESI-MS : *m/z* 308,1407 ([**M+H**]<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 308,1394, err. 4,21 ppm), *m/z* 615,2739 ([**2M+H**]<sup>+</sup>, C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 615,2714, err. 4,06 ppm).

**2,4-dibenzyl-N-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1H-imidazole-2-carboxamide (35)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +2,1 (c 1,0 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 7,26 (2H, m, **H-7**), 7,23 (1H, m, **H-8**), 7,21 (1H, m, **H-8'**), 7,18 (2H, m, **H-7'**), 7,04 (2H, m, **H-6**), 7,03 (2H, m, **H-6'**), 3,68 (2H, s, **H-4**), 3,41 (1H, d, *J* = 13,4, **H-4'**), 3,28 (1H, d, *J* = 13,5, **H-4'**) ; RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 171,6 (**C-2**), 166,1 (**C-2'**), 165,3 (**C-3**), 136,2 (**C-5**), 133,9 (**C-5'**), 132,0 (**C-6'**), 130,2 (**C-6**), 129,4 (**C-7**), 128,8 (**C-7'**), 128,0 (**C-8'**), 127,6 (**C-8**), 86,8 (**C-3'**), 43,0 (**C-4'**), 34,9 (**C-4**). HR-ESI-MS : *m/z* 324,1342 ([**M+H**]<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 324,1343, err. -0,31 ppm), *m/z* 647,2625 ([**2M+H**]<sup>+</sup>, C<sub>36</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup>; calc. 647,2613, err. 1,85 ppm).

**Xylariacéine A (36)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : δ Acide leucique 5,05 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,1, **H-2**), 1,71 (1H, m, **H-4**), 1,61 (1H, m, **H-3**), 1,32 (1H, m, **H-3**), 0,92 (3H, m, **H-5**), 0,88 (3H, d, *J* = 6,9, **H-6**) ; *N*-Méthylalanine (NMeAla) 3,95 (1H, q, *J* = 6,7, **H-2**), 3,11 (3H, s, **N-CH<sub>3</sub>**), 1,47 (3H, d, *J* = 6,7, **H-3**) ; *N*-Méthylleucine (NMeLeu) 5,01 (1H, dd, *J* = 11,4, 2,0, **H-2**), 2,89 (3H, s, **N-CH<sub>3</sub>**), 2,69 (1H, td, *J* = 12,3, 2,4, **H-3**), 1,50 (1H, m, **H-4**), 0,92 (3H, m, **H-6**), 0,80 (3H, d, *J* = 6,6, **H-5**) ; *N*-Méthylvaline1 (NMeVal 1) 4,94 (1H, m, **H-2**), 2,91 (3H, s, **N-CH<sub>3</sub>**), 2,38 (1H, m, **H-3**), 1,06 (3H, d, *J* = 6,6, **H-4**), 0,82 (3H, d, *J* = 6,9, **H-5**) ; *N*-Methylvaline2 (NMeVal 2) 5,22 (1H, d, *J* = 10,8, **H-2**), 3,14 (3H, s, **N-CH<sub>3</sub>**), 2,38 (1H, m, **H-3**), 0,68 (3H, d, *J* = 7,0, **H-4**), 0,60 (3H, d, *J* = 6,5, **H-5**) ; Valine1 (Val1) 8,02 (1H, d, *J* = 9,3, **NH**), 4,63 (1H, t, *J* = 10,1, **H-2**), 2,56 (1H, dq, *J* = 17,0, 6,7, **H-3**), 0,95 (3H, d, *J* = 6,7, **H-4**), 0,86 (3H, d, *J* = 6,7, **H-4**) ; *N*-Méthylthreonine1 (NMeThr1) 4,94 (1H, m, **H-2**), 4,11 (1H, dq, *J* = 10,1, 5,9, **H-3**), 2,79 (3H, s, **N-CH<sub>3</sub>**), 1,14 (3H, d, *J* = 5,9, **H-4**) ; Serine (Ser) 8,14 (1H, s, **NH**), 4,96 (1H, m, **H-2**), 3,82 (2H, d, *J* = 5,9, **H-3**) ; *N*-Méthylthreonine2 (NMeThr2) 4,35 (1H, t, *J* = 5,8, **H-3**), 4,01 (1H, d, *J* = 4,7, **H-2**), 3,04 (3H, s, **N-CH<sub>3</sub>**), 1,17 (3H, d, *J* = 6,4, **H-4**) ; Valine2 (Val2) 8,94 (1H, d, *J* = 10,2, **NH**), 4,55 (1H, d, *J* = 10,1, **H-2**), 1,98 (1H, m, **H-3**), 0,91 (6H, m, **H-4**, **H-5**) ; Proline (Pro) 4,93 (1H, m, **H-2**), 3,95 (1H, m, **H-5**), 3,74 (1H, t, 6,8, **H-5**), 2,10 (1H, m, **H-3**), 2,08 (1H, m, **H-4**), 1,90 (1H, m, **H-3**), 1,87 (1H, m, **H-4**) ; Valine3 (Val3) 7,89 (1H, d, *J* = 9,0, **NH**), 4,59 (1H, d, *J* = 9,3, **H-2**), 2,43 (1H, m, **H-3**), 1,10 (3H, d, *J* = 6,7, **H-4**), 1,00 (3H, d, *J* = 6,4, **H-5**) ; RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ Acide leucique 172,2 (**C-1**), 74,6 (**C-2**), 42,3 (**C-3**), 26,1 (**C-4**), 23,6 (**C-5**), 21,5 (**C-6**) ; *N*-Méthylalanine (NMeAla) 171,3 (**C-1**), 60,5 (**C-2**), 36,0 (**N-CH<sub>3</sub>**), 14,0 (**C-3**) ; *N*-Méthylleucine (NMeLeu) 171,3 (**C-1**), 57,7 (**C-2**), 37,7 (**C-3**), 32,7 (**N-CH<sub>3</sub>**), 26,8 (**C-4**), 24,4 (**C-5**), 21,4 (**C-6**) ; *N*-Méthylvaline1 (NMeVal ) 170,2 (**C-1**), 62,1 (**C-2**), 31,6 (**N-CH<sub>3</sub>**), 28,6 (**C-3**), 21,6 (**C-4**), 18,5 (**C-5**) ; *N*-Méthylvaline2 (NMeVal2) 170,8 (**C-1**), 60,3 (**C-2**), 31,5 (**N-CH<sub>3</sub>**), 28,3 (**C-3**), 21,0 (**C-5**), 18,4 (**C-4**) ; Valine1 (Val ) 175,5 (**C-1**), 56,2 (**C-2**), 30,9 (**C-3**), 19,4 (**C-4**, **C-5**) ; *N*-Méthylthréonine1 (NMeThr1) 169,8 (**C-1**), 67,4 (**C-2**), 63,8 (**C-3**), 29,4 (**N-CH<sub>3</sub>**), 20,8 (**C-4**) ; Serine (Ser) 173,4 (**C-1**), 62,7 (**C-3**), 52,6 (**C-2**) ; *N*-Méthylthréonine2 (NMeThr2) 170,5 (**C-1**), 74,3 (**C-2**), 67,9 (**C-3**), 40,4 (**N-CH<sub>3</sub>**), 20,8 (**C-4**) ; Valine2 (Val2) 174,2 (**C-1**), 57,6 (**C-2**), 31,7 (**C-3**), 20,2 (**C-4**, **C-5**) ; Proline

(Pro) 174,2 (C-1), 60,8 (C-2), 49,0 (C-5), 31,4 (C-3), 26,0 (C-4) ; Valine3 (Val3) 171,6 (C-1), 58,1 (C-2), 32,6 (C-3), 19,6 (C-4, C-5). HR-ESI-MS : 1264,8052 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>62</sub>H<sub>110</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub><sup>+</sup>; calc. 1264,8127, err. -5,93 ppm), 1286,7966 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>62</sub>H<sub>109</sub>NaN<sub>11</sub>O<sub>16</sub><sup>+</sup>; calc. 1286,8026, err. -4,66 ppm).

**Xylariacéine B (37)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ Acide leucique 5,05 (1H, dd, *J* = 11,5, 2,1, H-2), 1,71 (1H, m, H-4), 1,61 (1H, m, H-3), 1,32 (1H, m, H-3), 0,92 (3H, m, H-5), 0,88 (3H, d, *J* = 6,9, H-6) ; *N*-Méthylalanine (NMeAla) 3,95 (1H, q, *J* = 6,7, H-2), 3,11 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1,47 (3H, d, *J* = 6,7, H-3) ; *N*-Méthylleucine (NMeLeu) 5,02 (1H, dd, *J* = 11,4, 2,0, H-2), 2,90 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 2,69 (1H, td, *J* = 12,3, 2,4, H-3), 1,50 (1H, m, H-4), 0,92 (3H, m, H-6), 0,80 (3H, d, *J* = 6,6, H-5) ; *N*-Méthylvaline1 (NMeVal1) 4,94 (1H, m, H-2), 2,91 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 2,38 (1H, m, H-3), 1,06 (3H, d, *J* = 6,6, H-4), 0,82 (3H, d, *J* = 6,9, H-5) ; *N*-Méthylvaline2 (NMeVal2) 5,22 (1H, d, *J* = 10,8, H-2), 3,14 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 2,38 (1H, m, H-3), 0,68 (3H, d, *J* = 7,0, H-4), 0,59 (3H, d, *J* = 6,5, H-5) ; Valine1 (Val1) 4,62 (1H, t, *J* = 10,1, H-2), 2,55 (1H, dq, *J* = 17,0, 6,7, H-3), 0,95 (3H, d, *J* = 6,7, H-4), 0,86 (3H, d, *J* = 6,7, H-4) ; *N*-Méthylthréonine1 (NMeThr1) 4,94 (1H, m, H-2), 4,08 (1H, m, H-3), 2,79 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1,13 (3H, d, *J* = 5,9, H-4) ; Serine (Ser) 4,95 (1H, m, H-2), 1,37 (3H, d, *J* = 6,4, H-3) ; *N*-Méthylthréonine2 (NMeThr2) 4,30 (1H, t, *J* = 5,9, H-3), 3,92 (1H, m, H-2), 3,01 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 1,17 (3H, d, *J* = 6,4, H-4) ; Valine2 (Val2) 4,54 (1H, d, *J* = 10,1, H-2), 1,98 (1H, m, H-3), 0,91 (6H, m, H-4, H-5) ; Proline (Pro) 4,92 (1H, m, H-2), 3,95 (1H, m, H-5), 3,74 (1H, t, 6,8, H-5), 2,10 (1H, m, H-3), 2,08 (1H, m, H-4), 1,90 (1H, m, H-3), 1,87 (1H, m, H-4) ; Valine3 (Val3) 4,57 (1H, d, *J* = 9,3, H-2), 2,43 (1H, m, H-3), 1,10 (3H, d, *J* = 6,7, H-4), 1,00 (3H, d, *J* = 6,4, H-5) ; HR-ESI-MS : 1248,8201 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>62</sub>H<sub>110</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup>; calc. 1248,8177, err. -1,92 ppm), 1270,7991 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>62</sub>H<sub>109</sub>NaN<sub>11</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup>; calc. 1270,7997, err. -0,47 ppm).

**1-linoléoyl glycérol (38)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 5,34 (4H, m, H-9, H-10, H-11, H-12), 4,15 (1H, dd, *J* = 11,5, 4,4, H-3'), 4,06 (1H, dd, *J* = 11,4, 6,2, H-3'), 3,82 (1H, quin, *J* = 5,5, H-2'), 3,55 (2H, q, *J* = 3,0, H-1'), 2,78 (2H, t, *J* = 6,7, H-11), 2,35 (2H, t, *J* = 7,3), 2,07 (4H, q, *J* = 6,8, H-8, H-14), 1,62 (2H, m, H-3), 1,34 (14H, br s), 0,91 (3H, t, *J* = 6,8, H-18). RMN-<sup>13</sup>C δ (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 175,5 (C-1), 130,9 (C-9), 130,9 (C-13), 129,1 (C-10), 129,0 (C-12), 71,2 (C-2'), 64,5 (C-1'), 64,1 (C-2'), 34,9 (C-2), 30,7 (C-16), 30,3 (C-15), 30,2 (C-4 à C-7), 28,2 (C-8, C-14), 26,5 (C-11), 26,0 (C-3), 23,6 (C-17), 14,4 (C-18). HR-ESI-MS : 355,2835 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>39</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 355,2843, err. -2,25 ppm), 377,2650 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>NaO<sub>4</sub><sup>+</sup>; calc. 377,2668, err. -4,77 ppm).

**Acide linoléique (39)** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,36 (4H, m, H-9, H-10, H-11, H-12), 2,77 (2H, t, *J* = 6,5, H-11), 2,34 (2H, t, *J* = 7,5, H-2), 2,05 (4H, dd, *J* = 13,7, 6,8, H-8, H-14), 1,63 (2H, m, H-3), 1,32 (14H, br s), 0,89 (3H, t, *J* = 6,7, H-18). RMN-<sup>13</sup>C δ (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 180,2 (C-1), 130,4 (C-9), 130,2 (C-13), 128,2 (C-10), 128,0 (C-12), 34,2 (C-2), 31,7 (C-16), 29,7 (C-15), 29,5, 29,5, 29,3, 29,2 (C-4 à C-7), 27,3 (C-14), 27,3 (C-8), 25,8 (C-11), 24,8 (C-3), 22,7 (C-17), 14,2 (C-18). HR-ESI-MS : 281,2484 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>18</sub>H<sub>33</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 281,2475, err. 3,20 ppm), 322,2738 ([M+ACN+H]<sup>+</sup>, C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>; calc. 322,2741, err. -0,93 ppm).

**Bassiatine (40)** : (3*S*, 6*R*)-4-méthyl-6-(1-méthylethyl)-3-phénylméthylperhydro-1,4-oxazine-2,5-dione : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +129 (c 0,1 g/mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ *N*-Méthylphénylalanine 7,33 (3H, m, H-6, H-7, H-8), 7,13 (2H, m, H-5, H-9), 4,40 (1H, t, *J* = 4,3, H-2), 3,29 (1H, dd, *J* = 13,9, 4,0, H-3), 3,20 (1H, dd, *J* = 13,9, 4,5, H-3), 3,02 (3H, s, N-Me) ; Acide valique 3,02 (1H, s, H-2), 2,31 (1H, heptd, *J* = 6,9, 2,0, H-3), 0,85 (3H, d, *J* = 7,0, H-4), 0,77 (3H, d, *J* = 6,8, H-5). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ *N*-Méthylphénylalanine 167,4 (C-1), 134,3 (C-4), 129,9 (C-5, C-9), 129,4 (C-6, C-8), 128,3 (C-7), 62,9 (C-2), 37,3 (C-3), 32,6 (N-Me) ; Acide valique 165,6 (C-1), 81,4 (C-2), 29,8 (C-3), 18,7 (C-4), 15,3 (C-5). HR-ESI-MS : 262,1447 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 262,1438, err. 3,43 ppm), 303,1717 ([M+ACN+H]<sup>+</sup>, C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>; calc. 303,1703, err. 4,62 ppm).

**(-)-Cyclonerodiol (41)** : [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -9,2 (c 1,0 g/100mL, CHCl<sub>3</sub>). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 5,12 (1H, t, *J* = 7,0, H-10), 2,04 (2H, m, H-9), 1,83 (2H, m, H-5, H-6), 1,68 (3H, s, H-12), 1,64 (1H, m,

**H-5**), 1,62 (3H, s, **H-15**), 1,59 (2H, m, **H-5**, **H-2**), 1,54 (1H, m, **H-4**), 1,46 (2H, m, **H-8**), 1,23 (3H, s, **H-12**), 1,13 (3H, s, **H-14**), 1,02 (3H, d,  $J = 6,7$ , **H-1**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  132,0 (**C-10**), 125,9 (**C-11**), 82,0 (**C-2**), 75,5 (**C-7**), 55,4 (**C-6**), 45,5 (**C-2**), 42,1 (**C-8**), 41,4 (**C-4**), 26,1 (**C-13**), 25,9 (**C-12**), 25,1 (**C-5**), 24,7 (**C-14**), 23,7 (**C-9**), 17,7 (**C-15**), 15,4 (**C-1**). HR-ESI-MS : 223,2062 ([M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>O<sup>+</sup>; calc. 223,2056, err. 2,69 ppm), 205,1955 ([M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, C<sub>15</sub>H<sub>25</sub><sup>+</sup>; calc. 205,1952, err. 1,46 ppm).

**Focicine (42)** : 5-((3<sup>E</sup>,5<sup>E</sup>,7S,9S,10S,11R)-10-acetoxy-5,7,9,11-tetramethyltrideca-3,5-dien-1-yl)-3-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)furan-2-carboxylic acid :  $[\alpha]_D^{20}$  -16 (c 0,1 g/mL, CH<sub>3</sub>OH). RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6,09 (1H, d,  $J = 15,5$ , **H-9**), 6,02 (1H, s, **H-4**), 5,56 (1H, dt,  $J = 15,3, 6,9$ , **H-8**), 5,20 (1H, d,  $J = 5,0$ , **H-11**), 4,69 (1H, m, H-1'), 4,65 (1H, dd,  $J = 7,0, 5,7$ , H-15), 3,80 (1H, dd,  $J = 12,0, 2,2$ , **H-6'**), 3,70 (1H, dd,  $J = 12,0, 5,0$ , **H-6'**), 3,41 (1H, m, H-2'), 3,39 (1H, m, **H-3'**), 3,36 (1H, m, **H-4'**), 3,28 (1H, m, **H-5'**), 2,57 (2H, m, **H-6**), 2,55 (1H, m, **H-12**), 2,43 (2H, q,  $J = 7,1$ , **H-7**), 2,05 (3H, s, **H-23**), 1,85 (1H, m, **H-14**), 1,73 (3H, s, **H-19**), 1,69 (1H, m, **H-16**), 1,48 (1H, m, **H-17**), 1,36 (1H, m, **H-13**), 1,08 (1H, m, **H-17**), 1,05 (1H, m, **H-13**), 0,92 (3H, d,  $J = 6,5$ , **H-20**), 0,90-0,86 (9H, br s, **H-18**, **H-21**, **H-24**). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  173,1 (**C-22**), 165,1 (**C-1**), 164,2 (**C-3**), 163,3 (**C-5**), 139,3 (**C-11**), 137,8 (**C-9**), 132,6 (**C-10**), 125,9 (**C-8**), 123,7 (**C-2**), 106,3 (**C-1'**), 103,1 (**C-4**), 83,7 (**C-15**), 78,5 (**C-5'**), 77,7 (**C-3'**), 75,1 (**C-2'**), 70,8 (**C-4'**), 62,2 (**C-6'**), 39,9 (**C-13**), 37,0 (**C-16**), 34,4 (**C-6**), 33,3 (**C-14**), 31,4 (**C-12**), 31,2 (**C-7**), 25,1 (**C-17**), 20,9 (**C-23**), 20,3 (**C-20**), 17,6 (**C-21**), 16,0 (**C-24**), 12,8 (**C-19**), 11,6 (**C-18**). HR-ESI-MS : 583,3135 ([M+H]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup>; calc. 583,3113, err. 3,77 ppm), 605,2991 ([M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>11</sub>Na<sup>+</sup>; calc. 605,2932, err. 9,75).



## Références

- [1] Ortholand J.-Y., Ganesan A., Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, p. 271–280.
- [2] Newman D. J., Cragg G. M., Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, p. 311–335.
- [3] G. de la Torre B., Albericio F., The pharmaceutical industry in 2018. an analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules. *Molecules* **2019**, *24*, p. 809.
- [4] Trivella D. B. B., de Felicio R., The tripod for bacterial natural product discovery: genome mining, silent pathway induction, and mass spectrometry-based molecular networking. *mSystems* **2018**, *3*, p. e00160-17.
- [5] Gunatilaka A. A. L., Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, p. 509–526.
- [6] Zhang H. W., Song Y. C., Tan R. X., Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, p. 753–771.
- [7] Combemorel P., 'Antiseptiques, antibiotiques, désinfectants : quelles différences?', consulté sur <https://planet-vie.ens.fr/article/2236/antiseptiques-antibiotiques-desinfectants-queelles-differences>, **2016**.
- [8] Achievements in public health, 1900-1999: control of infectious diseases. *MMWR* **1999**, *48*, p. 621–628.
- [9] Fair R. J., Tor Y., Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* **2014**, *6*, p. 25–64.
- [10] Bush K., Bradford P. A.,  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2016**, *6*, p. 1–22.
- [11] Papp-Wallace K. M., Endimiani A., Taracila M. A., Bonomo R. A., Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, p. 4943–4960.
- [12] Sykes R. B., Bonner D. P., Discovery and development of the monobactams. *Rev. Infect. Dis.* **1985**, *7*, p. S579–S593.
- [13] Sykes R. B., Bonner D. P., Aztreonam: the first monobactam. *Am. J. Med.* **1985**, *78*, p. 2–10.
- [14] Binda E., Marinelli F., Marcone G. L., Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiotics* **2014**, *3*, p. 572–594.
- [15] Chopra I., Roberts M., Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, *65*, p. 232–260.
- [16] Kotra L. P., Haddad J., Mobashery S., Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, p. 3249–3256.
- [17] Mazzei T., Mini E., Novelli A., Periti P., Chemistry and mode of action of macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* **1993**, *31*, p. 1–9.
- [18] Gaynor M., Mankin A. S., Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, p. 949–961.
- [19] Chen S. C. A., Sorrell T. C., Antifungal agents. *Med. J. Aust.* **2007**, *187*, p. 404–409.
- [20] Caffrey P., Lynch S., Flood E., Finnan S., Oliylyk M., Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, p. 713–723.
- [21] Ghannoum M. A., Rice L. B., Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, p. 501–517.
- [22] Brajtburg J., Powderly W. G., Kobayashi G. S., Medoff G., Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, p. 183–188.

- [23] Mercer E. I., Morpholine antifungals and their mode of action. *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, *19*, p. 788–793.
- [24] Vermes A., Guchelaar H. J., Dankert J., Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, p. 171–179.
- [25] Blasco B., Leroy D., Fidock D. A., Antimalarial drug resistance: linking *Plasmodium falciparum* parasite biology to the clinic. *Nat. Med.* **2017**, *23*, p. 917–928.
- [26] Razonable R. R., Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, *86*, p. 1009–1026.
- [27] Lewis K., Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, p. 371–387.
- [28] Fleming A., Nobel Lecture : Penicillin. **1945**.
- [29] Peterson E., Kaur P., Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*.
- [30] Li H., Luo Y.-F., Williams B. J., Blackwell T. S., Xie C.-M., Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int. J. Med. Microbiol.* **2012**, *302*, p. 63–68.
- [31] Bennett P. M., Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, p. S347–S357.
- [32] Lowy F. D., Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, p. 1265–1273.
- [33] ‘Antimicrobial Resistance’, consulté sur <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, **2018**.
- [34] Cowen L. E., Sanglard D., Howard S. J., Rogers P. D., Perlin D. S., Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **2015**, *5*.
- [35] Wiederhold N. P., Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect. Drug Resist.* **2017**, *10*, p. 249–259.
- [36] Richards T. A., Leonard G., Soanes D. M., Talbot N. J., Gene transfer into the fungi. *Fungal Biol. Rev.* **2011**, *25*, p. 98–110.
- [37] Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A., Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Global Health* **2015**, *109*, p. 309–318.
- [38] Johnson L., Sabel A., Burman W. J., Everhart R. M., Rome M., MacKenzie T. D., Rozwadowski J., Mehler P. S., Price C. S., Emergence of fluoroquinolone resistance in outpatient urinary *Escherichia coli* isolates. *Am. J. Med.* **2008**, *121*, p. 876–884.
- [39] Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., Hanage W. P., Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* **2015**, *8*, p. 240–247.
- [40] Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A., Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules* **2018**, *23*, p. 795–843.
- [41] Forsberg K., Woodworth K., Walters M., Berkow E. L., Jackson B., Chiller T., Vallabhaneni S., *Candida auris*: the recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. *Med. Mycol.* **2019**, *57*, p. 1–12.
- [42] MacPherson D. W., Gushulak B. D., Baine W. B., Bala S., Gubbins P. O., Holtom P., Segarra-Newnham M., Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. *Emerging Infect. Dis.* **2009**, *15*, p. 1727–1731.
- [43] Leekha S., Terrell C. L., Edson R. S., General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, *86*, p. 156–167.
- [44] ‘OMS | Projet de plan d’action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens’, consulté sur [http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/development\\_process/fr/](http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/development_process/fr/), **2014**.
- [45] Kim S., Lieberman T. D., Kishony R., Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, p. 14494–14499.

- [46] Jansen K. U., Anderson A. S., The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance (AMR). *Hum. Vaccines Immunother.* **2018**, *14*, p. 2142–2149.
- [47] Harvey A. L., Edrada-Ebel R., Quinn R. J., The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, p. 111–129.
- [48] Lin D. M., Koskella B., Lin H. C., Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **2017**, *8*, p. 162–173.
- [49] Hauser A. R., Mecsas J., Moir D. T., Beyond antibiotics: new therapeutic approaches for bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63*, p. 89–95.
- [50] Rouha H., Badarau A., Visram Z. C., Battles M. B., Prinz B., Magyarics Z., Nagy G., Mirkina I., Stulik L., Zerbs M., *et al.*, Five birds, one stone: neutralization of  $\alpha$ -hemolysin and 4 bi-component leukocidins of *Staphylococcus aureus* with a single human monoclonal antibody. *mAbs* **2014**, *7*, p. 243–254.
- [51] Rémy B., Mion S., Plener L., Elias M., Chabrière E., Daudé D., Interference in bacterial quorum sensing: a biopharmaceutical perspective. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, p. 203.
- [52] Yarwood J. M., Schlievert P. M., Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, p. 1620–1625.
- [53] Salam A. M., Quave C. L., Targeting virulence in *Staphylococcus aureus* by chemical inhibition of the accessory gene regulator system in vivo. *mSphere* **2018**, *3*.
- [54] Kratochvil M. J., Yang T., Blackwell H. E., Lynn D. M., Nonwoven polymer nanofiber coatings that inhibit quorum sensing in *Staphylococcus aureus*: toward new nonbactericidal approaches to infection control. *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, p. 271–280.
- [55] Kandel S. L., Joubert P. M., Doty S. L., Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* **2017**, *5*, p. 77–103.
- [56] Haroim P. R., van Overbeek L. S., Berg G., Pirttilä A. M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A., The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2015**, *79*, p. 293–320.
- [57] Card S., Johnson L., Teasdale S., Caradus J., Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*.
- [58] Hawksworth D. L., The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* **2001**, *105*, p. 1422–1432.
- [59] Hug L. A., Baker B. J., Anantharaman K., Brown C. T., Probst A. J., Castelle C. J., Butterfield C. N., HERNSDORF A. W., Amano Y., Ise K., *et al.*, A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, p. 16048.
- [60] Adl S. M., Simpson A. G. B., Lane C. E., Lukeš J., Bass D., Bowser S. S., Brown M. W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., *et al.*, The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryotic Microbiol.* **2012**, *59*, p. 429–493.
- [61] Wemheuer F., Kaiser K., Karlovsky P., Daniel R., Vidal S., Wemheuer B., Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.
- [62] Vacher C., Hampe A., Porté A. J., Sauer U., Compant S., Morris C. E., The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2016**, *47*, p. 1–24.
- [63] Arnold A. E., Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* **2007**, *21*, p. 51–66.
- [64] Arnold A. E., Lutzoni F., Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* **2007**, *88*, p. 541–549.
- [65] Zhang T., Yao Y.-F., Endophytic fungal communities associated with vascular plants in the high arctic zone are highly diverse and host-plant specific. *PLOS ONE* **2015**, *10*, p. e0130051.
- [66] Christian N., Sullivan C., Visser N. D., Clay K., Plant host and geographic location drive endophyte community composition in the face of perturbation. *Microb. Ecol.* **2016**, *72*, p. 621–632.

- [67] Collado J., Platas G., González I., Peláez F., Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytol.* **1999**, *144*, p. 525–532.
- [68] Shahzad R., Khan A. L., Bilal S., Asaf S., Lee I.-J., What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, p. 24.
- [69] Philipson M. N., Christey M. C., The relationship of host and endophyte during flowering, seed formation, and germination of *Lolium perenne*. *N. Z. J. Bot.* **1986**, *24*, p. 125–134.
- [70] Frank A. C., Saldierna Guzmán J. P., Shay J. E., Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms* **2017**, *5*, p. E70.
- [71] Herre E. A., Knowlton N., Mueller U. G., Rehner S. A., The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol.* **1999**, *14*, p. 49–53.
- [72] Peiffer J. A., Spor A., Koren O., Jin Z., Tringe S. G., Dangl J. L., Buckler E. S., Ley R. E., Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS* **2013**, *110*, p. 6548–6553.
- [73] Edwards J., Johnson C., Santos-Medellín C., Lurie E., Podishetty N. K., Bhatnagar S., Eisen J. A., Sundaresan V., Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *PNAS* **2015**, *112*, p. E911–E920.
- [74] Zúñiga A., Poupin M. J., Donoso R., Ledger T., Guiliani N., Gutiérrez R. A., González B., Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2013**, *26*, p. 546–553.
- [75] Balsanelli E., Tuleski T. R., de Baura V. A., Yates M. G., Chubatsu L. S., Pedrosa F. de O., de Souza E. M., Monteiro R. A., Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via *N*-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides. *PLOS ONE* **2013**, *8*, p. e77001.
- [76] Reinhold-Hurek B., Maes T., Gemmer S., Van Montagu M., Hurek T., An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2006**, *19*, p. 181–188.
- [77] Hurek T., Reinhold-Hurek B., *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, p. 169–178.
- [78] Banik A., Dash G. K., Swain P., Kumar U., Mukhopadhyay S. K., Dangar T. K., Application of rice (*Oryza sativa* L.) root endophytic diazotrophic *Azotobacter* sp. strain Avi2 (MCC 3432) can increase rice yield under green house and field condition. *Microbiol. Res.* **2019**, *219*, p. 56–65.
- [79] Miyamoto T., Kawahara M., Minamisawa K., Novel endophytic nitrogen-fixing *Clostridia* from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, p. 6580–6586.
- [80] Chi F., Shen S.-H., Cheng H.-P., Jing Y.-X., Yanni Y. G., Dazzo F. B., Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, p. 7271–7278.
- [81] Yang B., Wang X.-M., Ma H.-Y., Yang T., Jia Y., Zhou J., Dai C.-C., Fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* affects nitrogen transformation processes and related microorganisms in the rice rhizosphere. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, p. 982.
- [82] Eskin N., Vessey K., Tian L., Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. *Int. j. Agron.* **2014**, p. 1–13.
- [83] Otieno N., Lally R. D., Kiwanuka S., Lloyd A., Ryan D., Germaine K. J., Dowling D. N., Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, p. 745.
- [84] Matos A. D. M., Gomes I. C. P., Nietsche S., Xavier A. A., Gomes W. S., Dos Santos J. A., Pereira M. C. T., Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2017**, *89*, p. 2945–2954.
- [85] Hiruma K., Gerlach N., Sacristán S., Nakano R. T., Hacquard S., Kracher B., Neumann U., Ramírez D., Bucher M., O’Connell R. J., *et al.*, Root endophyte *Colletotrichum tofielliae*

- confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell* **2016**, *165*, p. 464–474.
- [86] Ma Y., Rajkumar M., Zhang C., Freitas H., Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *J. Environ. Manage.* **2016**, *174*, p. 14–25.
- [87] Egamberdieva D., Wirth S. J., Alqarawi A. A., Abd\_Allah E. F., Hashem A., Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, p. 2104.
- [88] Campanoni P., Nick P., Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiol.* **2005**, *137*, p. 939–948.
- [89] Estornell L. H., Agustí J., Merelo P., Talón M., Tadeo F. R., Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Sci.* **2013**, *199–200*, p. 48–60.
- [90] Achard P., Genschik P., Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, p. 1085–1092.
- [91] Dobránszki J., Mender-Drienyovszki N., Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of in vitro apple leaves. *J. Plant Physiol.* **2014**, *171*, p. 1472–1478.
- [92] Tuan P. A., Kumar R., Rehal P. K., Toora P. K., Ayele B. T., Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, p. 668.
- [93] Waqas M., Khan A. L., Hamayun M., Shahzad R., Kang S.-M., Kim J.-G., Lee I.-J., Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *J. Plant Interact.* **2015**, *10*, p. 280–287.
- [94] Vadassery J., Ritter C., Venus Y., Camehl I., Varma A., Shahollari B., Novák O., Strnad M., Ludwig-Müller J., Oelmüller R., The Role of Auxins and Cytokinins in the Mutualistic Interaction Between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *MPMI* **2008**, *21*, p. 1371–1383.
- [95] Iqbal N., Khan N. A., Ferrante A., Trivellini A., Francini A., Khan M. I. R., Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, p. 475–494.
- [96] Glick B. R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J., McConkey B., Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2007**, *26*, p. 227–242.
- [97] Ali S., Charles T. C., Glick B. R., Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, p. 1139–1144.
- [98] Cassán F., Maiale S., Masciarelli O., Vidal A., Luna V., Ruiz O., Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur. J. Soil Biol.* **2009**, *45*, p. 12–19.
- [99] Silva-Hughes A. F., Wedge D. E., Cantrell C. L., Carvalho C. R., Pan Z., Moraes R. M., Madoxx V. L., Rosa L. H., Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiol. Res.* **2015**, *175*, p. 67–77.
- [100] Shentu X., Zhan X., Ma Z., Yu X., Zhang C., Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, p. 248–254.
- [101] Li J. Y., Strobel G., Harper J., Lobkovsky E., Clardy J., Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Org. Lett.* **2000**, *2*, p. 767–770.
- [102] Seto Y., Takahashi K., Matsuura H., Kogami Y., Yada H., Yoshihara T., Nabeta K., Novel cyclic peptide, epichlicin, from the endophytic fungus, *Epichloe typhina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, p. 1470–1475.
- [103] Lu H., Zou W. X., Meng J. C., Hu J., Tan R. X., New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci.* **2000**, *151*, p. 67–73.
- [104] Macías-Rubalcava M. L., Hernández-Bautista B. E., Jiménez-Estrada M., González M. C., Glenn A. E., Hanlin R. T., Hernández-Ortega S., Saucedo-García A., Muria-González J. M., Anaya A. L., Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, p. 1185–1196.

- [105] Li E., Jiang L., Guo L., Zhang H., Che Y., Pestalochlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, p. 7894–7899.
- [106] Castillo U. F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H., Robison R., Condrón M. A. M., Teplow D. B., *et al.*, Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology* **2002**, *148*, p. 2675–2685.
- [107] Castillo U. F., Strobel G. A., Mullenberg K., Condrón M. M., Teplow D. B., Folgiano V., Gallo M., Ferracane R., Mannina L., Viel S., *et al.*, Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *255*, p. 296–300.
- [108] Ezra D., Castillo U. F., Strobel G. A., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Condrón M. A. M., Teplow D. B., Sears J., Maranta M., *et al.*, Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* **2004**, *150*, p. 785–793.
- [109] Ezra D., Hess W. M., Strobel G. A., New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology* **2004**, *150*, p. 4023–4031.
- [110] Lemfack M. C., Gohlke B.-O., Toguem S. M. T., Preissner S., Piechulla B., Preissner R., mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, p. D1261–D1265.
- [111] Sheoran N., Valiya Nadakkakath A., Munjal V., Kundu A., Subaharan K., Venugopal V., Rajamma S., Eapen S. J., Kumar A., Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiol. Res.* **2015**, *173*, p. 66–78.
- [112] Wang Y., Li Y., Yang J., Ruan J., Sun C., Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *78*, p. 1–16.
- [113] 'Muscodor', consulté sur <http://www.mycobank.org>, **2018**.
- [114] Meshram V., Kapoor N., Saxena S., *Muscodor kashayum* sp. nov. - a new volatile antimicrobial producing endophytic fungus. *Mycology* **2013**, *4*, p. 196–204.
- [115] Meshram V., Saxena S., Kapoor N., *Muscodor strobelsii*, a new endophytic species from South India. *Mycotaxon* **2014**, *128*, p. 93–104.
- [116] Saxena S., Meshram V., Kapoor N., *Muscodor tigerii* sp. nov.-volatile antibiotic producing endophytic fungus from the northeastern Himalayas. *Ann. Microbiol.* **2015**, *65*, p. 47–57.
- [117] Mercier J., Jiménez J. I., Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biol. Technol.* **2004**, *31*, p. 1–8.
- [118] Grimme E., Zidack N. K., Sikora R. A., Strobel G. A., Jacobsen B. J., Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. *Plant Dis.* **2007**, *91*, p. 220–225.
- [119] Ulloa-Benítez Á., Medina-Romero Y. M., Sánchez-Fernández R. E., Lappe-Oliveras P., Roque-Flores G., Duarte Lisci G., Herrera Suárez T., Macías-Rubalcava M. L., Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxylon anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, p. 380–400.
- [120] Yan D.-H., Song X., Li H., Luo T., Dou G., Strobel G., Antifungal activities of volatile secondary metabolites of four diaporphes strains isolated from *Catharanthus roseus*. *J. Fungi* **2018**, *4*, p. 65.
- [121] Singh S. K., Strobel G. A., Knighton B., Geary B., Sears J., Ezra D., An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microb. Ecol.* **2011**, *61*, p. 729–739.
- [122] Siegel M. R., Latch G. C., Bush L. P., Fannin F. F., Rowan D. D., Tapper B. A., Bacon C. W., Johnson M. C., Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, p. 3301–3315.
- [123] Gallagher R. T., Hawkes A. D., Steyn P. S., Vleggaar R., Tremorgenic neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorder of livestock: structure elucidation of Lolitrem B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, *9*, p. 614–616.

- [124] Wäli P. P., Wäli P. R., Saikkonen K., Tuomi J., Is the pathogenic ergot fungus a conditional defensive mutualist for its host grass? *PLoS ONE* **2013**, *8*, p. e69249.
- [125] Daisy B. H., Strobel G. A., Castillo U., Ezra D., Sears J., Weaver D. K., Runyon J. B., Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **2002**, *148*, p. 3737–3741.
- [126] Vidal S. L. B., Jaber L. R., Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Curr. Sci.* **2015**, *109*, p. 46–54.
- [127] Bing L. A., Lewis L. C., Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Sci. Tech.* **1992**, *2*, p. 39–47.
- [128] Bael S. a. V., Seid M. A., Wcislo W. T., Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecological Entomology* **2012**, *37*, p. 318–321.
- [129] Estrada C., Wcislo W. T., Van Bael S. A., Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytol.* **2013**, *198*, p. 241–251.
- [130] Xiong L., Schumaker K. S., Zhu J.-K., Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **2002**, *14*, p. S165–S183.
- [131] Munemasa S., Hauser F., Park J., Waadt R., Brandt B., Schroeder J. I., Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *28*, p. 154–162.
- [132] Waqas M., Khan A. L., Kamran M., Hamayun M., Kang S.-M., Kim Y.-H., Lee I.-J., Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* **2012**, *17*, p. 10754–10773.
- [133] Ali S., Charles T. C., Glick B. R., Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *80*, p. 160–167.
- [134] Karthikeyan B., Joe M. M., Islam Md. R., Sa T., ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis* **2012**, *56*, p. 77–86.
- [135] Naveed M., Hussain M. B., Zahir Z. A., Mitter B., Sessitsch A., Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regul.* **2014**, *73*, p. 121–131.
- [136] Yamaji K., Watanabe Y., Masuya H., Shigeto A., Yui H., Haruma T., Root fungal endophytes enhance heavy-metal stress tolerance of *Clethra barbinervis* growing naturally at mining sites via growth enhancement, promotion of nutrient uptake and decrease of heavy-metal concentration. *PLOS ONE* **2016**, *11*.
- [137] Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sa T., Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* **2007**, *69*, p. 220–228.
- [138] Ngigi A. N., Getenga Z. M., Boga H. I., Ndalut P. K., Biodegradation of *S*-triazine herbicide Atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* sp. from long-term treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2012**, *47*, p. 769–778.
- [139] Germaine K. J., Liu X., Cabellos G. G., Hogan J. P., Ryan D., Dowling D. N., Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *57*, p. 302–310.
- [140] Ma Y., Oliveira R. S., Nai F., Rajkumar M., Luo Y., Rocha I., Freitas H., The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil. *J. Environ. Manage.* **2015**, *156*, p. 62–69.
- [141] Kang J. W., Khan Z., Doty S. L., Biodegradation of trichloroethylene by an endophyte of hybrid poplar. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, p. 3504–3507.
- [142] Márquez L. M., Redman R. S., Rodriguez R. J., Roossinck M. J., A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* **2007**, *315*, p. 513–515.

- [143] De Vleeschauwer D., Höfte M., Chapter 6 Rhizobacteria-Induced Systemic Resistance. in *Advances in Botanical Research*, Academic Press, **2009**, pp. 223–281.
- [144] Puri A., Padda K. P., Chanway C. P., Nitrogen-fixation by endophytic bacteria in agricultural crops: recent advances. in *Nitrogen in Agriculture - Updates*, IntechOpen, **2017**.
- [145] Kaddes A., Fauconnier M.-L., Sassi K., Nasraoui B., Jijakli M.-H., Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules* **2019**, *24*, p. 1065.
- [146] Shukla S. T., Habbu P. V., Kulkarni V. H., Jagadish K. S., Pandey A. R., Sutariya V. N., Endophytic microbes: A novel source for biologically/pharmacologically active secondary metabolites. *Asian J. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *2*, p. 1–16.
- [147] Chomcheon P., Wiyakrutta S., Aree T., Sriubolmas N., Ngamrojanavanich N., Mahidol C., Ruchirawat S., Kittakoop P., Curvularides A-E: antifungal hybrid peptide-polyketides from the endophytic fungus *Curvularia geniculata*. *Chemistry* **2010**, *16*, p. 11178–11185.
- [148] Tejesvi M. V., Segura D. R., Schnorr K. M., Sandvang D., Mattila S., Olsen P. B., Neve S., Kruse T., Kristensen H. H., Pirttilä A. M., An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity* **2013**, *60*, p. 153–159.
- [149] Martínez-Luis S., Della-Togna G., Coley P. D., Kursar T. A., Gerwick W. H., Cubilla-Rios L., Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, p. 2011–2014.
- [150] Rukachaisirikul V., Sommart U., Phongpaichit S., Sakayaroj J., Kirtikara K., Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry* **2008**, *69*, p. 783–787.
- [151] Supong K., Thawai C., Choowong W., Kittiwongwattana C., Thanaboripat D., Laosinwattana C., Koohakan P., Parinthawong N., Pittayakhajonwut P., Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.). *Research in Microbiology* **2016**, *167*, p. 290–298.
- [152] Zhang J., Liu D., Wang H., Liu T., Xin Z., Fusartricin, a sesquiterpenoid ether produced by an endophytic fungus *Fusarium tricinctum* Salicorn 19. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *240*, p. 805–814.
- [153] Shiono Y., Koyama H., Murayama T., Koseki T., New sesquiterpenes from the endophyte *Microdiplodia* sp. TT-12 and their antimicrobial activity. *Phytochem. Lett.* **2015**, *14*, p. 143–147.
- [154] Li E., Tian R., Liu S., Chen X., Guo L., Che Y., Pestalothols A–D, bioactive metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis theae*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, p. 664–668.
- [155] Alvin A., Kalaitzis J. A., Sasia B., Neilan B. A., Combined genetic and bioactivity-based prioritization leads to the isolation of an endophyte-derived antimycobacterial compound. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *120*, p. 1229–1239.
- [156] Ibrahim S. R. M., Elkhayat E. S., Mohamed G. A., Khedr A. I. M., Fouad M. A., Kotb M. H. R., Ross S. A., Aspernolides F and G, new butyrolactones from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Phytochem. Lett.* **2015**, *14*, p. 84–90.
- [157] Ding L., Maier A., Fiebig H.-H., Lin W.-H., Hertweck C., A family of multicyclic indolosesquiterpenes from a bacterial endophyte. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, p. 4029–4031.
- [158] Eyberger A. L., Dondapati R., Porter J. R., Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, p. 1121–1124.
- [159] Kour A., Shawl A. S., Rehman S., Sultan P., Qazi P. H., Suden P., Khajuria R. K., Verma V., Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, p. 1115–1121.
- [160] Chen Y., Guo H., Du Z., Liu X.-Z., Che Y., Ye X., Ecology-based screen identifies new metabolites from a *Cordyceps*-colonizing fungus as cancer cell proliferation inhibitors and apoptosis inducers. *Cell Prolif.* **2009**, *42*, p. 838–847.
- [161] Casella J. F., Flanagan M. D., Lin S., Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* **1981**, *293*, p. 302–305.

- [162] Abate D., Abraham W.-R., Meyer H., Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, p. 1443–1448.
- [163] Wagenaar M. M., Corwin J., Strobel G., Clardy J., Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, p. 1692–1695.
- [164] Feitosa A. de O., Dias A. C. S., Ramos G. da C., Bitencourt H. R., Siqueira J. E. S., Marinho P. S. B., Barison A., Ocampos F. M. M., Marinho A. M. do R., Lethality of Cytochalasin B and other compounds isolated from fungus *Aspergillus* sp. (Trichocomaceae) endophyte of *Bauhinia guianensis* (Fabaceae). *Rev. Argent. Microbiol.* **2016**, *48*, p. 259–263.
- [165] Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T., Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, p. 2325–2327.
- [166] Stierle A., Strobel G., Stierle D., Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* **1993**, *260*, p. 214–216.
- [167] Strobel G. A., Hess W. M., Li J.-Y., Ford E., Sears J., Sidhu R. S., Summerell B., *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. *Aust. J. Bot.* **1997**, *45*, p. 1073–1082.
- [168] Kumaran R. S., Muthumary J., Hur B. K., Production of Taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. *Eng. Life Sci.* **2008**, *8*, p. 438–446.
- [169] Pandi M., Manikandan R., Muthumary J., Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague Dawley rats. *Biomed. Pharmacother.* **2010**, *64*, p. 48–53.
- [170] Kusari S., Zühlke S., Spittler M., An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces Camptothecin and analogues. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, p. 2–7.
- [171] Uma Shaanker R., Ramesha B. T., Ravikanth G., Gunaga R., Vasudeva R., Ganeshaiyah K. N., Chemical profiling of *Nothapodytes nimmoniana* for Camptothecin, an important anticancer alkaloid: towards the development of a sustainable production system. in *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (Curs.: K.G. Ramawat, J.M. Merillon), Springer, Berlin, Heidelberg, **2008**, pp. 197–213.
- [172] Brady S. F., Singh M. P., Janso J. E., Clardy J., Cytoskyrins A and B, new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus. *Org. Lett.* **2000**, *2*, p. 4047–4049.
- [173] Isaka M., Jaturapat A., Rukseree K., Danwisetkanjana K., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y., Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, p. 1015–1018.
- [174] Ding G., Zheng Z., Liu S., Zhang H., Guo L., Che Y., Photinides A-F, cytotoxic benzofuranone-derived gamma-lactones from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis photiniae*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, p. 942–945.
- [175] Lee J. C., Lobkovsky E., Pliam N. B., Strobel G., Clardy J., Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, p. 7076–7077.
- [176] Zabalgoceazcoa I., Alvarez A., Herrero N., Vazquez-de-Aldana B. R., Production of fumonisins by endophytic strains of *Tolypocladium cylindrosporum* and its relation to fungal virus infection. *Mycotoxin Res.* **2018**, *34*, p. 49–57.
- [177] Uzor P. F., Osadebe P. O., Nwodo N. J., Antidiabetic activity of extract and compounds from an endophytic fungus *Nigrospora oryzae*. *Drug Res.* **2017**, *67*, p. 308–311.
- [178] Zhang B., Salituro G., Szalkowski D., Li Z., Zhang Y., Royo I., Vilella D., Díez M. T., Pelaez F., Ruby C., *et al.*, Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science* **1999**, *284*, p. 974–977.
- [179] Harper J. K., Arif A. M., Ford E. J., Strobel G. A., Porco J. A., Tomer D. P., Oneill K. L., Heider E. M., Grant D. M., Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* **2003**, *59*, p. 2471–2476.
- [180] Li J., Zhao G.-Z., Varma A., Qin S., Xiong Z., Huang H.-Y., Zhu W.-Y., Zhao L.-X., Xu L.-H., Zhang S., *et al.*, An endophytic *Pseudonocardia* species induces the production of artemisinin in *Artemisia annua*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, p. e51410.

- [181] Walsh C. T., Tang Y., Natural products isolation and characterization. in *Natural Product Biosynthesis*, **2017**, pp. 635–689.
- [182] Ling L. L., Schneider T., Peoples A. J., Spoering A. L., Engels I., Conlon B. P., Mueller A., Schäberle T. F., Hughes D. E., Epstein S., *et al.*, A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **2015**, *517*, p. 455–459.
- [183] Bode H. B., Bethe B., Höfs R., Zeeck A., Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **2002**, *3*, p. 619–627.
- [184] Liu L., Bruhn T., Guo L., Götz D. C. G., Brun R., Stich A., Che Y., Bringmann G., Chloropupukeanolides C-E: cytotoxic pupukeanane chlorides with a spiroketal skeleton from *Pestalotiopsis fici*. *Chemistry* **2011**, *17*, p. 2604–2613.
- [185] Liu L., Tian R., Liu S., Chen X., Guo L., Che Y., Pestaloficiols A-E, bioactive cyclopropane derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, p. 6021–6026.
- [186] Ebrahim W., El-Neketi M., Lewald L.-I., Orfali R. S., Lin W., Rehberg N., Kalscheuer R., Daletos G., Proksch P., Metabolites from the fungal endophyte *Aspergillus austroafricanus* in axenic culture and in fungal-bacterial mixed cultures. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, p. 914–922.
- [187] Vendan R. T., Yu Y. J., Lee S. H., Rhee Y. H., Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. *J. Microbiol.* **2010**, *48*, p. 559–565.
- [188] Andreolli M., Lampis S., Zapparoli G., Angelini E., Vallini G., Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. *Corvina* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiol. Res.* **2016**, *183*, p. 42–52.
- [189] Nascimento T. L., Oki Y., Lima D. M. M., Almeida-Cortez J. S., Fernandes G. W., Souza-Motta C. M., Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecol.* **2015**, *14*, p. 79–86.
- [190] Garcias-Bonet N., Arrieta J. M., de Santana C. N., Duarte C. M., Marbà N., Endophytic bacterial community of a Mediterranean marine angiosperm (*Posidonia oceanica*). *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, p. 342.
- [191] Vohník M., Borovec O., Kolařík M., Communities of cultivable root mycobionts of the seagrass *Posidonia oceanica* in the northwest Mediterranean sea are dominated by a hitherto undescribed pleosporalean dark septate endophyte. *Microb. Ecol.* **2016**, *71*, p. 442–451.
- [192] Charles-dominique P., Chave J., Dubois M.-A., Granville J.-J. D., Riera B., Vezzoli C., Colonization front of the understory palm *Astrocaryum sciophilum* in a pristine rain forest of French Guiana. *Global Ecol. Biogeogr.* **2003**, *12*, p. 237–248.
- [193] Charles-Dominique P., Chave J., Vezzoli C., Dubois M.-A., Riéra B., Growth strategy of the understory palm *Astrocaryum sciophilum* in the rainforest of French Guiana. in *Life forms and dynamics in tropical forests*, G. Gottsberger And S. Liede, Berlin/Stuttgart, **2001**.
- [194] Alvarez-Sanchez J., Barajas-Guzman G., Campo J., Leon R., Inorganic nitrogen and phosphorus in stemflow of the palm *Astrocaryum mexicanum* Liebm. located in Los Tuxtlas, Mexico. *Trop. Ecol.* **2016**, *57*, p. 45–55.
- [195] Kraková L., Šoltys K., Budiš J., Grivalský T., Ďuriš F., Pangallo D., Szemes T., Investigation of bacterial and archaeal communities: novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional DGGE-cloning. *Extremophiles* **2016**, *20*, p. 795–808.
- [196] Daru Barnabas H., Bowman Elizabeth A., Pfister Donald H., Arnold A. Elizabeth, A novel proof of concept for capturing the diversity of endophytic fungi preserved in herbarium specimens. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* **2019**, *374*, p. 20170395.
- [197] Yang J. Y., Sanchez L. M., Rath C. M., Liu X., Boudreau P. D., Bruns N., Glukhov E., Wodtke A., de Felicio R., Fenner A., *et al.*, Molecular networking as a dereplication strategy. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, p. 1686–1699.
- [198] Hubert J., Nuzillard J.-M., Renault J.-H., Dereplication strategies in natural product research: how many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, p. 55–95.
- [199] Toropov O. V., 'Tandem Mass Spectral Library', consulté sur <https://www.nist.gov/programs-projects/tandem-mass-spectral-library>, **2012**.

- [200] Guijas C., Montenegro-Burke J. R., Domingo-Almenara X., Palermo A., Warth B., Hermann G., Koellensperger G., Huan T., Uritboonthai W., Aisporna A. E., *et al.*, METLIN: a technology platform for identifying knowns and unknowns. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, p. 3156–3164.
- [201] Quinn R. A., Nothias L.-F., Vining O., Meehan M., Esquenazi E., Dorrestein P. C., Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, p. 143–154.
- [202] Tautenhahn R., Patti G. J., Rinehart D., Siuzdak G., XCMS Online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, p. 5035–5039.
- [203] Wang M., Carver J. J., Phelan V. V., Sanchez L. M., Garg N., Peng Y., Nguyen D. D., Watrous J., Kapono C. A., Luzzatto-Knaan T., *et al.*, Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, p. 828–837.
- [204] Olivon F., Elie N., Grelier G., Roussi F., Litaudon M., Touboul D., Metgem software for the generation of molecular networks based on the t-SNE algorithm. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, p. 13900–13908.
- [205] Olivon F., Grelier G., Roussi F., Litaudon M., Touboul D., MZmine 2 Data-Preprocessing To Enhance Molecular Networking Reliability. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, p. 7836–7840.
- [206] Ramos A. E. F., Evanno L., Poupon E., Champy P., Beniddir M. A., Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36*, p. 960–980.
- [207] Olivon F., Remy S., Grelier G., Apel C., Eydoux C., Guillemot J.-C., Neyts J., Delang L., Touboul D., Roussi F., *et al.*, Antiviral compounds from *Codiaeum peltatum* targeted by a multi-informative molecular networks approach. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, p. 330–340.
- [208] Floros D. J., Jensen P. R., Dorrestein P. C., Koyama N., A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. *Metabolomics* **2016**, *12*, p. 145.
- [209] Liaw C.-C., Chen P.-C., Shih C.-J., Tseng S.-P., Lai Y.-M., Hsu C.-H., Dorrestein P. C., Yang Y.-L., Vitroprocines, new antibiotics against *Acinetobacter baumannii*, discovered from marine *Vibrio* sp. QWI-06 using mass-spectrometry-based metabolomics approach. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, p. 12856.
- [210] Crüsemann M., O'Neill E. C., Larson C. B., Melnik A. V., Floros D. J., da Silva R. R., Jensen P. R., Dorrestein P. C., Moore B. S., Prioritizing natural product diversity in a collection of 146 bacterial strains based on growth and extraction protocols. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, p. 588–597.
- [211] Sidebottom A. M., Johnson A. R., Karty J. A., Trader D. J., Carlson E. E., Integrated metabolomics approach facilitates discovery of an unpredicted natural product suite from *Streptomyces coelicolor* M145. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, p. 2009–2016.
- [212] Bertin M. J., Schwartz S. L., Lee J., Korobeynikov A., Dorrestein P. C., Gerwick L., Gerwick W. H., Spongiosine production by a *Vibrio harveyi* strain associated with the sponge *Tectitethya crypta*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, p. 493–499.
- [213] Kleigrewe K., Almaliti J., Tian I. Y., Kinnel R. B., Korobeynikov A., Monroe E. A., Duggan B. M., Di Marzo V., Sherman D. H., Dorrestein P. C., *et al.*, Combining mass spectrometric metabolic profiling with genomic analysis: a powerful approach for discovering natural products from Cyanobacteria. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, p. 1671–1682.
- [214] Duncan K. R., Crüsemann M., Lechner A., Sarkar A., Li J., Ziemert N., Wang M., Bandeira N., Moore B. S., Dorrestein P. C., *et al.*, Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *Salinispora* species. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, p. 460–471.
- [215] Butler M. S., Blaskovich M. A., Cooper M. A., Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, p. 3–24.
- [216] Miao V., Coëffet-Legal M.-F., Brian P., Brost R., Penn J., Whiting A., Martin S., Ford R., Parr I., Bouchard M., *et al.*, Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **2005**, *151*, p. 1507–1523.

- [217] Bailey A. M., Alberti F., Kilaru S., Collins C. M., de Mattos-Shiple K., Hartley A. J., Hayes P., Griffin A., Lazarus C. M., Cox R. J., *et al.*, Identification and manipulation of the pleuromutilin gene cluster from *Clitopilus passeckerianus* for increased rapid antibiotic production. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, p. 25202.
- [218] Erb W., Zhu J., From natural product to marketed drug: the Tiacumicin odyssey. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, p. 161–174.
- [219] Davies J., Davies D., Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, p. 417–433.
- [220] Kaur D. C., Chate S. S., Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to newer antibiotic. *J. Global Infect. Dis.* **2015**, *7*, p. 78.
- [221] Tong S. Y. C., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L., Fowler V. G., *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, p. 603–661.
- [222] Enright M. C., Robinson D. A., Randle G., Feil E. J., Grundmann H., Spratt B. G., The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, p. 7687–7692.
- [223] Strauß L., Stegger M., Akpaka P. E., Alabi A., Breurec S., Coombs G., Egyir B., Larsen A. R., Laurent F., Monecke S., *et al.*, Origin, evolution, and global transmission of community-acquired *Staphylococcus aureus* ST8. *PNAS* **2017**, *114*, p. E10596–E10604.
- [224] Weber R. W. S., Stenger E., Meffert A., Hahn M., Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? *Mycol. Res.* **2004**, *108*, p. 662–671.
- [225] Janda J. M., Abbott S. L., 16s rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, p. 2761–2764.
- [226] Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A., Chen W., Consortium F. B., Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* **2012**, *109*, p. 6241–6246.
- [227] Wang A., Ash G. J., Whole genome phylogeny of *Bacillus* by feature frequency profiles (FFP). *Sci. Rep.* **2015**, *5*, p. 13644.
- [228] Xu D., Côté J.-C., Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, p. 695–704.
- [229] Paradis S., Boissinot M., Paquette N., Bélanger S. D., Martel E. A., Boudreau D. K., Picard F. J., Ouellette M., Roy P. H., Bergeron M. G., Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, p. 2013–2025.
- [230] Duan Y.-Q., Zhou X.-K., Di-Yan L., Li Q.-Q., Dang L.-Z., Zhang Y.-G., Qiu L.-H., Nimaichand S., Li W.-J., *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2015**, *108*, p. 1161–1169.
- [231] Johansen J. E., Binnerup S. J., Kroer N., Mølbak L., *Luteibacter rhizovicinus* gen. nov., sp. nov., a yellow-pigmented gammaproteobacterium isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, p. 2285–2291.
- [232] Dobritsa A. P., Linardopoulou E. V., Samadpour M., Transfer of 13 species of the genus *Burkholderia* to the genus *Caballeronia* and reclassification of *Burkholderia jirisanensis* as *Paraburkholderia jirisanensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, p. 3846–3853.
- [233] Samerpitak K., Gerrits van den Ende A. H. G., Menken S. B. J., de Hoog G. S., Three new species of the genus *Ochroconis*. *Mycopathologia* **2015**, *180*, p. 7–17.
- [234] Braun U., Crous P. W., Dugan F., Groenewald J. Z. (Ewald), Sybren De Hoog G., Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycol. Progress* **2003**, *2*, p. 3–18.
- [235] Yoon S. I., Kim S. Y., Lim Y. W., Jung H. S., Phylogenetic evaluation of steroid fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *13*, p. 406–414.

- [236] Samson R. A., Visagie C. M., Houbraken J., Hong S.-B., Hubka V., Klaassen C. H. W., Perrone G., Seifert K. A., Susca A., Tanney J. B., *et al.*, Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* **2014**, *78*, p. 141–173.
- [237] Rehner S. A., Samuels G. J., Molecular systematics of the Hypocreales: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. *Can. J. Bot.* **2011**, *75*, p. 816–823.
- [238] Watanabe M., Yonezawa T., Lee K., Kumagai S., Sugita-Konishi Y., Goto K., Hara-Kudo Y., Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. *BMC Evol. Biol.* **2011**, *11*, p. 322.
- [239] Bavykin S. G., Lysov Y. P., Zakhariyev V., Kelly J. J., Jackman J., Stahl D. A., Cherni A., Use of 16s rRNA, 23s rRNA, and *gyrb* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, p. 3711–3730.
- [240] Gomila M., Peña A., Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E., Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, p. 214–226.
- [241] Hawksworth D. L., The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* **1991**, *95*, p. 641–655.
- [242] O'Brien H. E., Parrent J. L., Jackson J. A., Moncalvo J.-M., Vilgalys R., Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, p. 5544–5550.
- [243] Taylor D. L., Hollingsworth T. N., McFarland J. W., Lennon N. J., Nusbaum C., Ruess R. W., A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecol. Monogr.* **2014**, *84*, p. 3–20.
- [244] Schubert K., Groenewald J. Z., Braun U., Dijksterhuis J., Starink M., Hill C. F., Zalar P., de Hoog G. S., Crous P. W., Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Stud. Mycol.* **2007**, *58*, p. 105–156.
- [245] Skouboe P., Frisvad J. C., Taylor J. W., Lauritsen D., Boysen M., Rossen L., Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol. Res.* **1999**, *103*, p. 873–881.
- [246] O'Donnell K., Cigelnik E., Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1997**, *7*, p. 103–116.
- [247] Bahl J., Jeewon R., Hyde K. D., Phylogeny of *Rosellinia capetribulensis* sp. nov. and its allies (Xylariaceae). *Mycologia* **2005**, *97*, p. 1102–1110.
- [248] Glaeser S. P., Kämpfer P., Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* **2015**, *38*, p. 237–245.
- [249] Raja H. A., Miller A. N., Pearce C. J., Oberlies N. H., Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, p. 756–770.
- [250] Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Virdi J. S., MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, p. 791.
- [251] Anhalt J. P., Fenselau Catherine., Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, p. 219–225.
- [252] Lévesque S., Dufresne P. J., Soualhine H., Domingo M.-C., Bekal S., Lefebvre B., Tremblay C., A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLOS ONE* **2015**, *10*, p. e0144878.
- [253] Li T. Y., Liu B. H., Chen Y. C., Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, p. 2393–2400.
- [254] Paul S., Singh P., Rudramurthy S. M., Chakrabarti A., Ghosh A. K., Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: protocol standardization and database expansion for rapid identification of clinically important molds. *Future Microbiol.* **2017**, *12*, p. 1457–1466.
- [255] Vidal-Acuña M. R., Ruiz-Pérez de Pipaón M., Torres-Sánchez M. J., Aznar J., Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption

- ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med. Mycol.* **2018**, *56*, p. 838–846.
- [256] Lau S. K. P., Lam C. S. K., Ngan A. H. Y., Chow W.-N., Wu A. K. L., Tsang D. N. C., Tse C. W. S., Que T.-L., Tang B. S. F., Woo P. C. Y., Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of mold and yeast cultures of *Penicillium marneffeii*. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, p. 36.
- [257] Marinach-Patrice C., Lethuillier A., Marly A., Brossas J.-Y., Gené J., Symoens F., Detry A., Guarro J., Mazier D., Hennequin C., Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, p. 634–642.
- [258] Marklein G., Josten M., Klanke U., Müller E., Horré R., Maier T., Wenzel T., Kostrzewa M., Bierbaum G., Hoerauf A., *et al.*, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, p. 2912–2917.
- [259] Theel E. S., Hall L., Mandrekar J., Wengenack N. L., Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, p. 4067–4071.
- [260] Packeu A., Hendrickx M., Beguin H., Martiny D., Vandenberg O., Detandt M., Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med. Mycol.* **2013**, *51*, p. 580–585.
- [261] Du Z., Yang R., Guo Z., Song Y., Wang J., Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, p. 5487–5491.
- [262] Majcherczyk P. A., McKenna T., Moreillon P., Vaudaux P., The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *255*, p. 233–239.
- [263] Griffin P. M., Price G. R., Schooneveldt J. M., Schlebusch S., Tilse M. H., Urbanski T., Hamilton B., Venter D., Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant Enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, p. 2918–2931.
- [264] Jung J. S., Popp C., Sparbier K., Lange C., Kostrzewa M., Schubert S., Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of  $\beta$ -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, p. 924–930.
- [265] Hrabák J., Studentová V., Walková R., Zemlicková H., Jakubu V., Chudácková E., Gniadkowski M., Pfeifer Y., Perry J. D., Wilkinson K., *et al.*, Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, p. 2441–2443.
- [266] Sakarikou C., Ciotti M., Dolfa C., Angeletti S., Favalli C., Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, p. 54.
- [267] Stets M. I., Pinto A. S., Huergo L. F., de Souza E. M., Guimarães V. F., Alves A. C., Steffens M. B. R., Monteiro R. A., Pedrosa F. de O., Cruz L. M., Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *J. Biotechnol.* **2013**, *165*, p. 167–174.
- [268] Dieckmann R., Graeber I., Kaesler I., Szewzyk U., von Döhren H., Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, p. 539–548.
- [269] Ferreira L., Sánchez-Juanes F., García-Fraile P., Rivas R., Mateos P. F., Martínez-Molina E., González-Buitrago J. M., Velázquez E., MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PLoS ONE* **2011**, *6*, p. e20223.

- [270] Bruker Daltonik GmbH, Instructions for Use MALDI Biotarget 48. **2011**.
- [271] Kaneda T., Fatty acids in the genus *Bacillus* I. iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *J. Bacteriol.* **1967**, *93*, p. 894–903.
- [272] Lambert M. A., Hickman-Brenner F. W., Farmer J. J., Moss C. W., Differentiation of Vibionaceae species by their cellular fatty acid composition. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1983**, *33*, p. 777–792.
- [273] Canonica F. P., Pisano M. A., Gas-liquid chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae*. *J. Clin. Microbiol.* **1988**, *26*, p. 681–685.
- [274] 'Soil Microbiology | Fatty Acid Analysis | PLFA Analysis | MIDI, Inc.', consulté sur <http://midi-inc.com/>, **2019**.
- [275] Voorhees K. J., Jensen K. R., McAlpin C. R., Rees J. C., Cody R., Ubukata M., Cox C. R., Modified MALDI MS fatty acid profiling for bacterial identification. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48*, p. 850–855.
- [276] Stahl P. D., Klug M. J., Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, p. 4136–4146.
- [277] Stübiger G., Wuczowski M., Mancera L., Lopandic K., Sterflinger K., Belgacem O., Characterization of yeasts and filamentous fungi using MALDI lipid phenotyping. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *130*, p. 27–37.
- [278] Price N. P. J., Rooney A. P., Swezey J. L., Perry E., Cohan F. M., Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *271*, p. 83–89.
- [279] Choudhary D. K., Johri B. N., Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.* **2009**, *164*, p. 493–513.
- [280] Depoorter E., Bull M. J., Peeters C., Coenye T., Vandamme P., Mahenthiralingam E., *Burkholderia*: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, p. 5215–5229.
- [281] Miotto-Vilanova L., Jacquard C., Courteaux B., Wortham L., Michel J., Clément C., Barka E. A., Sanchez L., *Burkholderia phytofirmans* PsJN confers grapevine resistance against *Botrytis cinerea* via a direct antimicrobial effect combined with a better resource mobilization. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, p. 1236.
- [282] Pinedo I., Ledger T., Greve M., Poupin M. J., *Burkholderia phytofirmans* PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in *Arabidopsis thaliana* salt tolerance. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, p. 466.
- [283] Kämpfer P., Lodders N., Falsen E., *Luteibacter anthropi* sp. nov., isolated from human blood, and reclassification of *Dyella yejuensis* Kim et al. 2006 as *Luteibacter yejuensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, p. 2884–2887.
- [284] Naveed M., Mitter B., Yousaf S., Pastar M., Afzal M., Sessitsch A., The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biol. Fertil. Soils* **2014**, *50*, p. 249–262.
- [285] Sandhiya G. S., Sugitha T. C. K., Balachandar D., Kumar K., Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *Indian J. Exp. Biol.* **2005**, *43*, p. 802–807.
- [286] Quecine M. C., Araújo W. L., Rossetto P. B., Ferreira A., Tsui S., Lacava P. T., Mondin M., Azevedo J. L., Pizzirani-Kleiner A. A., Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, p. 7511–7518.
- [287] Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M. K., Golec M., Milanowski J., *Pantoea agglomerans* : a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. *Ann Agric Environ Med.* **2016**, *23*, p. 206–222.
- [288] Kim I.-Y., Pusey P. L., Zhao Y., Korban S. S., Choi H., Kim K. K., Controlled release of *Pantoea agglomerans* E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, p. 109–115.

- [289] Nakayama T., Homma Y., Hashidoko Y., Mizutani J., Tahara S., Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, p. 4334–4339.
- [290] Zhang Z., Yuen G. Y., Sarath G., Penheiter A. R., Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology* **2001**, *91*, p. 204–211.
- [291] Messiha N. A. S., van Diepeningen A. D., Farag N. S., Abdallah S. A., Janse J. D., van Bruggen A. H. C., *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. *Eur. J. Plant Pathol.* **2007**, *118*, p. 211–225.
- [292] Martin R., Gazis R., Skaltsas D., Chaverri P., Hibbett D., Unexpected diversity of basidiomycetous endophytes in sapwood and leaves of *Hevea*. *Mycologia* **2015**, *107*, p. 284–297.
- [293] Fröhlich J., Hyde K. D., New *Oxydothis* species associated with palm leaf spots in north Queensland, Australia. *Mycol. Res.* **1994**, *98*, p. 213–218.
- [294] Shenoy B. D., Jeewon R., Hyde K. D., *Oxydothis bambusicola*, a new Ascomycete with a huge subapical ascus ring found on bamboo in Hong Kong. *Nova Hedwigia* **2005**, *80*, p. 511–518.
- [295] Vinit K., Doilom M., Wanasinghe D., Bhat D., Brahmanage R., Jeewon R., Xiao Y., Hyde K., Phylogenetic placement of *Akanthomyces muscarius*, a new endophyte record from *Nypa fruticans* in Thailand. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* **2018**, *8*, p. 404–417.
- [296] Donald J., Barthélemy M., Gazal N., Eveno Y., Manzi S., Eparvier V., Stien D., Roy M., Tropical palm endophytes exhibit low competitive structuring when assessed using co-occurrence and antipathogen activity analysis. *Front. For. Glob. Change* **2019**, *soumis*.
- [297] Jakuschkin B., Fievet V., SCHWALLER L., Fort T., Robin C., Vacher C., Deciphering the pathobiome: intra- and interkingdom interactions involving the pathogen erysiphe althitoides. *Microb. Ecol.* **2016**, *72*, p. 870–880.
- [298] ‘Staphylocoque’, consulté sur <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>, **2016**.
- [299] Otto M., *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *0*, p. 32–37.
- [300] Dumitrescu O., Dauwalder O., Boisset S., Reverdy M.-É., Tristan A., Vandenesch F., Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* - Les points-clés en 2010. *Med. Sci.* **2010**, *26*, p. 943–949.
- [301] Asahi M., Lindquist R., Fukuyama K., Apodaca G., Epstein W. L., McKerrow J. H., Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.* **1985**, *232*, p. 139–144.
- [302] Paião F. G., Segato F., Cursino-Santos J. R., Peres N. T. A., Martinez-Rossi N. M., Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *271*, p. 180–186.
- [303] Mendes N. S., Bitencourt T. A., Sanches P. R., Silva-Rocha R., Martinez-Rossi N. M., Rossi A., Transcriptome-wide survey of gene expression changes and alternative splicing in *Trichophyton rubrum* in response to undecanoic acid. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, p. 2520.
- [304] Persinoti G. F., de Aguiar Peres N. T., Jacob T. R., Rossi A., Vêncio R. Z., Martinez-Rossi N. M., RNA-sequencing analysis of *Trichophyton rubrum* transcriptome in response to sublethal doses of acriflavine. *BMC Genomics* **2014**, *15*, p. S1.
- [305] Ghelardi E., Celandroni F., Gueye S. A., Salvetti S., Senesi S., Bulgheroni A., Mailland F., Potential of Ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, p. 2825–2829.
- [306] Fourie G., Steenkamp E. T., Ploetz R. C., Gordon T. R., Viljoen A., Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infect. Genet. Evol.* **2011**, *11*, p. 533–542.
- [307] Armstrong G. M., Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilts of the Cucurbitaceae. *Phytopathology* **1978**, *68*, p. 19.
- [308] Ploetz R. C., Panama disease: a classic and destructive disease of banana. *Plant Health Prog.* **2000**, *1*, p. 10.
- [309] Edel-Hermann V., Lecomte C., Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology* **2018**, *109*, p. 512–530.

- [310] Nel B., Steinberg C., Labuschagne N., Viljoen A., Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Prot.* **2007**, *26*, p. 697–705.
- [311] Bennett R. S., Spurgeon D. W., DeTar W. R., Gerik J. S., Hutmacher R. B., Hanson B. D., Efficacy of four soil treatments against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* race 4 on cotton. *Plant Dis.* **2011**, *95*, p. 967–976.
- [312] Amini J., Sidovich D., The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *J. Plant Prot. Res.* **2010**, *50*, p. 172–178.
- [313] Cao L., Qiu Z., You J., Tan H., Zhou S., Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *247*, p. 147–152.
- [314] Jie L., Zifeng W., Lixiang C., Hongming T., Patrik I., Zide J., Shining Z., Artificial inoculation of banana tissue culture plantlets with indigenous endophytes originally derived from native banana plants. *Biol. Control* **2009**, *51*, p. 427–434.
- [315] Redder P., Linder P., New range of vectors with a stringent 5-fluoroorotic acid-based counterselection system for generating mutants by allelic replacement in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, p. 3846–3854.
- [316] McClean K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W., *et al.*, Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **1997**, *143*, p. 3703–3711.
- [317] Ruimy R., Andremont A., Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation* **2004**, *13*, p. 176–184.
- [318] Andersen J. B., Heydorn A., Hentzer M., Eberl L., Geisenberger O., Christensen B. B., Molin S., Givskov M., GFP-based *N*-acylhomoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, p. 575–585.
- [319] Steidle A., Allesen-Holm M., Riedel K., Berg G., Givskov M., Molin S., Eberl L., Identification and characterization of an *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, p. 6371–6382.
- [320] Lee J., Zhang L., The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **2015**, *6*, p. 26–41.
- [321] 'All names cited in the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: List M-R', consulté sur <http://www.bacterio.net/-allnamesmr.html>, **2019**.
- [322] Sawana A., Adeolu M., Gupta R. S., Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* **2014**, *5*, p. 429.
- [323] Mahenthiralingam E., Baldwin A., Dowson C., *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, p. 1539–51.
- [324] Coenye T., Vandamme P., Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, p. 719–729.
- [325] Goris J., De Vos P., Caballero-Mellado J., Park J., Falsen E., Quensen J. F., Tiedje J. M., Vandamme P., Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, p. 1677–1681.
- [326] Esmaeel Q., Miotto L., Rondeau M., Leclère V., Clément C., Jacquard C., Sanchez L., Barka E. A., *Paraburkholderia phytofirmans* PsJn-plants interaction: from perception to the induced mechanisms. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, p. 2093.
- [327] Reis V. M., Estrada-de los Santos P., Tenorio-Salgado S., Vogel J., Stoffels M., Guyon S., Mavingui P., Baldani V. L. D., Schmid M., Baldani J. I., *et al.*, *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, p. 2155–2162.

- [328] Schmidt S., Blom J. F., Pernthaler J., Berg G., Baldwin A., Mahenthiralingam E., Eberl L., Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, p. 1422–1437.
- [329] Lin Z., Falkinham J. O., Tawfik K. A., Jeffs P., Bray B., Dubay G., Cox J. E., Schmidt E. W., Burkholdines from *Burkholderia ambifaria*: antifungal agents and possible virulence factors. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, p. 1518–1523.
- [330] *Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food. Tolerances and exemptions for pesticide chemical residues in food* **2004**.
- [331] Li S.-Z., Xu R., Ahmar M., Goux-Henry C., Queneau Y., Soullère L., Influence of the D/L configuration of *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) and analogues on their Lux-R dependent quorum sensing activity. *Bioorg. Chem.* **2018**, *77*, p. 215–222.
- [332] Fdhila F., Vázquez V., Sánchez J. L., Riguera R., dd-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, p. 1299–1301.
- [333] Adamczeski M., Reed A. R., Crews P., New and known diketopiperazines from the Caribbean sponge, *Calyx cf. podatypa*. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, p. 201–208.
- [334] Patel N. M., Moore J. D., Blackwell H. E., Amador-Noguez D., Identification of unanticipated and novel *N*-acyl-*L*-homoserine lactones (AHLs) using a sensitive non-targeted LC-MS/MS method. *PLOS ONE* **2016**, *11*, p. e0163469.
- [335] Eberl L., Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, *296*, p. 103–110.
- [336] Suárez-Moreno Z. R., Caballero-Mellado J., Venturi V., The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum sensing system, which is tightly regulated by the RsaL repressor. *Microbiology* **2008**, *154*, p. 2048–2059.
- [337] Suárez-Moreno Z. R., Devescovi G., Myers M., Hallack L., Mendonça-Previato L., Caballero-Mellado J., Venturi V., Commonalities and differences in regulation of *N*-acyl homoserine lactone Quorum Sensing in the beneficial plant-associated *Burkholderia* species cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, p. 4302–4317.
- [338] Coutinho B. G., Mitter B., Talbi C., Sessitsch A., Bedmar E. J., Halliday N., James E. K., Cámara M., Venturi V., Regulon studies and in planta role of the BRaI/R Quorum-Sensing system in the plant-beneficial *Burkholderia* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, p. 4421–4432.
- [339] Costa O. Y. A., Raaijmakers J. M., Kuramae E. E., Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, p. 1636.
- [340] Vu B., Chen M., Crawford R. J., Ivanova E. P., Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **2009**, *14*, p. 2535–2554.
- [341] Zúñiga A., Donoso R. A., Ruiz D., Ruz G. A., González B., Quorum-Sensing systems in the plant growth-promoting bacterium *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN exhibit cross-regulation and are involved in biofilm formation. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2017**, *30*, p. 557–565.
- [342] Qazi S., Middleton B., Muharram S. H., Cockayne A., Hill P., O’Shea P., Chhabra S. R., Cámara M., Williams P., *N*-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, p. 910–919.
- [343] Yates E. A., Philipp B., Buckley C., Atkinson S., Chhabra S. R., Sockett R. E., Goldner M., Dessaux Y., Cámara M., Smith H., *et al.*, *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, p. 5635–5646.
- [344] Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J., The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling Behav.* **2009**, *4*, p. 701–712.
- [345] Mathesius U., Mulders S., Gao M., Teplitski M., Caetano-Anolles G., Rolfe B. G., Bauer W. D., Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial Quorum-Sensing signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, p. 1444–1449.

- [346] Hernández-Reyes C., Schenk S. T., Neumann C., Kogel K.-H., Schikora A., *N*-acyl-homoserine lactones-producing bacteria protect plants against plant and human pathogens. *Microb. Biotechnol.* **2014**, *7*, p. 580–588.
- [347] von Rad U., Klein I., Dobrev P. I., Kottova J., Zazimalova E., Fekete A., Hartmann A., Schmitt-Kopplin P., Durner J., Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-*DL*-homoserine-lactone, a bacterial Quorum Sensing molecule produced in the rhizosphere. *Planta* **2008**, *229*, p. 73–85.
- [348] Barthélemy M., Elie N., Pellissier L., Wolfender J.-L., Stien D., Touboul D., Eparvier V., Structural identification of antibacterial lipids from amazonian palm tree endophytes through the molecular network approach. *International Journal of Molecular Sciences* **2019**, *20*, p. 2006.
- [349] Pluskal T., Castillo S., Villar-Briones A., Oresic M., MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, p. 395.
- [350] Pecci Y., Rivardo F., Martinotti M. G., Allegrone G., LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, p. 772–778.
- [351] Dertz E. A., Xu J., Stintzi A., Raymond K. N., Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, p. 22–23.
- [352] Nakahata M., Imaida M., Ozaki H., Harada T., Tai A., The preparation of optically pure 3-hydroxyalkanoic acid. The enantioface-differentiating hydrogenation of the C=O double bond with modified raney nickel. *BCSJ* **1982**, *55*, p. 2186–2189.
- [353] Wohlrab A., Lamer R., VanNieuwenhze M. S., Total synthesis of Plusbacin A3: a depsipeptide antibiotic active against vancomycin-resistant bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, p. 4175–4177.
- [354] Kodato S., Nakagawa M., Nakayama K., Hino T., Synthesis of Cerebroside B1b with antiulcerogenic activity I. Synthesis of ceramides with optically active  $\alpha$ -hydroxypalmitic acids. *Tetrahedron* **1989**, *45*, p. 7247–7262.
- [355] Vrkoslav V., Cvačka J., Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, p. 244–250.
- [356] Wang X., Gong X., Li P., Lai D., Zhou L., Structural diversity and biological activities of cyclic depsipeptides from fungi. *Molecules* **2018**, *23*, p. E169.
- [357] Li G., Kusari S., Golz C., Strohmam C., Spitteller M., Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53. *RSC Advances* **2016**, *6*, p. 54092–54098.
- [358] Helaly S. E., Kuephadungphan W., Phongpaichit S., Luangsa-ard J. J., Rukachaisirikul V., Stadler M., Helaly S. E., Kuephadungphan W., Phongpaichit S., Luangsa-ard J. J., *et al.*, Five unprecedented secondary metabolites from the spider parasitic fungus *Akanthomyces novoguineensis*. *Molecules* **2017**, *22*, p. 991.
- [359] Kuephadungphan W., Helaly S. E., Daengrot C., Phongpaichit S., Luangsa-Ard J. J., Rukachaisirikul V., Stadler M., Akanthopyrones A-D,  $\alpha$ -pyrones bearing a 4-O-methyl- $\beta$ -D-glucopyranose moiety from the spider-associated ascomycete *Akanthomyces novoguineensis*. *Molecules* **2017**, *22*, p. E1202.
- [360] Vega F. E., Posada F., Catherine Aime M., Pava-Ripoll M., Infante F., Rehner S. A., Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Control* **2008**, *46*, p. 72–82.
- [361] Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrímsson O., Thormar H., Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* **2001**, *109*, p. 670–678.
- [362] Parsons J. B., Yao J., Frank M. W., Jackson P., Rock C. O., Membrane disruption by antimicrobial fatty acids releases low-molecular-weight proteins from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, p. 5294–5304.
- [363] Kabara J. J., Swieczkowski D. M., Conley A. J., Truant J. P., Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *2*, p. 23–28.

- [364] Kodicek E., Worden A. N., The effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helveticus* and other Gram-positive micro-organisms. *Biochem. J.* **1945**, *39*, p. 78–85.
- [365] Dean R., Van Kan J. A. L., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., *et al.*, The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, p. 414–430.
- [366] Silva C., Michereff S., Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. *Revista Caatinga* **2014**, *26*, p. 130–138.
- [367] Douanla-Meli C., Unger J.-G., Phylogenetic study of the *Colletotrichum* species on imported citrus fruits uncovers a low diversity and a new species in the *Colletotrichum gigasporum* complex. *Fungal Biol.* **2017**, *121*, p. 858–868.
- [368] Espada A., Rivera-Sagredo A., de la Fuente J., Hueso-Rodriguez J., Elson S., New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. *Tetrahedron* **1997**, *53*, p. 6485–6492.
- [369] Isaka M., Palasarn S., Sriklung K., Kocharin K., Cyclohexadepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, p. 1680–1682.
- [370] Frost D. J., Gunstone F. D., The PMR analysis of non-conjugated alkenoic and alkynoic acids and esters. *Chem. Phys. Lipids* **1975**, *15*, p. 53–85.
- [371] Garrity G. M., Giacobbe R., Greenspan M. D., Hensens O. D., Joshua H., Matas M. T. D., Martin I., Milligan J. A., Del Val S. M., Rozdilsky W., *et al.*, Novel HMG-CoA synthase inhibitors., *Novel HMG-CoA synthase inhibitors*, **1991**, United States Patent 5064856.
- [372] García-Pajón C. M., Collado I. G., Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, p. 426–431.
- [373] Gohbara M., Kosuge Y., Yamasaki S., Kimura Y., Suzuki A., Tamura S., Isolation, structures and biological activities of Colletotrichins, phytotoxic substances from *Colletotrichum nicotianae*. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, p. 1037–1043.
- [374] Liu H.-X., Tan H.-B., Chen Y.-C., Li S.-N., Li H.-H., Zhang W.-M., Secondary metabolites from the *Colletotrichum gloeosporioides* A12, an endophytic fungus derived from *Aquilaria sinensis*. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, p. 2360–2365.
- [375] Wang W.-X., Kusari S., Laatsch H., Golz C., Kusari P., Strohmman C., Kayser O., Spiteller M., Antibacterial Azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, p. 704–710.
- [376] Carvalho C. R. de, Ferreira-D’Silva A., Wedge D. E., Cantrell C. L., Rosa L. H., Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miriciae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal plants. *Can. J. Microbiol.* **2018**, *64*, p. 835–843.
- [377] Jouda J.-B., Tamokou J.-D., Mbazoa C. D., Douala-Meli C., Sarkar P., Bag P. K., Wandji J., Antibacterial and cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. harbored in *Garcinia kola* (Heckel) nut. *BMC Complement Altern. Med.* **2016**, *16*, p. 462.
- [378] Kim E. L., Li J. L., Dang H. T., Hong J., Lee C.-O., Kim D.-K., Yoon W. D., Kim E., Liu Y., Jung J. H., Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, p. 3126–3129.
- [379] Ren Y., Strobel G., Graff J., Jutila M., Park S., Gosh S., Teplow D., Condrón M., Pang E., Hess W., *et al.*, Colutellin A, an immunosuppressive peptide from *Colletotrichum dematium*. *Microbiology* **2008**, *154*, p. 1973–1979.
- [380] Wang X., Lin M., Xu D., Lai D., Zhou L., Structural diversity and biological activities of fungal cyclic peptides, excluding cyclodipeptides. *Molecules* **2017**, *22*, p. E2069.
- [381] Ornelles D. A., Fey E. G., Penman S., Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, p. 1650–1662.
- [382] Udagawa T., Yuan J., Panigrahy D., Chang Y. H., Shah J., D’Amato R. J., Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, p. 421–427.
- [383] Rogers J. D., Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycol. Res.* **2000**, *104*, p. 1412–1420.
- [384] Rudiyanayah, Alimuddin A. H., Masriani, Muharini R., Liu Z., Lin W., Hartmann R., Proksch P., Arugosins O-Q, new fungal metabolites from the fungus Xylariaceae sp. isolated from leaves of *Lansium domesticum* (Meliaceae). *Nat. Prod. Commun.* **2019**, *14*.

- [385] Mühlbauer A., Triebel D., Persoh D., Wollweber H., Seip S., Stadler M., Macrocarpones, novel metabolites from stromata of *Hypoxylon macrocarpum*, and new evidence on the chemotaxonomy of *Hypoxylon* species. *Mycol. Prog.* **2002**, *1*, p. 235–248.
- [386] Malet-Cascón L., Romero F., Espliego-Vázquez F., Grávalos D., Fernández-Puentes J. L., IB-00208, a new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. *J. Antibiot.* **2003**, *56*, p. 219–225.
- [387] Díaz S., González A., Bradshaw B., Cuesta J., Bonjoch J., Enantioselective Syntheses of (+)-Xylarenal A and ent-Xylarenal A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, p. 3749–3752.
- [388] Worapong J., Strobel G., Ford E. J., Li J. Y., Baird G., Hess W. M., *Muscodor albus* anam. gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon* **2001**, *79*, p. 67–79.
- [389] Pena L. C., Jungklaus G. H., Savi D. C., Ferreira-Maba L., Serviensi A., Maia B. H. L. N. S., Annes V., Galli-Terasawa L. V., Glienke C., Kava V., *Muscodor brasiliensis* sp. nov. produces volatile organic compounds with activity against *Penicillium digitatum*. *Microbiol. Res.* **2019**, *221*, p. 28–35.
- [390] Liuzzi V. C., Mirabelli V., Cimmarusti M. T., Haidukowski M., Leslie J. F., Logrieco A. F., Caliandro R., Fanelli F., Mulè G., Enniatin and Beauvericin biosynthesis in *Fusarium* species: production profiles and structural determinant prediction. *Toxins* **2017**, *9*, p. 45.
- [391] Talapatra S. K., Karmacharya B., De S. C., Talapatra B., (-)-Regiolone, an  $\alpha$ -tetralone from *Juglans regia*: structure, stereochemistry and conformation. *Phytochemistry* **1988**, *27*, p. 3929–3932.
- [392] Guo C.-J., Yeh H.-H., Chiang Y.-M., Sanchez J. F., Chang S.-L., Bruno K. S., Wang C. C. C., Biosynthetic pathway for the Epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, p. 7205–7213.
- [393] Yagi H., Matsunaga S., Fusetani N., Purpuramines A-I, new bromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Psammaphysilla purpurea*. *Tetrahedron* **1993**, *49*, p. 3749–3754.
- [394] Kawaguchi M., Fukuda T., Uchida R., Nonaka K., Masuma R., Tomoda H., A new ascochlorin derivative from *Cylindrocarpon* sp. FKI-4602. *J. Antibiot.* **2013**, *66*, p. 23–29.
- [395] Jiang J., Yu X., Fang Y., Zhang Y., Li N., Wang K., Chemical constituents of the roots of *Patrinia scabiosaefolia* and the cytotoxicity of Patrineolignans A and B. *Chem. Nat. Compd.* **2017**, *53*, p. 143–146.
- [396] Kagamizono T., Nishino E., Matsumoto K., Kawashima A., Kishimoto M., Sakai N., He B. M., Chen Z. X., Adachi T., Morimoto S., Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, p. 1407–1412.
- [397] Langhanki J., Rudolph K., Erkel G., Opatz T., Total synthesis and biological evaluation of the natural product (-)-cyclonerodiol, a new inhibitor of IL-4 signaling. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, p. 9707–9715.
- [398] Smith S. G., Goodman J. M., Assigning stereochemistry to single diastereoisomers by GIAO NMR calculation: the DP4 probability. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, p. 12946–12959.
- [399] White T., Bruns T., Lee S., Taylor F. J. R. M., White T. J., Lee S.-H., Taylor L., Shawe-Taylor J., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in *PCR protocols: a guide to methods and applications*, **1990**, pp. 315–322.
- [400] Fagervold S. K., Intertaglia L., Batailler N., Bondoso J., Lebaron P., *Saonia flava* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from coastal seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, p. 3246–3250.
- [401] Ichihara K., Fukubayashi Y., Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, p. 635–640.

## Annexes

Annexes.....	230
Annexe S1 : Identification des micro-organismes endophytes et activité biologique de leur extrait AcOEt.....	235
Annexe S2 : Arbre phylogénétique sur le clade des <i>Bacillus</i> incluant les séquences 16S de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Escherichia coli</i> (X80725).....	240
Annexe S3 : Arbre phylogénétique sur le clade des Enterobacteriales incluant les séquences 16S de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Xenorhabdus nematophila</i> (AY278674). .....	241
Annexe S4 : Arbre phylogénétique sur le clade des Burkholderiaceae incluant les séquences 16S de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Ralstonia pickettii</i> (AH004177). .....	242
Annexe S5 : Arbre phylogénétique sur le clade des Gammaproteobacteria incluant les séquences 16S de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Escherichia coli</i> (E05133).....	243
Annexe S6 : Arbre phylogénétique sur le clade des <i>Endomelanconipsis</i> incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Saccharata proteae</i> (FJ896432).....	244
Annexe S7 : Arbre phylogénétique sur le clade des Agaricomycetes incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Tremella foliaceae</i> (AF042452).....	245
Annexe S8 : Arbre phylogénétique sur le clade des <i>Colletotrichum</i> incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Monilochaetes infuscans</i> (JQ005780). .....	246
Annexe S9 : Arbre phylogénétique sur le clade des Dothideomycetes incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Phomopsis vaccinii</i> (AF317578). .....	247
Annexe S10 : Arbre phylogénétique sur le clade des Eurotiomycetes incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Talaromyces flavus</i> (HQ191279). .....	248
Annexe S11 : Arbre phylogénétique sur le clade des Diaporthales incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Botryotinia rannunculi</i> (MH869860).....	249
Annexe S12 : Arbre phylogénétique sur le clade des Hypocreales incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Penicillium chrysogenum</i> (DQ336710).....	250
Annexe S13 : Arbre phylogénétique sur le clade des Xylariales incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Botryotinia rannunculi</i> (MH869860).....	251
Annexe S14 : Arbre phylogénétique sur le clade des Sordariomycetes incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe <i>Botryosphaeria ribis</i> (DQ267604). .....	252

Annexe S15 : Identification des souches de <i>Paraburkholderia</i> de notre communauté et activité antimicrobienne, cytotoxique et quorum quenching de leur extrait à l'AcOEt.....	253
Annexe S16 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la 3-OH-C <sub>14</sub> -HSL <b>(1)</b> avant dégradation..	254
Annexe S17 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la 3-OH-C <sub>14</sub> -HSL <b>(1)</b> en cours de dégradation. ....	254
Annexe S18 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la 3-oxo-C <sub>10</sub> -HSL <b>(2)</b> avant dégradation.	255
Annexe S19 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la 3-OH-C <sub>10</sub> -HSL <b>(3)</b> avant dégradation..	255
Annexe S20 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL <b>(4)</b> avant dégradation.	256
Annexe S21 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la 3-OH-C <sub>12</sub> -HSL <b>(5)</b> avant dégradation..	256
Annexe S22 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la 3-oxo-C <sub>14</sub> -HSL <b>(6)</b> avant dégradation.	257
Annexe S23 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la cyclo-( <i>S</i> -Pro- <i>S</i> -Ile) <b>(7)</b> .....	257
Annexe S24 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la cyclo-( <i>S</i> -Pro- <i>R</i> -Leu) <b>(8)</b> .....	258
Annexe S25 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la cyclo-( <i>S</i> -Pro- <i>R</i> -Phe) <b>(9)</b> .....	258
Annexe S26 : Profils UHPLC MS/MS des différentes espèces/ sous-espèces de <i>Paraburkholderia</i> sp.....	259
Annexe S27 : Quantités (mg) obtenu lors de l'extraction des souches BSNB-0661, BSNB-0670 et du milieu gélosé suivant les conditions de températures et de solvants.....	261
Annexe S28 : Liste des standards AHLs utilisés avec leur temps de rétention dans les conditions chromatographiques utilisées. A chaque standard, le <i>m/z</i> de l'ion correspondant à la molécule hydrolysée est associé, ainsi que le temps de rétention dans les conditions chromatographiques utilisées.....	262
Annexe S29 : Réseau moléculaire formé à partir de données UHPLC-MS/MS des extraits à l'AcOEt de <i>Paraburkholderia</i> sp. (BSNB-0661) cultivée à différentes températures. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par un diagramme circulaire dont les proportions dépendent de l'intégration du signal XIC de l'ion dans les extraits. ....	263
Annexe S30 : Réseau moléculaire formé à partir de données UHPLC-MS/MS des extraits à l'AcOEt de <i>Paraburkholderia</i> sp. (BSNB-0670) cultivée à différentes températures. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par un diagramme circulaire dont les proportions dépendent de l'intégration du signal XIC de l'ion dans les extraits. ....	264
Annexe S31 : Détermination des droites de calibration des standards AHLs à partir de leur dosage dans différentes solutions stock.....	265
Annexe 32 : Quantité (µg) en AHLs dans les extraits de <i>Paraburkholderia</i> sp.2 (BSNB-0661) et <i>Paraburkholderia</i> sp.8 (BSNB-0670). ....	266
Annexe 33 : Quantité (µg/mg d'extrait) en AHLs dans les extraits de <i>Paraburkholderia</i> sp.2 (BSNB-0661) et <i>Paraburkholderia</i> sp.8 (BSNB-0670), sur la moyenne des trois réplicats. ....	267
Annexe 34 : Zoom sur les clusters du réseau moléculaire formé avec les données UHPLC-MS/MS des 131 extraits à l'AcOEt des endophytes fongiques, clusters comportant des nœuds spécifiques aux extraits porteurs d'une activité antibactérienne contre SARM et cytotoxique sur la lignée MRC-5.....	268
Annexe 35 : Répartition des nœuds spécifiques aux extraits de <i>Fusarium</i> sp. au sein des clusters .....	271

Annexe 36 : Spectre de fragmentation du signal à $m/z$ 883,2625 dans l'extrait de BSNB-0730.271	
Annexe 37 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide ( <i>R</i> )-2-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque ( <b>10</b> ).....	272
Annexe 38 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide ( <i>R</i> )-3-hydroxy-14-méthylpentadécanoïque ( <b>11</b> ).....	272
Annexe 39 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide ( <i>S</i> )-β-hydroxypalmitique ( <b>12</b> ).....	273
Annexe 40 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide ( <i>R</i> )-3-hydroxy-15-méthylhexadécanoïque ( <b>13</b> ).....	273
Annexe 41 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide ( <i>R</i> )-3-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque ( <b>14</b> ).....	274
Annexe 42 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide 13-méthyltétradécanoïque ( <b>15</b> ). ...	274
Annexe 43 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide (9 <i>Z</i> )-hexadécenoïque ( <b>16</b> ).....	275
Annexe 44 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide 15-méthyl-(9 <i>Z</i> )-hexadécenoïque ( <b>17</b> ). .....	275
Annexe 45 : Spectres de fragmentation des acides (9 <i>Z</i> )-hexadécenoïque ( <b>16</b> ) et 15-méthyl-(9 <i>Z</i> )-hexadécenoïque ( <b>17</b> ) estérifiés. ....	276
Annexe 46 : Ions les plus intenses présents sur les empreintes protéiques MALDI-TOF de quarante isolats de <i>Colletotrichum</i> sp. (les ions de BSNB-0290 et BSNB-0646 ne sont pas détectés) La présence ou non d'ions en commun entre les souches permet un regroupement hiérarchique de ces souches. Les carrés rouges indiquent la présence de l'ion de masse associée dans l'empreinte protéique de l'isolat.....	277
Annexe 47 : Réseau moléculaire formé à partir des données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt de <i>Colletotrichum</i> sp. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par une répartition en diagramme circulaire du nœud suivant l'intégration du signal XIC.....	278
Annexe 48 : Représentation t-SNE du réseau moléculaire formé à partir des données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt de <i>Colletotrichum</i> sp. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par une répartition en diagramme circulaire du nœud suivant l'intégration du signal XIC. ....	279
Annexe 49 : Réseau moléculaire formé à partir des données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt de <i>Colletotrichum</i> sp.....	280
Annexe 50 : Représentation t-SNE du réseau moléculaire formé à partir des données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt de <i>Colletotrichum</i> sp.....	281
Annexe 51 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO) et spectre de fragmentation de la cyclo-(Phe-Leu-Leu-Val) ( <b>18</b> ).....	282
Annexe 52 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (600 MHz, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO) de la cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Leu) ( <b>19</b> )....	283
Annexe 53 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO) et spectre de fragmentation de la cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Ile) ( <b>20</b> ).....	284
Annexe 54 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la cytochalasine D ( <b>21</b> ).....	285
Annexe 55 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de la cytochalasine C ( <b>22</b> ).....	285
Annexe 56 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'hirsutatine A ( <b>23</b> ).....	286

Annexe 57 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), spectre de masse en haute résolution et comparaison entre le spectre ECD prédit et expérimental de la colletamide A <b>(24)</b> .....	287
Annexe 58 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), spectre de masse en haute résolution et comparaison des déplacements RMN- $^{13}\text{C}$ prédits et expérimentaux de la colletamide B <b>(25)</b> .....	291
Annexe 59 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), spectre de masse en haute résolution et comparaison entre le spectre ECD prédit et expérimental de la colletamide C <b>(26)</b> .....	296
Annexe 60 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), spectre de masse en haute résolution et comparaison des déplacements RMN- $^{13}\text{C}$ prédits et expérimentaux de la colletamide D <b>(27)</b> .....	300
Annexe S61 : Profils UV à 254 nm des extraits des extraits de Xylariaceae sp. (BSNB-0294, en rouge) et de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i> (en bleu) en co-culture. Du haut vers le bas : extrait de la culture seule à deux semaines, extrait en compétition à une semaine, extrait en compétition à deux semaines et extrait en compétition à trois semaines.....	304
Annexe S62 : Réseau moléculaire formé avec les données UHPLC-MS/MS des extraits de Xylariaceae sp. et de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> suivant les conditions et le temps de culture.....	305
Annexe S63 : Image par MALDI-TOF MS de la compétition entre <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> et BSNB-0294 à 23 jours de co-culture. Les trois ions les plus intenses de la compétition sont relevés : <i>m/z</i> 806,4, 1146,8 et 1286,9.....	306
Annexe S64 : Spectres MALDI-TOF MS des extraits de Xylariaceae sp. BSNB-0294 avec différents solvants.....	307
Annexe S65 : Spectres MALDI-TOF MS des extraits de Xylariaceae sp. BSNB-0294 selon les zones de la co-culture.....	307
Annexe S66 : Halo d'inhibition de la pousse de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> après 2 semaines de culture par différents extraits ou fractions testés à 10 mg/mL (50 $\mu\text{L}$ déposés). Le clotrimazole est utilisé comme témoin positif.....	308
Annexe 67 : Spectre RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la (+)-(4 <i>S</i> )-4,8-dihydroxy- $\alpha$ -tétralone <b>(28)</b> . .....	310
Annexe 68 : Spectre RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la 3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphtalén-1(2 <i>H</i> )-one <b>(29)</b> .....	310
Annexe 69 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanamide <b>(30)</b> .....	311
Annexe 70 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2-nitro-3-phénylpropanamide <b>(31)</b> .....	315
Annexe 71 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de l'acide 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanoïque <b>(32)</b> .....	320
Annexe 72 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2,4-dibenzyl-2-carbamoyl-5-oxo-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazole 3-oxide <b>(33)</b> . ....	323
Annexe 73 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2,4-dibenzyl-5-oxo-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazole-2-carboxamide <b>(34)</b> .....	328

Annexe 74 : Spectres RMN 1D ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2,4-dibenzyl- <i>N</i> -hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazole-2-carboxamide <b>(35)</b> . .....	332
Annexe 75 : Spectres RMN 1D ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C) et 2D (COSY, HSQC, HMBC), spectre de masse en haute résolution et spectre de fragmentation de la xylériacéine A <b>(36)</b> .....	336
Annexe 76 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) et spectre de fragmentation de la xylériacéine B <b>(37)</b> .....	342
Annexe 77 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du 1-lineoyl glycérol <b>(38)</b> .....	343
Annexe 78 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de l'acide linoléique <b>(39)</b> .....	343
Annexe 79 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la bassiatine <b>(40)</b> . ....	344
Annexe 80 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) du (-)-cyclonériodiol <b>(41)</b> . ....	344
Annexe 81 : Spectres RMN 1D ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C) et 2D (COSY, HSQC, HMBC), spectre de masse en haute résolution et configuration de la focicine <b>(42)</b> .....	345

Annexe S1 : Identification des micro-organismes endophytes et activité biologique de leur extrait AcOEt

Code BSNB	Astrocaryum sciophilum		Taxon proposé (GenBank acc. N°)	CMI SARM (µg/mL)	CMI T. rubrum (µg/mL)	Cytotoxicité MRC-5 (% viabilité)	MT102 6h	MT102 24h	Viabilité	F117 6h	F117 24h	Viabilité	CV026 (cm inhibition)	Viabilité	Agr inhibition (% croissance)
	N°	Feuille					% Fluorescence			% Fluorescence					
-0517	1	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643271)	> 256	> 256	57 ± 4	124 ± 1	82 ± 3	TOX	114 ± 0	25 ± 2	TOX+QQ	3.6	QQ	52.4 ± 6.8
-0519	1	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643330)	> 256	ND	103 ± 5	130 ± 3	85 ± 1	TOX	114 ± 1	20 ± 2	TOX+QQ	3.8	QQ	70.4 ± 7.7
-0520	1	fermé	<i>Diaporthe</i> sp. (MK650351)	> 256	> 256	ND	100 ± 1	97 ± 1		89 ± 4	50 ± 5		-		32.8 ± 10.0
-0521	1	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643273)	> 256	64	67 ± 2	85 ± 14	57 ± 2		106 ± 1	53 ± 4		-		12.8 ± 1.6
-0523	1	fermé	<i>Stereum</i> sp. (MK650352)	> 256	> 256	ND	80 ± 7	46 ± 5		100 ± 1	129 ± 13		-		16.8 ± 3.6
-0526	1	fermé	<i>Pseudopestalotiopsis</i> sp. (MK650358)	> 256	> 256	ND	95 ± 2	96 ± 1		87 ± 3	47 ± 10		-		37.1 ± 10.6
-0528	1	Jeune	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650407)	> 256	64	61 ± 4	68 ± 4	72 ± 4		95 ± 3	81 ± 17		-		35.9 ± 1.3
-0529	1	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300813)	> 256	> 256	105 ± 4	75 ± 8	98 ± 3		102 ± 1	73 ± 40		-		44.7 ± 1.6
-0530	1	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300820)	> 256	> 256	107 ± 10	70 ± 14	100 ± 6		100 ± 0	68 ± 15		-		44.2 ± 0.6
-0531	1	Jeune	<i>Stereum</i> sp. (MK650353)	> 256	128	15 ± 1	74 ± 7	80 ± 2		97 ± 1	134 ± 33		-		42.4 ± 2.8
-0532	1	Jeune	<i>Stereum</i> sp. (MK650354)	> 256	64	48 ± 3	75 ± 8	92 ± 8		103 ± 1	62 ± 29		-		44.1 ± 2.5
-0533	1	Jeune	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650355)	> 256	> 256	ND	77 ± 2	76 ± 3		99 ± 1	35 ± 5		-		44.3 ± 0.2
-0534	1	Jeune	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650359)	> 256	> 256	ND	55 ± 2	71 ± 3		91 ± 1	50 ± 7		-		46.2 ± 0.1
-0535	1	Jeune	<i>Diaporthe</i> sp. (MK650398)	> 256	> 256	ND	66 ± 2	89 ± 3		93 ± 1	44 ± 10		-		50.4 ± 0.5
-0536	1	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300818)	> 256	256	9 ± 1	66 ± 1	87 ± 2		100 ± 1	159 ± 39		-		47.0 ± 0.1
-0537	1	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300815)	> 256	> 256	106 ± 9	68 ± 3	114 ± 4		103 ± 1	79 ± 22		-		43.2 ± 2.0
-0538	1	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300793)	> 256	256	90 ± 2	75 ± 3	98 ± 3		117 ± 4	82 ± 27		-		47.6 ± 0.4
-0539	1	Jeune	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650342)	> 256	128	ND	90 ± 4	98 ± 4		87 ± 4	53 ± 3		-		44.5 ± 0.8
-0540	1	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300823)	> 256	> 256	79 ± 5	91 ± 3	102 ± 6		89 ± 5	34 ± 3		-		46.3 ± 2.0
-0541	1	Jeune	<i>Diaporthe</i> sp. (MK650361)	> 256	128	ND	89 ± 3	99 ± 6		94 ± 6	32 ± 7		-		49.4 ± 1.4
-0542	1	Jeune	<i>Cladosporium</i> sp. (MK650362)	> 256	128	ND	91 ± 4	101 ± 7		96 ± 14	63 ± 7		-		44.0 ± 5.1
-0543	1	Jeune	Non identified	> 256	128	ND	96 ± 4	107 ± 8		87 ± 8	63 ± 5		-		39.3 ± 0.3
-0545	1	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643272)	> 256	> 256	ND	85 ± 8	65 ± 4	TOX	112 ± 1	52 ± 3	TOX	-		41.1 ± 8.5
-0546	1	vieille	<i>Clonostachys rosea</i> (MK650360)	> 256	> 256	ND	98 ± 1	78 ± 7		74 ± 3	58 ± 0		-		28.3 ± 11.1
-0547	1	vieille	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650363)	> 256	ND	ND	95 ± 2	76 ± 2		77 ± 3	57 ± 13		-		33.2 ± 13.7
-0282	1	vieille	<i>Sordariomycetes</i> sp. (MK650329)	> 256	256	ND	98 ± 1	83 ± 1		76 ± 8	46 ± 3		-		42.8 ± 7.7
-0548	1	vieille	Non identified	> 256	> 256	ND	76 ± 9	60 ± 3	TOX	105 ± 1	226 ± 46		-		35.8 ± 0.5
-0549	1	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300811)	> 256	> 256	105 ± 11	101 ± 0	89 ± 7		95 ± 3	41 ± 8		-		35.8 ± 7.0
-0550	1	vieille	<i>Stereum</i> sp. (MK650356)	> 256	128	13 ± 1	99 ± 3	93 ± 6		111 ± 1	65 ± 4	TOX	-		48.9 ± 11.7
-0551	1	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300784)	> 256	128	30 ± 3	99 ± 1	91 ± 1		124 ± 8	92 ± 15		-		44.1 ± 10.7
-1020	1	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643280)	> 256	256	101 ± 2	103 ± 1	54 ± 2	TOX+QQ	154 ± 8	26 ± 6		4cm	QQ	48.9 ± 14.7
-1021	1	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300796)	> 256	128	99 ± 2	98 ± 1	82 ± 5		102 ± 2	27 ± 2		-		36.3 ± 11.3
-1019	1	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300789)	> 256	16	91 ± 1	79 ± 5	57 ± 3		106 ± 1	32 ± 4		-		50.5 ± 2.7
-0555	1	vieille	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650399)	> 256	256	ND	96 ± 2	78 ± 6		102 ± 1	49 ± 0		-		41.9 ± 3.6
-0556	1	vieille	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (MK650364)	> 256	> 256	ND	103 ± 0	83 ± 1		112 ± 8	51 ± 2		-		44.6 ± 6.1
-0557	1	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300804)	> 256	256	116 ± 3	99 ± 2	92 ± 3		97 ± 14	80 ± 10		-		44.0 ± 4.7
-0558	1	vieille	<i>Stereum</i> sp. (MK650357)	> 256	> 256	40 ± 8	81 ± 2	59 ± 4		101 ± 1	113 ± 23		-		39.5 ± 10.6
-0559	1	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300782)	> 256	128	11 ± 2	86 ± 8	57 ± 11	TOX	115 ± 1	103 ± 17		-		43.7 ± 2.0
-0560	2	fermé	Non identified	> 256	> 256	ND	120 ± 4	71 ± 3	TOX	114 ± 2	48 ± 6		-		36.4 ± 1.6
-0561	2	fermé	<i>Bacillus</i> sp. (MK643294)	> 256	32	65 ± 4	137 ± 6	127 ± 2		81 ± 3	241 ± 58		-		16.9 ± 5.8
-0562	2	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643323)	> 256	32	60 ± 1	333 ± 7	181 ± 3		107 ± 1	92 ± 3	TOX	-		29.9 ± 11.3

-0563	2	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643324)	> 256	32	59 ± 2	162 ± 8	145 ± 13		104 ± 0	113 ± 1		-		36.6 ± 4.3
-0564	2	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643325)	> 256	32	63 ± 2	145 ± 8	136 ± 6		101 ± 0	228 ± 18		-		31.4 ± 4.5
-0565	2	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643328)	> 256	256	ND	100 ± 0	108 ± 4		124 ± 1	198 ± 29	TOX	-		29.1 ± 14.8
-0566	2	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643315)	> 256	> 256	ND	95 ± 6	106 ± 8		94 ± 5	57 ± 7		-		34.2 ± 0.5
-0567	2	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643317)	> 256	> 256	ND	94 ± 7	108 ± 4		95 ± 7	46 ± 0		-		22.1 ± 3.5
-0568	2	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643322)	> 256	< 8	58 ± 2	96 ± 6	94 ± 6		109 ± 7	57 ± 3	TOX	1	QQ	36.8 ± 5.1
-0569	2	Jeune	<i>Pantoea dispersa</i> (MK643295)	128	> 256	ND	95 ± 5	99 ± 7		93 ± 4	25 ± 4		-		34.7 ± 0.2
-0570	2	Jeune	Non identified	256	> 256	ND	140 ± 13	112 ± 4		147 ± 8	21 ± 1	TOX	2.9	QQ	30.3 ± 0.4
-0572	2	Jeune	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643293)	> 256	> 256	ND	155 ± 11	113 ± 3		159 ± 6	23 ± 3	TOX	3.1	QQ	46.8 ± 2.9
-0573	2	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643318)	> 256	> 256	ND	103 ± 1	95 ± 3		79 ± 4	47 ± 5		-		23.4 ± 1.2
-0574	2	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300785)	> 256	> 256	110 ± 3	96 ± 1	131 ± 3		88 ± 1	45 ± 2		-		39.4 ± 1.1
-0575	2	Jeune	<i>Fusarium polyphialidicum</i> (MK279517)	32	> 256	20 ± 2	91 ± 1	109 ± 3		79 ± 16	26 ± 13		-		24.0 ± 13.9
-0576	2	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643319)	> 256	> 256	ND	90 ± 1	108 ± 2		91 ± 3	34 ± 4		-		32.8 ± 1.2
-0577	2	Jeune	<i>Diaporthe</i> sp. (MK650366)	> 256	> 256	ND	83 ± 0	88 ± 5		72 ± 2	105 ± 14		-		40.3 ± 0.3
-0578	2	Jeune	<i>Diaporthe</i> sp. (MK650367)	> 256	> 256	ND	89 ± 1	97 ± 3		106 ± 2	39 ± 4		-		45.0 ± 4.0
-0579	2	Jeune	<i>Cladosporium</i> sp. (MK650368)	> 256	> 256	ND	96 ± 2	115 ± 3		67 ± 3	55 ± 8		-		47.7 ± 2.2
-0580	2	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300812)	256	64	3 ± 1	90 ± 3	10 ± 0	QQ	89 ± 7	71 ± 13		0.8	QQ	16.1 ± 3.9
-0581	2	vieille	<i>Fusarium polyphialidicum</i> (MK650400)	128	> 256	ND	98 ± 1	96 ± 11		165 ± 47	63 ± 9		-		19.5 ± 2.0
-0582	2	vieille	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (MK650395)	> 256	> 256	ND	98 ± 1	77 ± 1		114 ± 6	106 ± 3		-		38.3 ± 9.7
-0583	2	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300803)	> 256	256	32 ± 1	99 ± 1	78 ± 1		98 ± 6	82 ± 16		-		42.0 ± 3.1
-0584	2	vieille	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (MK650402)	> 256	> 256	104,0 ± 4	98 ± 2	68 ± 7		126 ± 0	34 ± 1		-		41.2 ± 12.4
-0585	2	vieille	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650404)	> 256	128	103,4 ± 4	49 ± 1	29 ± 2	TOX+QQ	48 ± 4	47 ± 2		-		16.0 ± 1.2
-0586	2	vieille	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650369)	> 256	64	5 ± 1	97 ± 0	84 ± 1		143 ± 2	60 ± 0		-		43.1 ± 10.4
-0587	2	vieille	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650408)	> 256	> 256	ND	97 ± 0	71 ± 2		132 ± 27	78 ± 4		-		25.1 ± 4.4
-0588	2	vieille	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (MK650403)	> 256	> 256	ND	99 ± 1	79 ± 7		144 ± 38	61 ± 9		-		31.8 ± 6.9
-0589	2	vieille	<i>Cladosporium</i> sp. (MK650401)	> 256	128	ND	100 ± 1	97 ± 8		232 ± 17	58 ± 2		-		41.4 ± 3.0
-0283	2	vieille	<i>Sordariomycetes</i> sp. (MK650330)	> 256	> 256	ND	126 ± 1	113 ± 4		114 ± 1	123 ± 24		-		49.0 ± 1.8
-0590	2	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300816)	> 256	128	12 ± 1	101 ± 0	91 ± 1		207 ± 17	52 ± 2		-		44.1 ± 0.7
-0615	3	fermé	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300809)	> 256	16	23 ± 2	112 ± 2	121 ± 6		94 ± 0	255 ± 5		-		39.9 ± 4.4
-0616	3	fermé	<i>Caballeronia</i> sp. (MK643274)	> 256	> 256	ND	93 ± 2	83 ± 2		154 ± 4	58 ± 4		-		15.7 ± 3.8
-0284	3	fermé	<i>Ochroconis</i> sp. (MK650397)	> 256	> 256	ND	145 ± 3	159 ± 10		95 ± 1	162 ± 13		-		42.3 ± 2.3
-0617	3	fermé	<i>Caballeronia</i> sp. (MK643326)	> 256	> 256	ND	101 ± 2	98 ± 8		249 ± 53	83 ± 16		-		40.2 ± 10.5
-0285	3	fermé	<i>Ochroconis</i> sp. (MK650371)	> 256	> 256	ND	158 ± 3	171 ± 5		94 ± 1	191 ± 4		-		42.0 ± 4.1
-0618	3	fermé	<i>Bacillus</i> sp. (MK643329)	> 256	> 256	ND	100 ± 2	110 ± 3		93 ± 3	37 ± 2		-		12.4 ± 1.8
-0619	3	fermé	<i>Caballeronia</i> sp. (MK643327)	> 256	> 256	ND	92 ± 2	92 ± 1		151 ± 11	43 ± 5		-		12.5 ± 1.7
-0622	3	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300822)	> 256	> 256	68 ± 2	94 ± 1	125 ± 7		85 ± 2	35 ± 7		-		36.7 ± 6.0
-0623	3	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300800)	> 256	> 256	97 ± 18	93 ± 2	108 ± 6		94 ± 7	40 ± 5		-		45.3 ± 0.1
-0624	3	Jeune	<i>Bjerkandera adusta</i> (MK650370)	> 256	64	12 ± 1	94 ± 3	106 ± 3		94 ± 12	52 ± 13		-		44.8 ± 0.8
-0625	3	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300783)	> 256	256	100 ± 1	92 ± 3	97 ± 6		77 ± 4	81 ± 6		-		45.2 ± 0.3
-0288	3	Jeune	<i>Sordariomycetes</i> sp. (MK650335)	> 256	> 256	ND	96 ± 12	94 ± 22		97 ± 3	52 ± 6		-		46.4 ± 0.5
-0626	3	Jeune	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643281)	> 256	> 256	ND	116 ± 9	110 ± 5		165 ± 5	29 ± 2	TOX	3.2	QQ	33.6 ± 0.5
-0289	3	Jeune	<i>Sordariomycetes</i> sp. (MK650336)	256	128	ND	84 ± 4	91 ± 3		96 ± 4	43 ± 11		-		35.7 ± 3.3
-0293	3	Jeune	<i>Penicillium</i> sp. (MK650340)	256	> 256	ND	66 ± 6	60 ± 2		85 ± 3	46 ± 7		-		47.9 ± 3.3
-0627	3	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300801)	> 256	256	13 ± 2	88 ± 3	96 ± 4		106 ± 4	22 ± 3		-		57.8 ± 3.1
-0290	3	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300790)	> 256	> 256	110 ± 4	87 ± 4	97 ± 5		111 ± 10	44 ± 6		-		38.5 ± 1.0

-0287	3	Jeune	<i>Sordariomycetes</i> sp. (MK650334)	> 256	128	ND	93 ± 1	93 ± 2		81 ± 2	72 ± 3		-		40.3 ± 3.5
-0286	3	Jeune	<i>Xylariales</i> sp. (MK650331)	> 256	256	ND	80 ± 0	92 ± 9		100 ± 4	81 ± 6		-		28.8 ± 0.6
-0292	3	Jeune	<i>Xylariales</i> sp. (MK650332)	> 256	128	ND	81 ± 5	102 ± 5		92 ± 7	46 ± 3		-		45.5 ± 3.5
-0291	3	Jeune	<i>Penicillium</i> sp. (MK650341)	> 256	> 256	ND	83 ± 2	98 ± 9		119 ± 9	93 ± 6		-		43.7 ± 1.0
-0628	3	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300792)	> 256	256	81 ± 8	82 ± 2	89 ± 9		92 ± 1	101 ± 3		-		52.9 ± 1.5
-0630	3	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643284)	> 256	> 256	ND	100 ± 1	103 ± 1		199 ± 39	44 ± 3		-		43.8 ± 4.0
-0631	3	vieille	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650337)	> 256	> 256	ND	91 ± 1	97 ± 6		132 ± 9	57 ± 10		-		14.0 ± 2.8
-0632	3	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643282)	> 256	> 256	ND	346 ± 3	209 ± 1		117 ± 2	19 ± 4	TOX+QQ	2.7	QQ	34.0 ± 1.1
-0634	3	vieille	Non identified	> 256	> 256	ND	193 ± 1	186 ± 1		119 ± 2	80 ± 18	TOX	-		25.7 ± 7.7
-0635	3	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643297)	> 256	> 256	ND	133 ± 4	252 ± 4	TOX	353 ± 36	96 ± 2	TOX	-		31.3 ± 5.5
-0636	3	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643298)	> 256	> 256	ND	160 ± 27	261 ± 5		354 ± 4	91 ± 2	TOX	-		27.1 ± 2.7
-0637	3	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300797)	> 256	64	12 ± 1	94 ± 4	86 ± 8		114 ± 5	173 ± 3		-		36.8 ± 6.1
-0638	3	vieille	<i>Cladosporium</i> sp. (MK650374)	> 256	64	15 ± 1	98 ± 11	91 ± 2		112 ± 7	155 ± 39		-		38.1 ± 8.4
-0639	3	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643279)	> 256	> 256	ND	221 ± 54	274 ± 2		449 ± 15	83 ± 8	TOX	3.5	QQ	27.4 ± 12.1
-0640	3	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643296)	> 256	> 256	ND	100 ± 0	84 ± 2		164 ± 8	33 ± 1		-		33.6 ± 10.6
-0641	3	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300805)	> 256	64	9 ± 2	97 ± 1	97 ± 3		100 ± 26	62 ± 12		-		53.7 ± 12.3
-0642	3	vieille	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650375)	> 256	> 256	103 ± 4	88 ± 0	68 ± 7		124 ± 18	59 ± 9		-		10.3 ± 0.3
-0643	4	fermé	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (MK643300)	> 256	> 256	ND	83 ± 2	101 ± 3		122 ± 9	107 ± 26	TOX	-		39.1 ± 11.3
-0644	4	fermé	<i>Diaporthe</i> sp. (MK650376)	256	> 256	ND	99 ± 1	82 ± 1		107 ± 3	63 ± 20		-		43.8 ± 2.9
-0645	4	fermé	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300799)	> 256	> 256	81 ± 6	99 ± 0	92 ± 0		67 ± 4	78 ± 13		-		41.9 ± 1.0
-0294	4	fermé	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650343)	> 256	256		76 ± 3	96 ± 9		139 ± 6	87 ± 17	TOX	-		39.6 ± 5.1
-0646	4	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300814)	> 256	256	102 ± 7	90 ± 2	109 ± 8		95 ± 8	43 ± 10		-		46.6 ± 1.4
-0647	4	Jeune	<i>Fusarium polyphialidicum</i> (MK650365)	128	> 256	ND	86 ± 2	98 ± 10		108 ± 5	46 ± 4		-		33.5 ± 3.3
-0648	4	Jeune	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643299)	> 256	> 256	ND	82 ± 3	89 ± 4		141 ± 15	112 ± 8		-		27.1 ± 6.1
-0649	4	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300817)	> 256	> 256	91 ± 4	85 ± 0	98 ± 10		96 ± 3	46 ± 11		-		46.6 ± 3.0
-0650	4	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300808)	> 256	64	7 ± 3	85 ± 4	94 ± 6		95 ± 8	61 ± 7		-		49.9 ± 2.1
-0297	4	Jeune	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650377)	> 256	> 256	ND	86 ± 3	91 ± 6		101 ± 10	45 ± 6		-		44.6 ± 2.1
-0300	4	Jeune	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650378)	> 256	> 256	30 ± 2	88 ± 3	88 ± 8		101 ± 9	57 ± 3		-		57.3 ± 0.4
-0295	4	Jeune	<i>Sordariomycetes</i> sp. (MK650344)	> 256	> 256	59 ± 5	141 ± 2	79 ± 2		109 ± 5	35 ± 1		-		56.9 ± 1.2
-0651	4	Jeune	<i>Fusarium polyphialidicum</i> (MK279518)	32	> 256	24 ± 3	86 ± 2	102 ± 2		99 ± 2	38 ± 3		-		15.1 ± 0.5
-0652	4	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300791)	> 256	32	31 ± 1	77 ± 2	89 ± 3		103 ± 4	86 ± 3		-		44.8 ± 1.9
-0296	4	Jeune	<i>Bjerkandera adusta</i> (MK650373)	> 256	> 256	57 ± 5	89 ± 5	102 ± 1		107 ± 4	39 ± 4		-		52.8 ± 4.8
-0298	4	Jeune	<i>Penicillium</i> sp. (MK650345)	> 256	> 256	ND	86 ± 4	107 ± 3		114 ± 5	77 ± 1		-		50.2 ± 4.2
-0653	4	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300821)	> 256	> 256	107 ± 10	87 ± 2	101 ± 4		111 ± 2	34 ± 4		-		41.6 ± 2.6
-0654	4	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300807)	> 256	> 256	107 ± 5	86 ± 4	100 ± 5		106 ± 4	32 ± 1		-		43.8 ± 1.8
-0299	4	Jeune	<i>Muscodor</i> sp. (MK650346)	> 256	128	ND	86 ± 5	98 ± 4		94 ± 1	51 ± 3		-		43.4 ± 0.2
-0655	4	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300810)	> 256	> 256	98 ± 1	100 ± 0	90 ± 8		92 ± 5	108 ± 22		-		43.0 ± 7.2
-0656	4	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643277)	> 256	128	60 ± 5	105 ± 2	44 ± 6	TOX+QQ	128 ± 7	20 ± 4		4.2	QQ	62.1 ± 3.6
-0658	4	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643278)	> 256	256	100 ± 3	103 ± 1	40 ± 0	TOX+QQ	106 ± 4	23 ± 7	TOX	4.4	QQ	75.5 ± 9.4
-0660	4	vieille	<i>Bjerkandera adusta</i> (MK650372)	> 256	256	ND	98 ± 0	78 ± 2		65 ± 4	28 ± 6		-		40.5 ± 10.5
-0661	4	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643276)	> 256	256	105 ± 3	107 ± 3	82 ± 9		123 ± 6	25 ± 5	TOX	2	QQ	57.6 ± 4.7
-0662	4	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300787)	> 256	> 256	95 ± 2	99 ± 1	88 ± 7		92 ± 11	102 ± 4		-		36.3 ± 2.3
-0663	4	vieille	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643283)	> 256	> 256	ND	166 ± 5	291 ± 4		422 ± 19	77 ± 3	TOX	3.4	QQ	43.4 ± 6.0
-0664	4	vieille	<i>Fusarium</i> sp.	> 256	128	12 ± 1	97 ± 0	73 ± 3		71 ± 3	49 ± 4		-		58.5 ± 4.6
-0665	4	vieille	<i>Aspergillus vitricola</i> (MK650379)	> 256	16	ND	94 ± 0	75 ± 2		69 ± 3	65 ± 10		-		17.6 ± 1.8
-0666	4	vieille	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650384)	> 256	128	86 ± 4	106 ± 0	66 ± 6	TOX	61 ± 6	59 ± 9	TOX	-		15.6 ± 4.5
-0667	4	vieille	<i>Xylariales</i> sp. (MK650385)	> 256	256	ND	95 ± 1	85 ± 12		73 ± 6	45 ± 5		-		40.1 ± 4.0
-0668	4	vieille	<i>Cladosporium</i> sp. (MK650405)	> 256	128	ND	98 ± 0	79 ± 1		69 ± 1	50 ± 13		-		44.9 ± 3.7
-0669	5	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643305)	> 256	> 256	ND	101 ± 0	82 ± 1		86 ± 12	52 ± 12		-		33.4 ± 7.6

-0670	5	fermé	<i>Paraburkholderia</i> sp. (MK643275)	256	> 256	98 ± 3	104 ± 1	61 ± 9	TOX	116 ± 1	21 ± 2	TOX	3.3	QQ	32.1 ± 3.5
-0671	5	fermé	<i>Pantoea stewartii</i> (MK643287)	> 256	> 256	ND							-		44.3 ± 9.0
-0672	5	fermé	<i>Pantoea stewartii</i> (MK643288)	> 256	256	ND	106 ± 2	93 ± 12		133 ± 2	23 ± 0		-		33.0 ± 4.0
-0673	5	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643289)	> 256	256	ND	97 ± 1	76 ± 1		69 ± 8	38 ± 2		-		27.0 ± 6.0
-0674	5	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643292)	> 256	> 256	ND	86 ± 2	127 ± 11		181 ± 24	55 ± 0	TOX	-		41.7 ± 5.5
-0675	5	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643306)	> 256	> 256	ND	98 ± 0	82 ± 0		90 ± 6	38 ± 4		-		28.1 ± 2.9
-0676	5	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643302)	> 256	128	ND	128 ± 2	255 ± 6		287 ± 0	91 ± 12		-		28.3 ± 3.2
-0677	5	fermé	<i>Serratia</i> sp. (MK643304)	> 256	> 256	101 ± 4	105 ± 4	58 ± 4		116 ± 3	17 ± 0	TOX	3	QQ	36.6 ± 6.0
-0678	5	fermé	<i>Serratia</i> sp. (MK643303)	> 256	> 256	34 ± 1	101 ± 1	86 ± 8		123 ± 3	22 ± 1	TOX	2.2	QQ	32.2 ± 11.3
-0679	5	Jeune	<i>Diaporthe</i> sp. (MK650406)	128	> 256	ND	75 ± 3	80 ± 6		83 ± 8	111 ± 19		-		11.3 ± 0.2
-0680	5	Jeune	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650390)	> 256	64	35 ± 1	86 ± 2	85 ± 4		117 ± 14	51 ± 2		-		29.9 ± 2.5
-0681	5	Jeune	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650386)	> 256	64	67 ± 3	86 ± 4	85 ± 3		114 ± 6	53 ± 7		-		34.8 ± 0.6
-0682	5	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300802)	256	256	73 ± 2	83 ± 3	93 ± 7		76 ± 1	66 ± 4		-		11.6 ± 0.1
-0683	5	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643320)	> 256	> 256	ND	80 ± 2	93 ± 1		85 ± 4	50 ± 6		-		37.7 ± 1.4
-0684	5	Jeune	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (MK650396)	> 256	256	ND	74 ± 1	82 ± 3		83 ± 3	43 ± 1		-		21.3 ± 0.3
-0685	5	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643314)	> 256	256	ND	79 ± 3	97 ± 1		98 ± 5	45 ± 7		-		39.1 ± 3.2
-0686	5	Jeune	<i>Fusarium avenaceum</i> (MK650380)	> 256	64	73 ± 1	78 ± 2	89 ± 2		82 ± 6	37 ± 6		-		32.9 ± 0.3
-0687	5	Jeune	<i>Diaporthe</i> sp. (MK650391)	> 256	> 256	ND	82 ± 1	90 ± 2		94 ± 5	26 ± 2		2.6	QQ léger	47.9 ± 0.9
-0688	5	Jeune	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300795)	> 256	> 256	98 ± 4	82 ± 6	76 ± 5		80 ± 3	42 ± 7		-		43.1 ± 1.9
-0689	5	Jeune	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650338)	> 256	16	4 ± 1	86 ± 8	81 ± 3		83 ± 2	80 ± 34		-		47.6 ± 2.0
-0690	5	Jeune	<i>Fusarium polyphialidicum</i> (MK650339)	256	> 256	ND	96 ± 7	88 ± 3		80 ± 7	61 ± 25		-		42.0 ± 1.3
-0691	5	vieille	<i>Penicillium</i> sp. (MK650383)	> 256	> 256	42 ± 4	104 ± 1	47 ± 1	QQ	101 ± 6	42 ± 1		-		40.9 ± 10.1
-0692	5	vieille	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650388)	> 256	64	100 ± 1	94 ± 1	61 ± 2	TOX+QQ	72 ± 4	44 ± 13		-		22.7 ± 15.9
-0693	5	vieille	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650389)	> 256	128	101 ± 3	95 ± 0	59 ± 1	TOX	68 ± 11	37 ± 5		-		14.0 ± 3.3
-0694	5	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300794)	> 256	256	74 ± 4	100 ± 0	96 ± 7		61 ± 2	26 ± 2		-		30.9 ± 9.6
-0695	5	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300798)	> 256	256	91 ± 1	99 ± 1	72 ± 1		58 ± 2	26 ± 3		-		27.2 ± 10.1
-0696	5	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300819)	> 256	> 256	86 ± 1	100 ± 1	97 ± 2		90 ± 8	83 ± 12		-		33.5 ± 6.7
-0697	5	vieille	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643290)	> 256	> 256	ND	169 ± 6	300 ± 3		149 ± 5	188 ± 16		-		32.7 ± 2.2
-0699	5	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300788)	> 256	ND	102 ± 3	101 ± 0	99 ± 6		61 ± 3	35 ± 7		-		40.9 ± 4.2
-0700	5	vieille	<i>Xylariales</i> sp. (MK650333)	> 256	> 256	ND	98 ± 1	92 ± 4		64 ± 5	52 ± 3		-		39.0 ± 8.2
-0701	5	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300806)	> 256	256	73 ± 2	98 ± 2	89 ± 5		71 ± 1	33 ± 2		-		38.5 ± 7.1
-0702	5	vieille	<i>Fusarium avenaceum</i> (MK650409)	> 256	> 256	ND	96 ± 0	80 ± 4		71 ± 3	33 ± 2		-		26.4 ± 10.1
-0703	5	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK300786)	> 256	128	75 ± 1	97 ± 1	79 ± 1		64 ± 2	23 ± 2		-		26.9 ± 12.0
-0704	6	fermé	<i>Pseudomonas</i> sp. (MK643285)	> 256	> 256	ND	82 ± 1	74 ± 1		75 ± 2	23 ± 2		-		9.4 ± 1.2
-0706	6	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643309)	> 256	> 256	ND	179 ± 10	221 ± 3		290 ± 21	195 ± 7	TOX	-		34.8 ± 6.8
-0707	6	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643291)	> 256	256	ND	100 ± 2	86 ± 6		68 ± 5	50 ± 4		-		30.5 ± 5.8
-0708	6	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643301)	> 256	256	98 ± 4	146 ± 21	171 ± 3	TOX	340 ± 33	198 ± 8		-		34.1 ± 6.1
-0709	6	fermé	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643311)	> 256	256	81 ± 4	227 ± 15	247 ± 70	TOX	405 ± 7	207 ± 2		-		43.1 ± 10.3
-0712	6	fermé	<i>Bacillus</i> sp. (MK643316)	256	32	67 ± 4	90 ± 1	80 ± 6		69 ± 1	24 ± 3		-		12.5 ± 3.5
-0301	6	fermé	<i>Fusarium decemcellulare</i> (MK650347)	> 256	256	11 ± 1	83 ± 1	68 ± 1		76 ± 1	83 ± 5		-		12.4 ± 0.9
-0302	6	fermé	<i>Fusarium decemcellulare</i> (MK650348)	> 256	256	99 ± 1	79 ± 1	64 ± 1		80 ± 1	74 ± 2		-		13.8 ± 0.4
-0713	6	fermé	Non identified	> 256	256	ND	99 ± 0	84 ± 4		90 ± 6	96 ± 7		-		39.4 ± 7.0
-0303	6	fermé	<i>Fusarium decemcellulare</i> (MK279519)	16	256	15 ± 4	72 ± 5	63 ± 7	QQ	69 ± 22	73 ± 4		-		12.1 ± 0.3
-0716	6	Jeune	<i>Bacillus</i> sp. (MK643321)	> 256	64	71 ± 1	93 ± 9	69 ± 2		123 ± 6	42 ± 3	TOX	-		42.7 ± 1.4

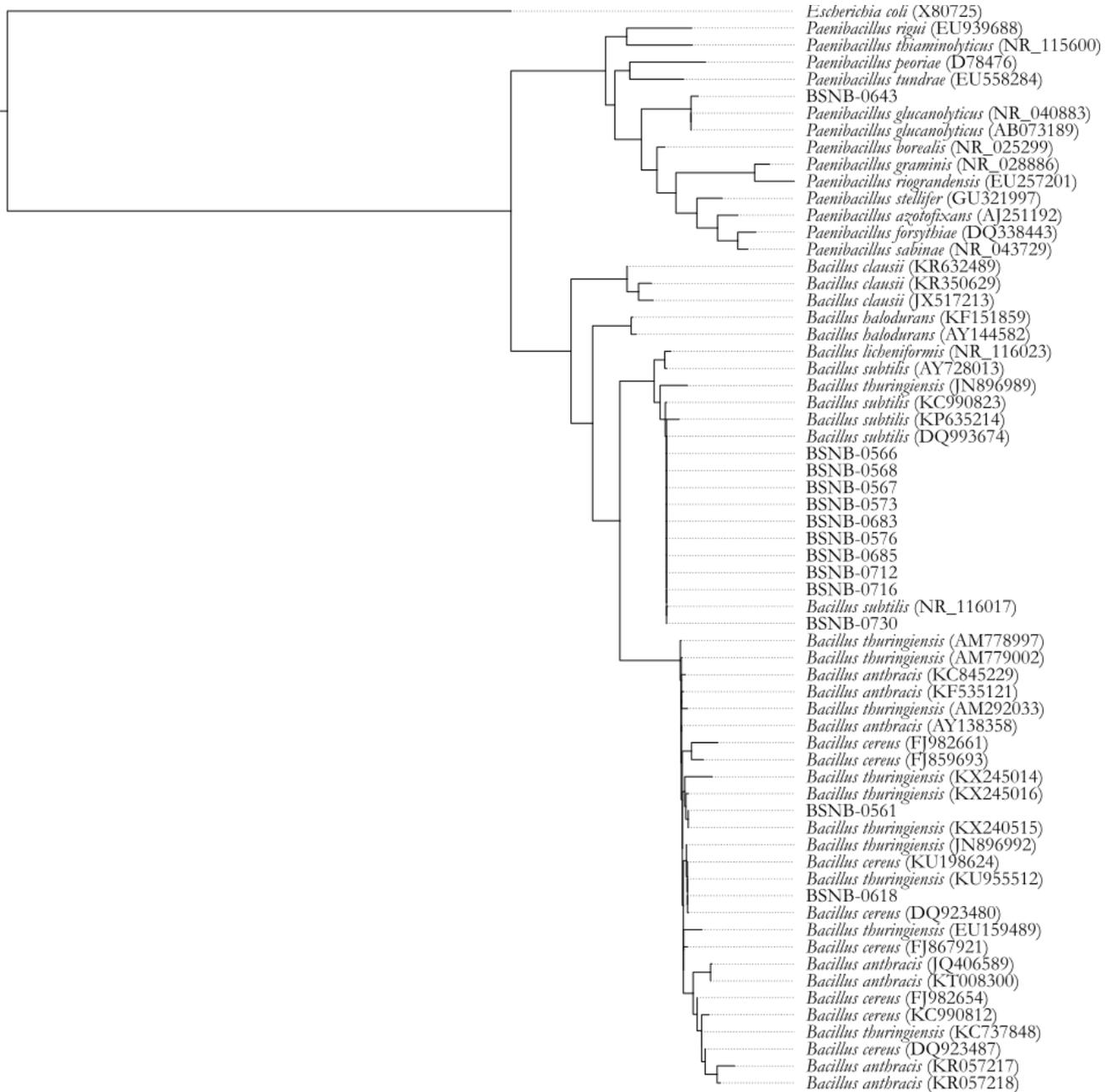
-0304	6	Jeune	<i>Sordariomycetes</i> sp. (MK650349)	256	256	ND	128 ± 3	53 ± 2	TOX	121 ± 2	64 ± 2	TOX	1.1	QQ léger	43.7 ± 2.7
-0717	6	Jeune	<i>Cryphonectriaceae</i> sp. (MK650381)	256	256	ND	76 ± 0	74 ± 1		71 ± 1	32 ± 1		-		39.4 ± 9.6
-0718	6	Jeune	<i>Xylariaceae</i> sp. (MK650382)	256	> 256	ND	83 ± 2	86 ± 5		82 ± 6	105 ± 37		-		24.1 ± 4.7
-0305	6	Jeune	<i>Sordariomycetes</i> sp. (MK650350)	> 256	> 256	ND	83 ± 3	85 ± 3		84 ± 2	81 ± 20		1	QQ léger	48.6 ± 7.9
-0719	6	Jeune	<i>Luteibacter</i> sp. (MK279522)	32	16	104 ± 5	89 ± 1	97 ± 4		105 ± 8	26 ± 0		-		21.6 ± 2.7
-0720	6	Jeune	<i>Oxydothis</i> sp. (MK650392)	> 256	> 256	ND	96 ± 2	98 ± 3		113 ± 9	69 ± 2		-		46.0 ± 3.2
-0721	6	Jeune	<i>Luteibacter</i> sp. (MK643286)	64	32	102 ± 5	88 ± 1	97 ± 4		134 ± 11	33 ± 2		-		12.0 ± 1.0
-0722	6	Jeune	Non identified	> 256	< 8	4 ± 1	82 ± 1	85 ± 5		76 ± 3	100 ± 11		-		48.0 ± 3.3
-0723	6	vieille	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643307)	> 256	256	ND	174 ± 32	205 ± 50	TOX	418 ± 1	228 ± 8		-		35.1 ± 7.3
-0724	6	vieille	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643308)	> 256	64	71 ± 1	194 ± 43	211 ± 7		448 ± 7	132 ± 6		-		37.3 ± 9.6
-0725	6	vieille	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643312)	> 256	> 256	ND	99 ± 1	82 ± 1		72 ± 32	107 ± 10		-		40.1 ± 2.3
-0726	6	vieille	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643313)	> 256	32	68 ± 4	99 ± 1	78 ± 1		127 ± 23	30 ± 3		-		13.7 ± 3.1
-0727	6	vieille	<i>Enterobacter</i> sp. (MK643310)	> 256	256	ND	141 ± 2	182 ± 2	TOX	357 ± 0	146 ± 16		-		42.3 ± 8.5
-0730	6	vieille	<i>Bacillus</i> sp. (MK279521)	64	< 8	107 ± 4	89 ± 1	51 ± 4	TOX	116 ± 7	40 ± 4		-		38.4 ± 5.0
-0731	6	vieille	<i>Endomelanconiopsis freycinetiae</i> (MK650387)	> 256	32	ND	95 ± 0	74 ± 3		160 ± 10	69 ± 6		-		20.5 ± 2.7
-0732	6	vieille	<i>Akanthomyces</i> sp. (MK279520)	< 8	16	5 ± 1	85 ± 3	8 ± 0	TOX+QQ	65 ± 9	9 ± 3	TOX	1.2	TOX	12.5 ± 0.2
-0733	6	vieille	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i> (MK650393)	> 256	> 256	ND	98 ± 1	76 ± 1		138 ± 4	58 ± 0		-		26.1 ± 4.7
-0734	6	vieille	<i>Colletotrichum</i> sp. (MK650394)	> 256	128	67 ± 2	92 ± 2	79 ± 4		142 ± 3	39 ± 5		-		38.0 ± 6.1

ND : Non déterminé

TOX : Effet toxique visible

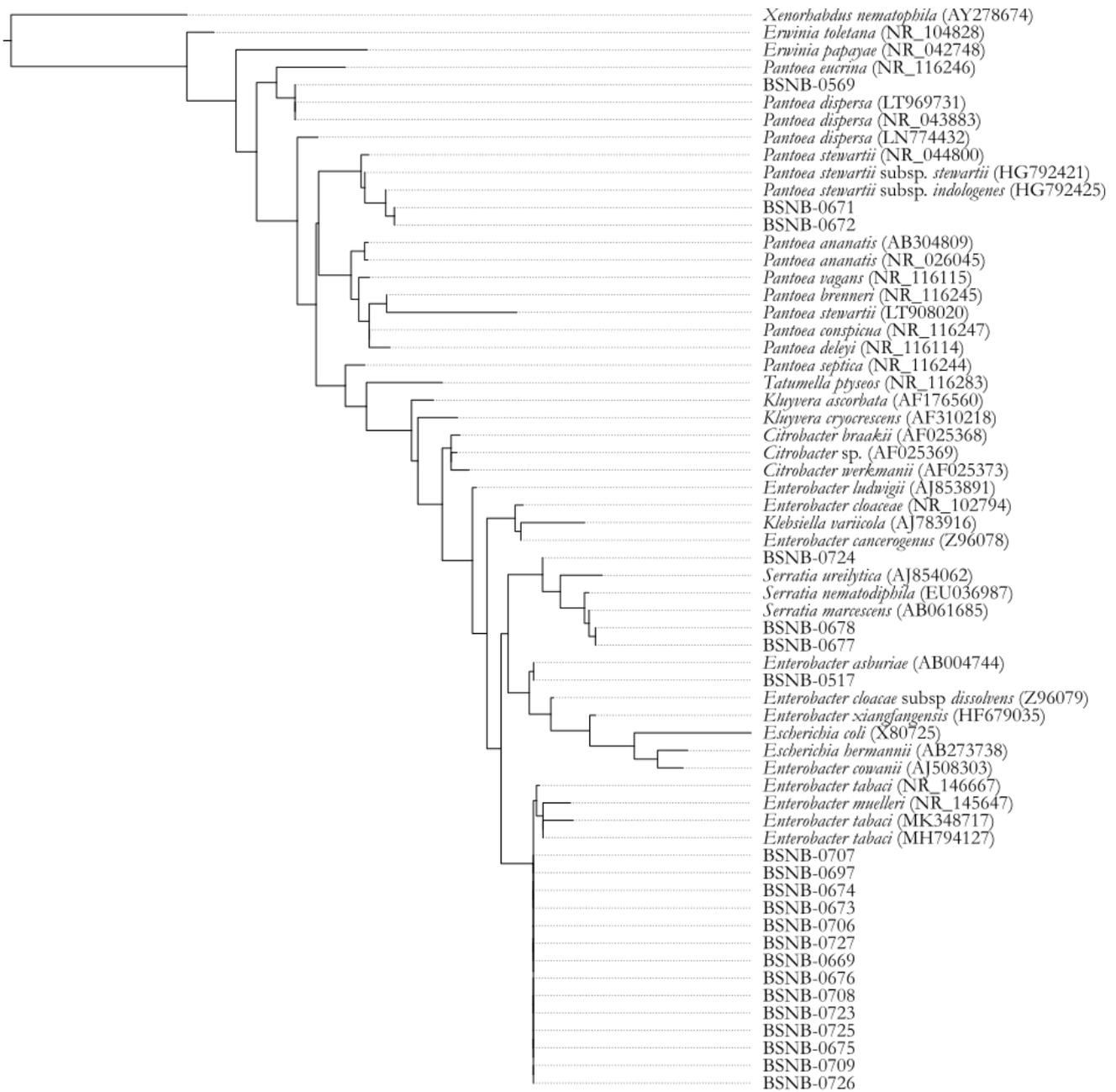
QQ : Effet Quorum Quenching sur la cible

Annexe S2 : Arbre phylogénétique sur le clade des *Bacillus* incluant les séquences 16S de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Escherichia coli* (X80725).

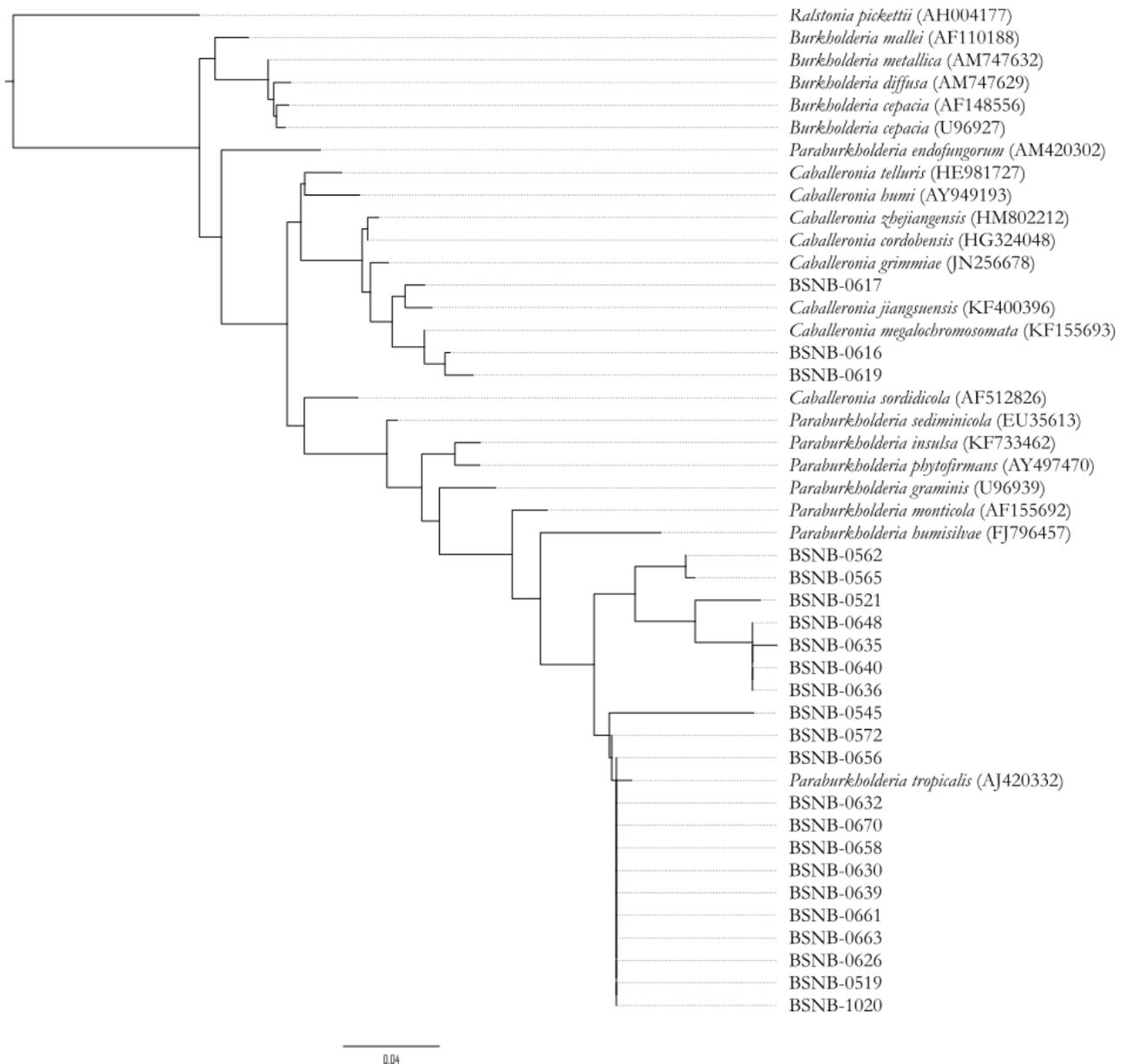


0.07

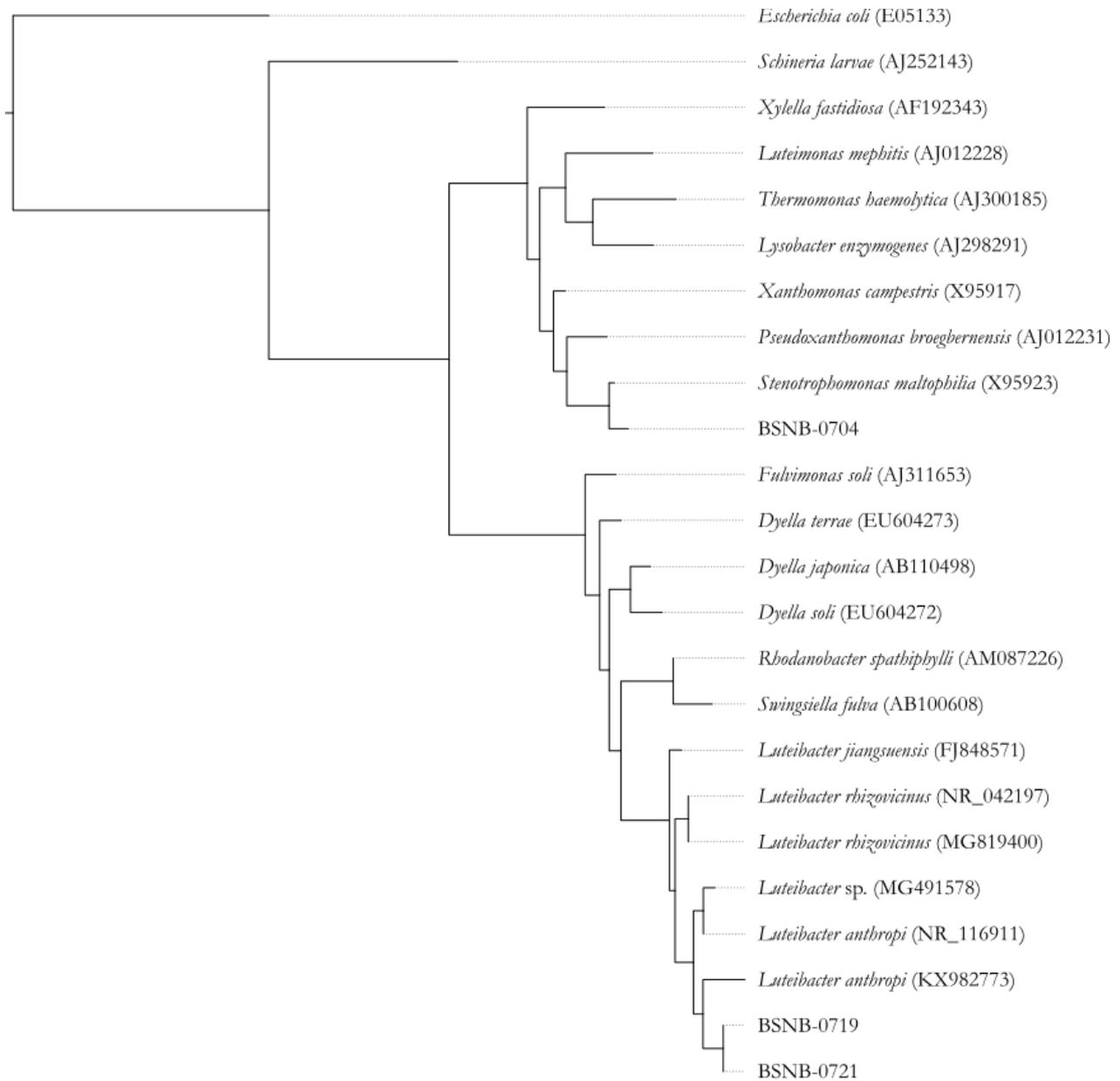
Annexe S3 : Arbre phylogénétique sur le clade des Enterobacteriales incluant les séquences 16S de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Xenorhabdus nematophila* (AY278674).



Annexe S4: Arbre phylogénétique sur le clade des Burkholderiaceae incluant les séquences 16S de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Ralstonia pickettii* (AH004177).

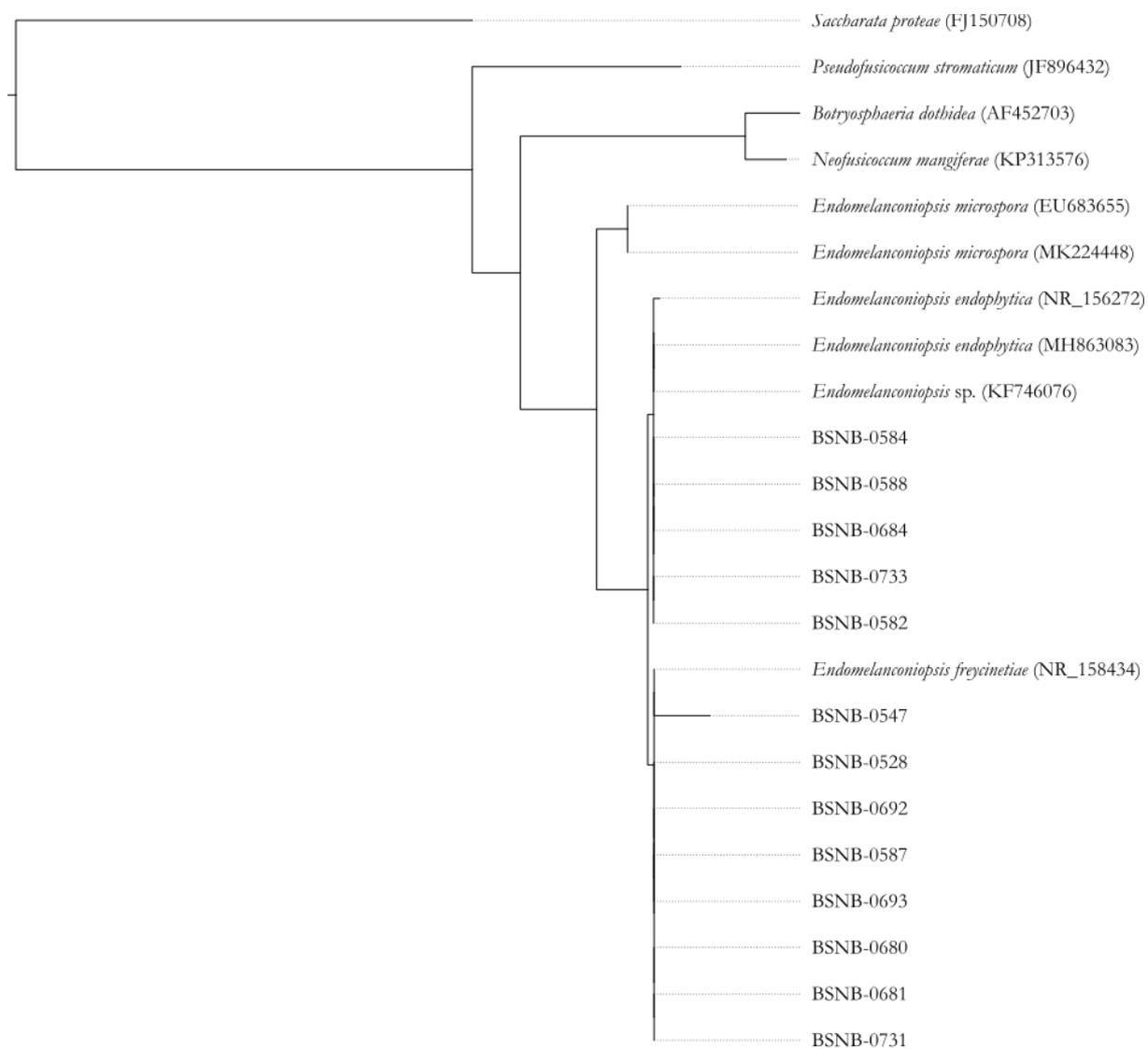


Annexe S5 : Arbre phylogénétique sur le clade des Gammaproteobacteria incluant les séquences 16S de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Escherichia coli* (E05133).



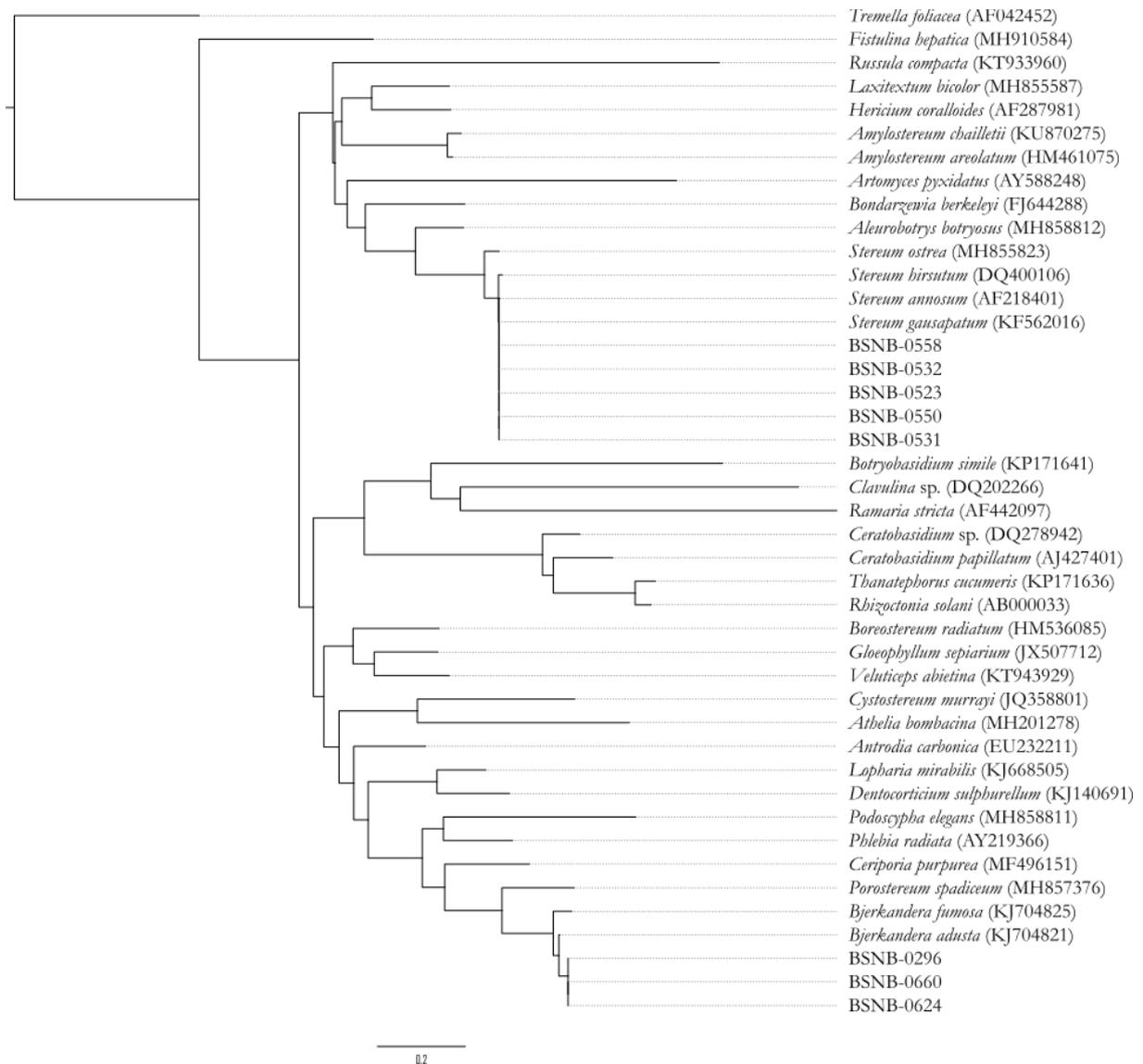
0.04

Annexe S6 : Arbre phylogénétique sur le clade des *Endomelanconiopsis* incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Saccharata proteae* (FJ896432).

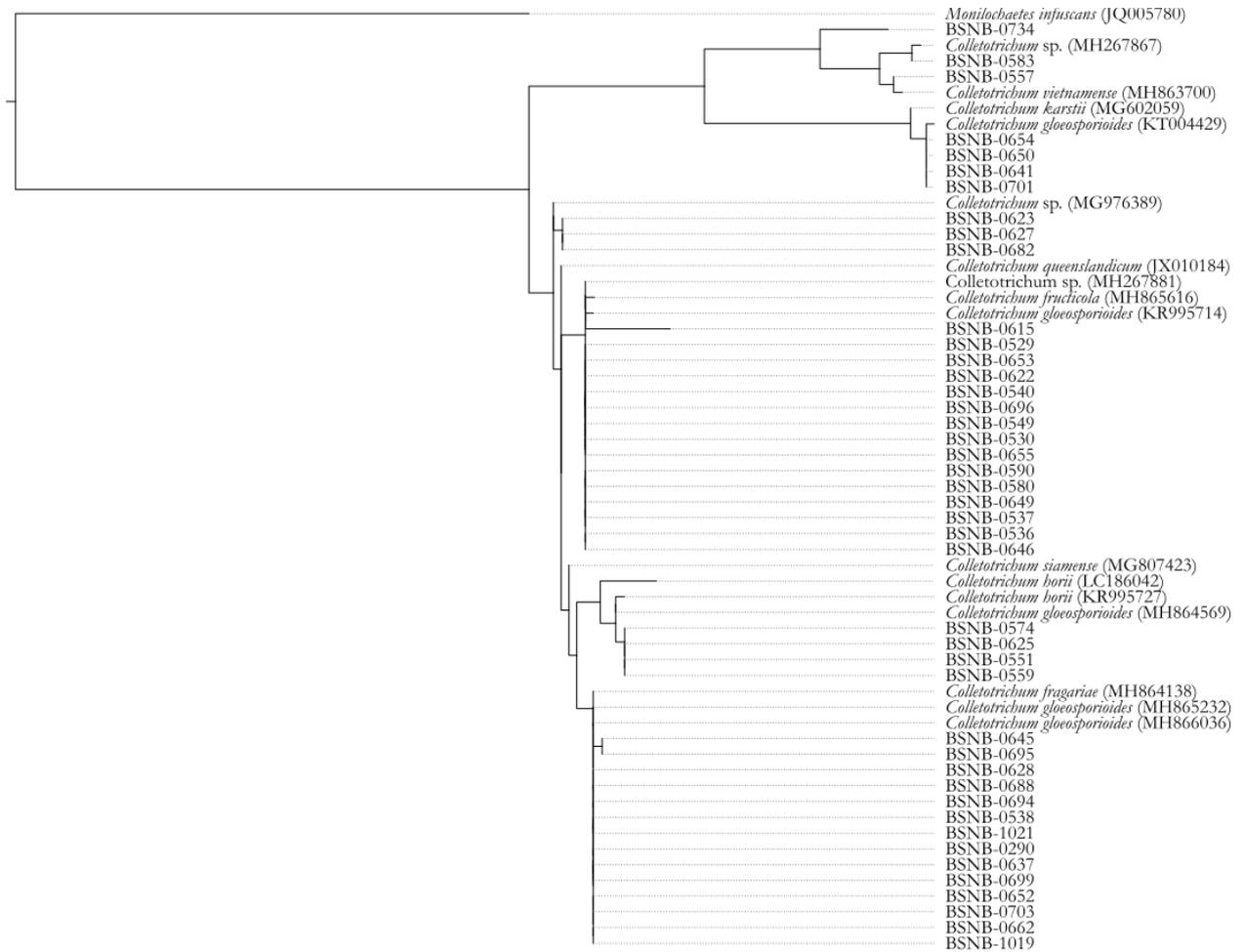


0.03

Annexe S7 : Arbre phylogénétique sur le clade des Agaricomycetes incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Tremella foliacea* (AF042452).

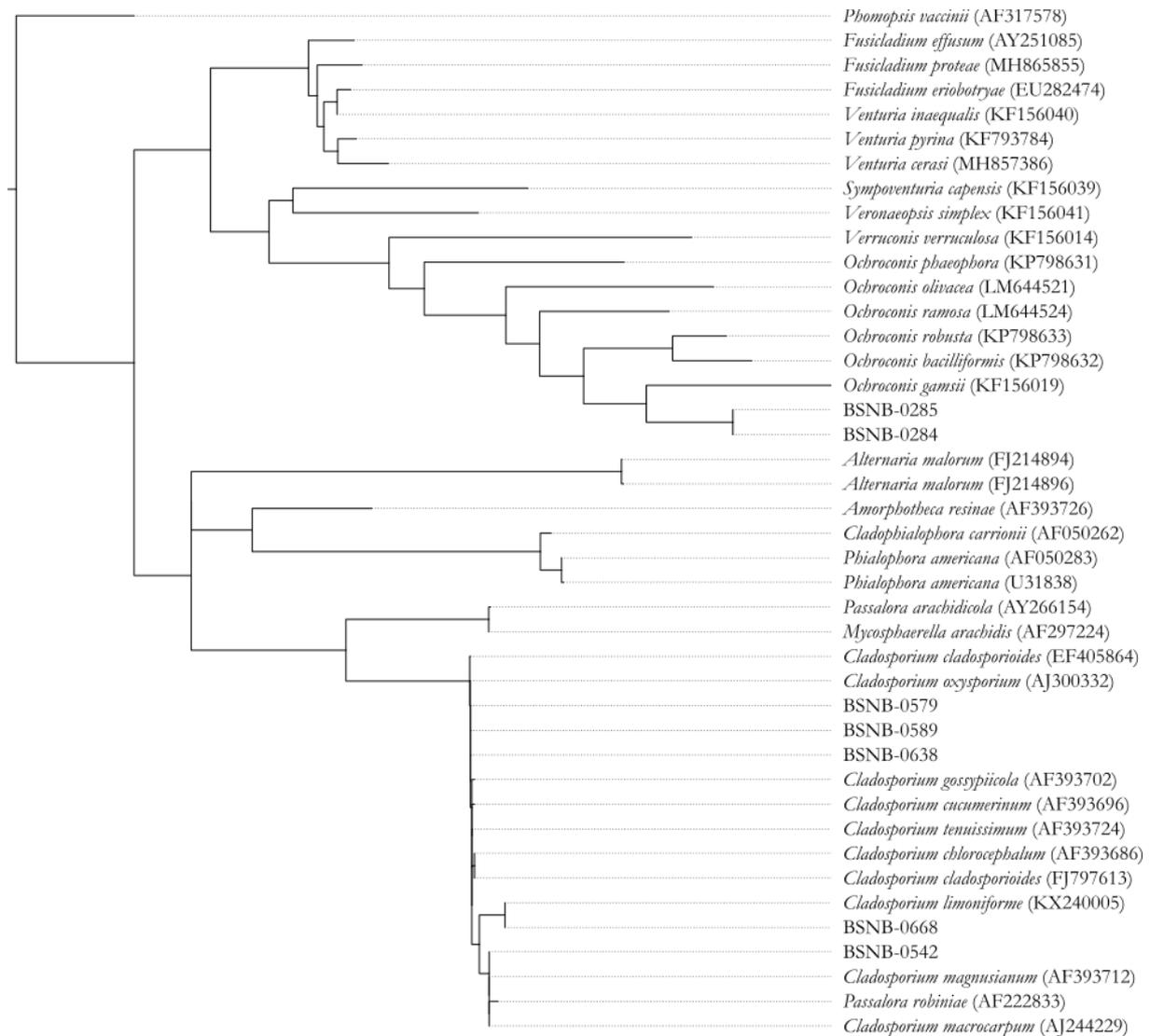


Annexe S8 : Arbre phylogénétique sur le clade des *Colletotrichum* incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Monilochaetes infuscans* (JQ005780).



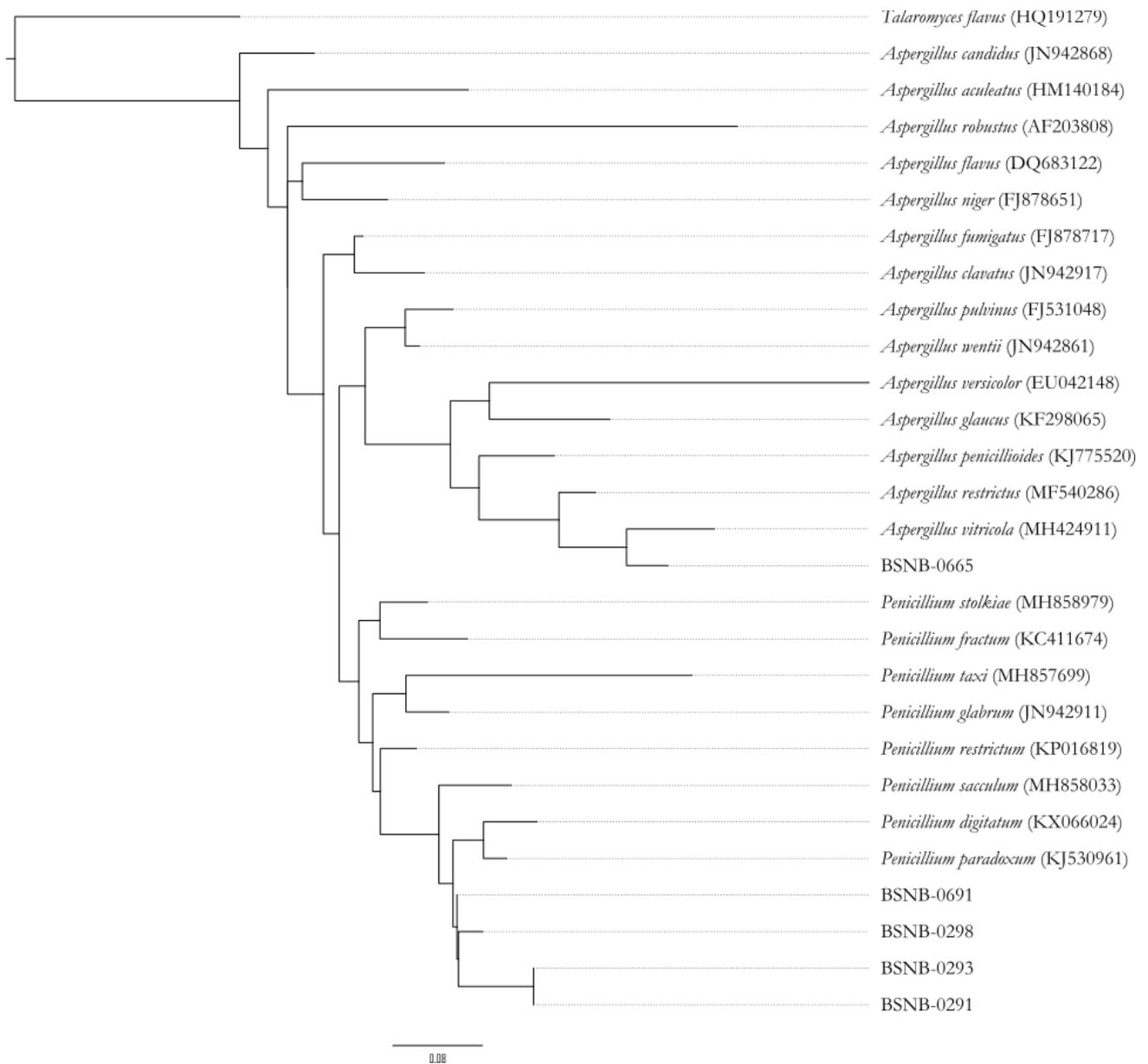
002

Annexe S9 : Arbre phylogénétique sur le clade des Dothideomycetes incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Phomopsis vaccinii* (AF317578).

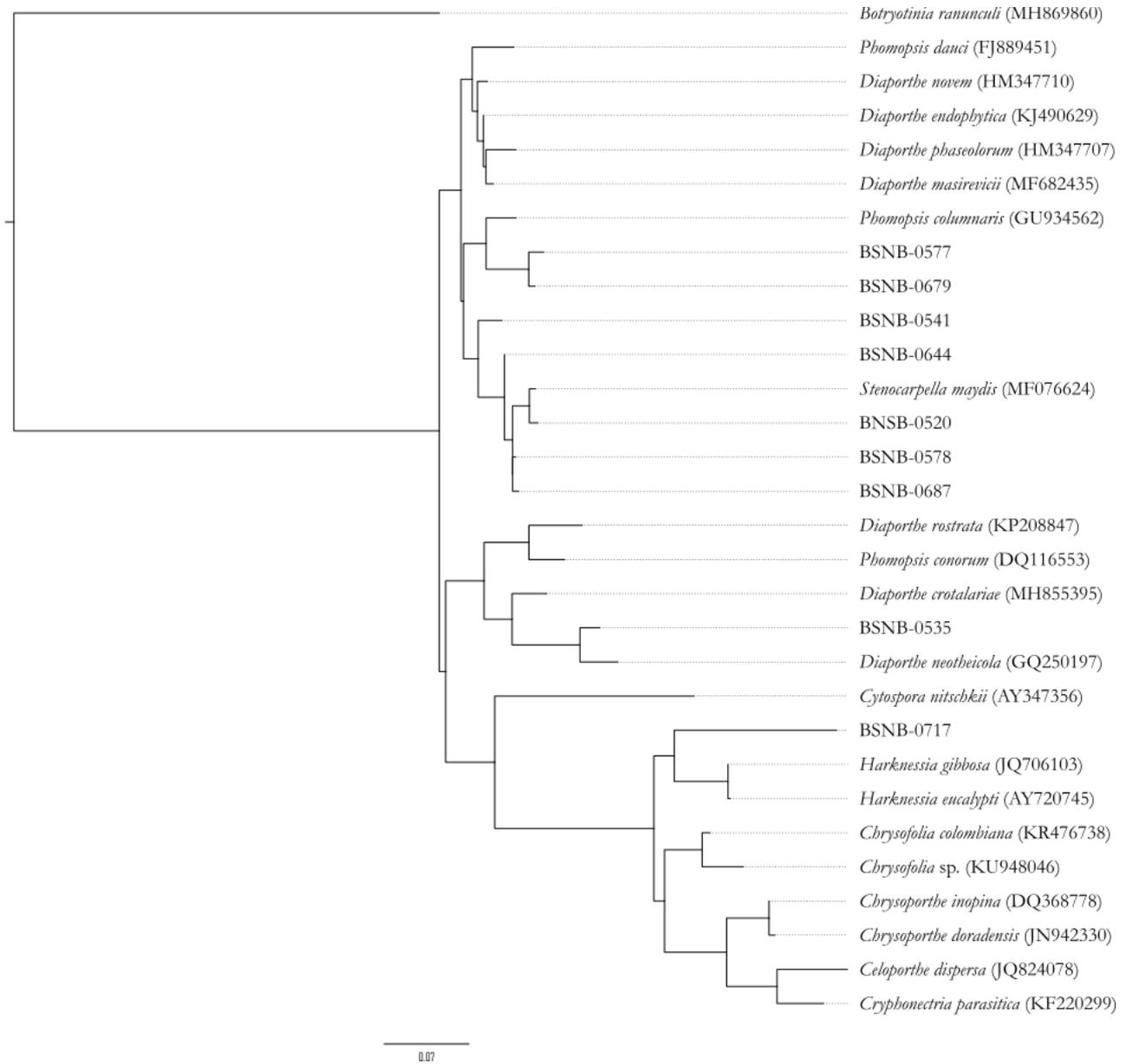


02

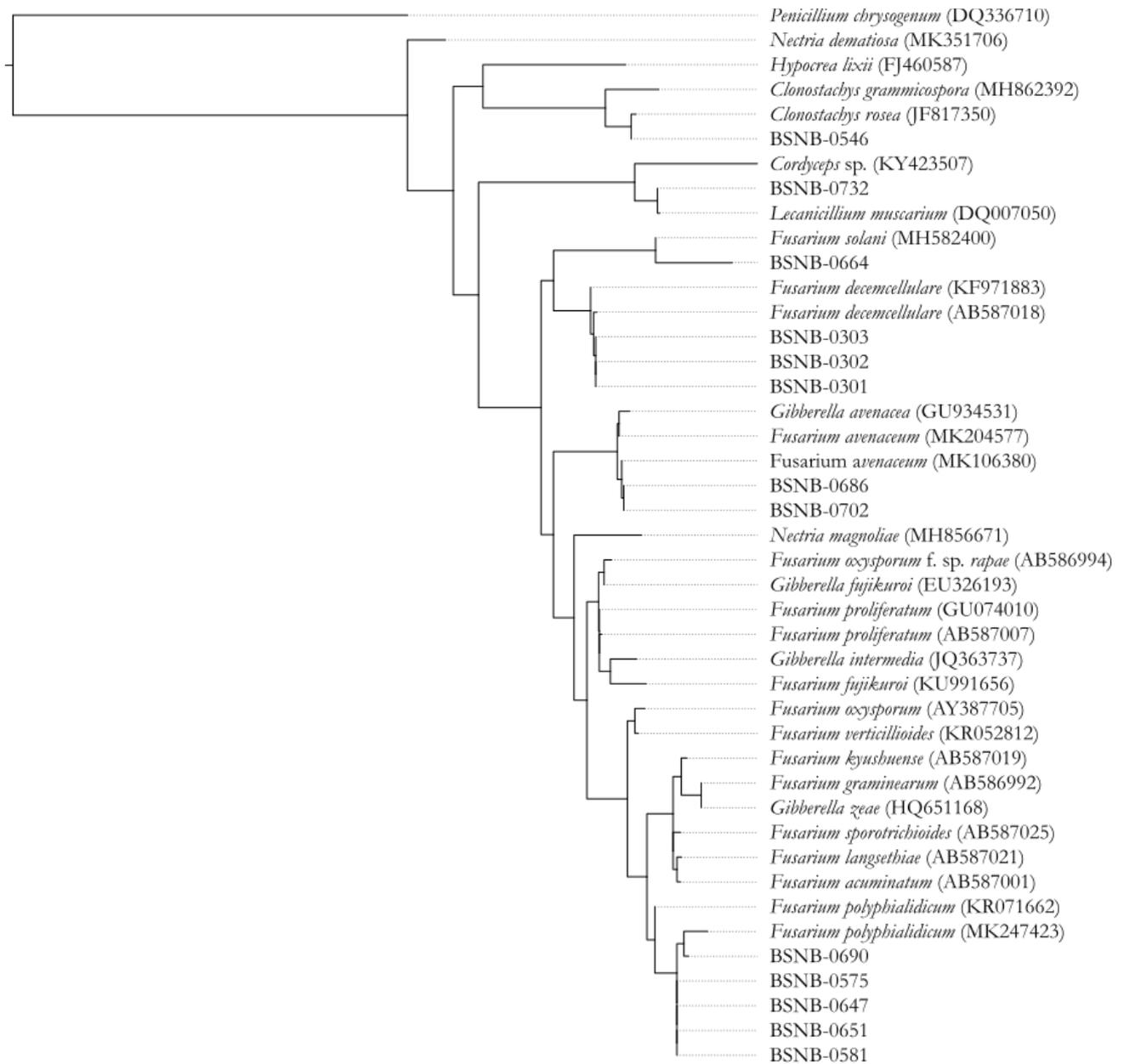
Annexe S10 : Arbre phylogénétique sur le clade des Eurotiomycetes incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Talaromyces flavus* (HQ191279).



Annexe S11 : Arbre phylogénétique sur le clade des Diaporthales incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Botryotinia rannunculi* (MH869860).

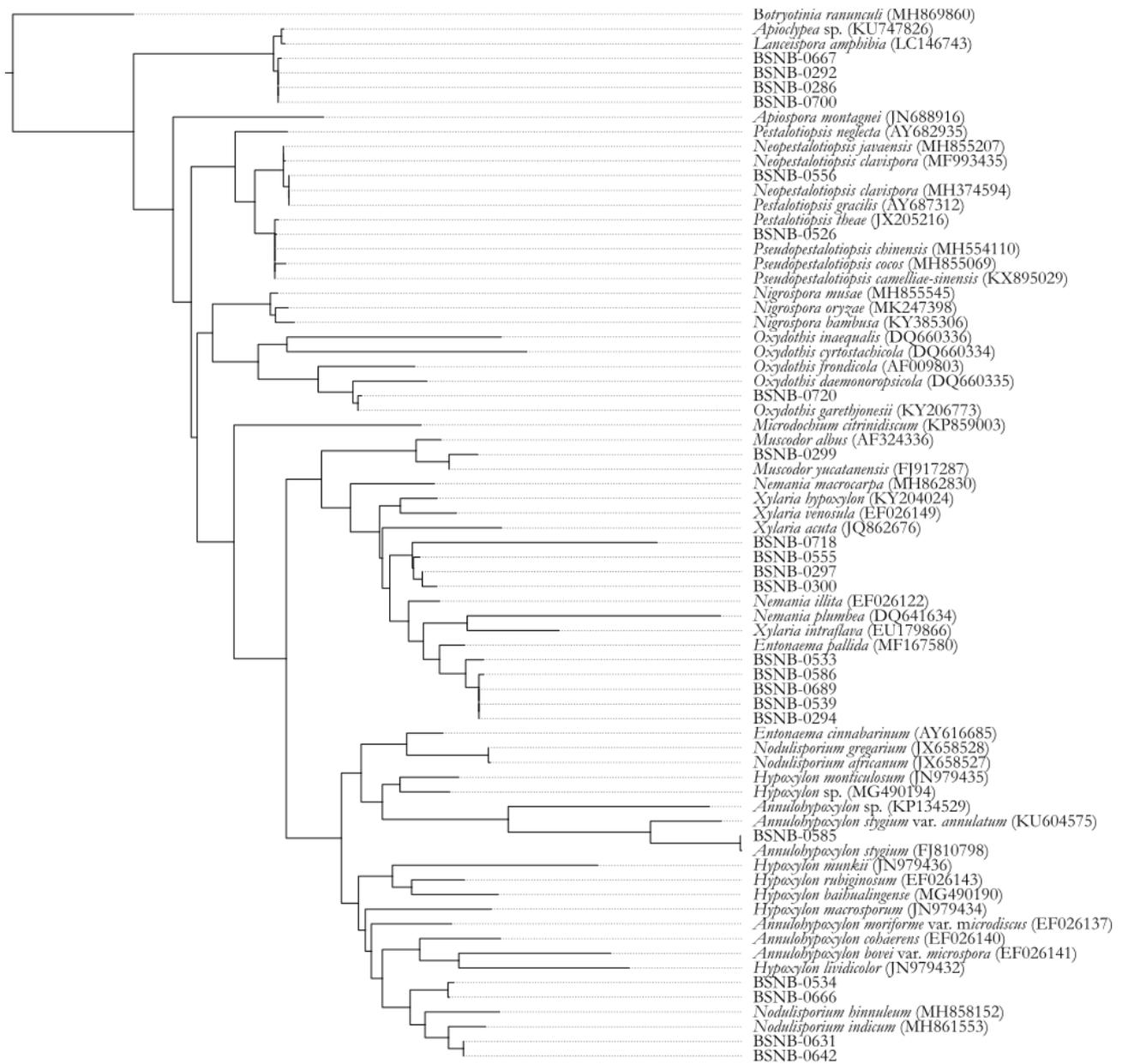


Annexe S12 : Arbre phylogénétique sur le clade des Hypocreales incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Penicillium chrysogenum* (DQ336710).

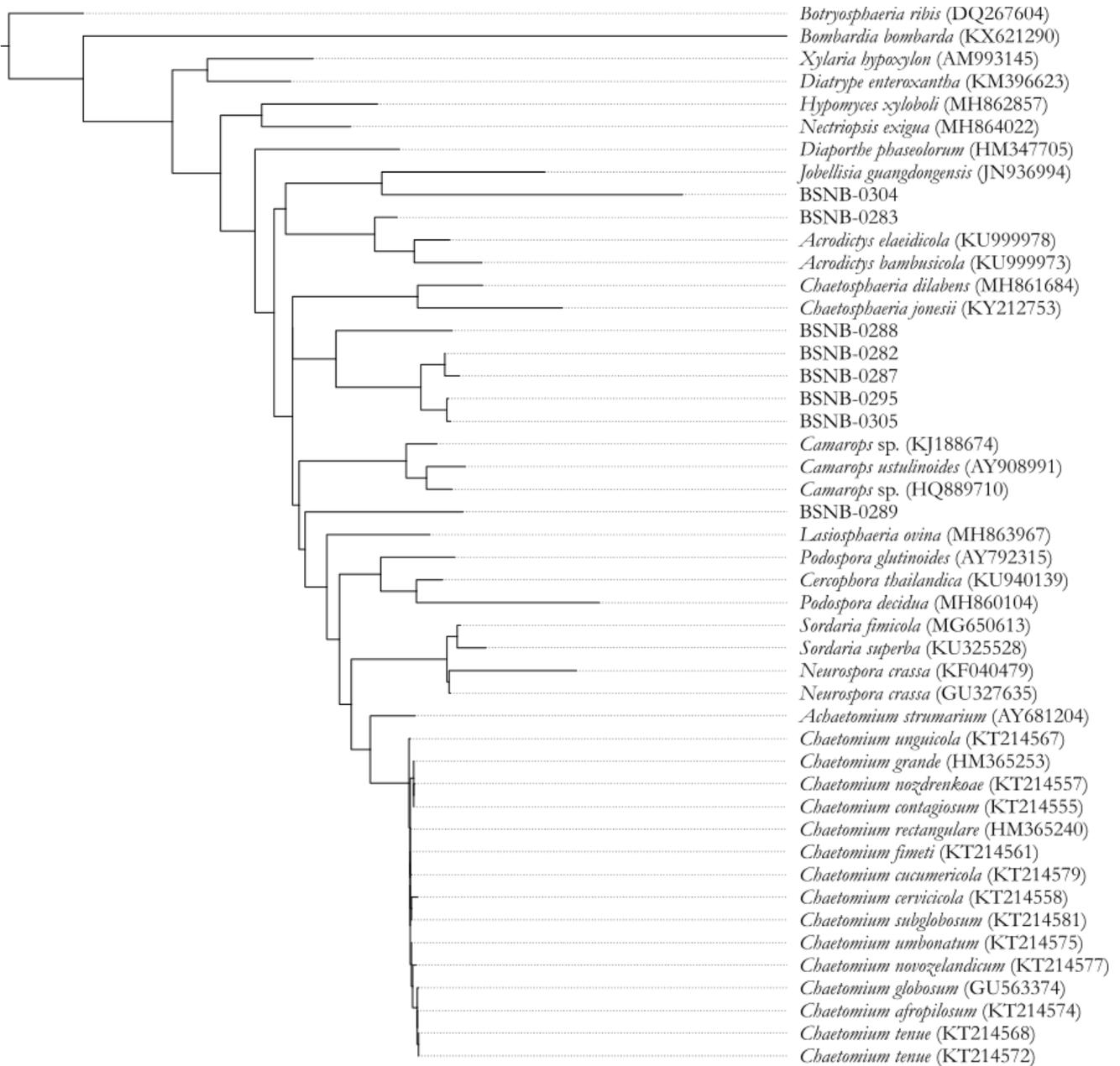


0.07

Annexe S13 : Arbre phylogénétique sur le clade des Xylariales incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Botryotinia rannunculi* (MH869860).



Annexe S14: Arbre phylogénétique sur le clade des Sordariomycetes incluant les séquences ITS de souches de notre communauté. L'arbre est raciné avec le groupe externe *Botryosphaeria ribis* (DQ267604).



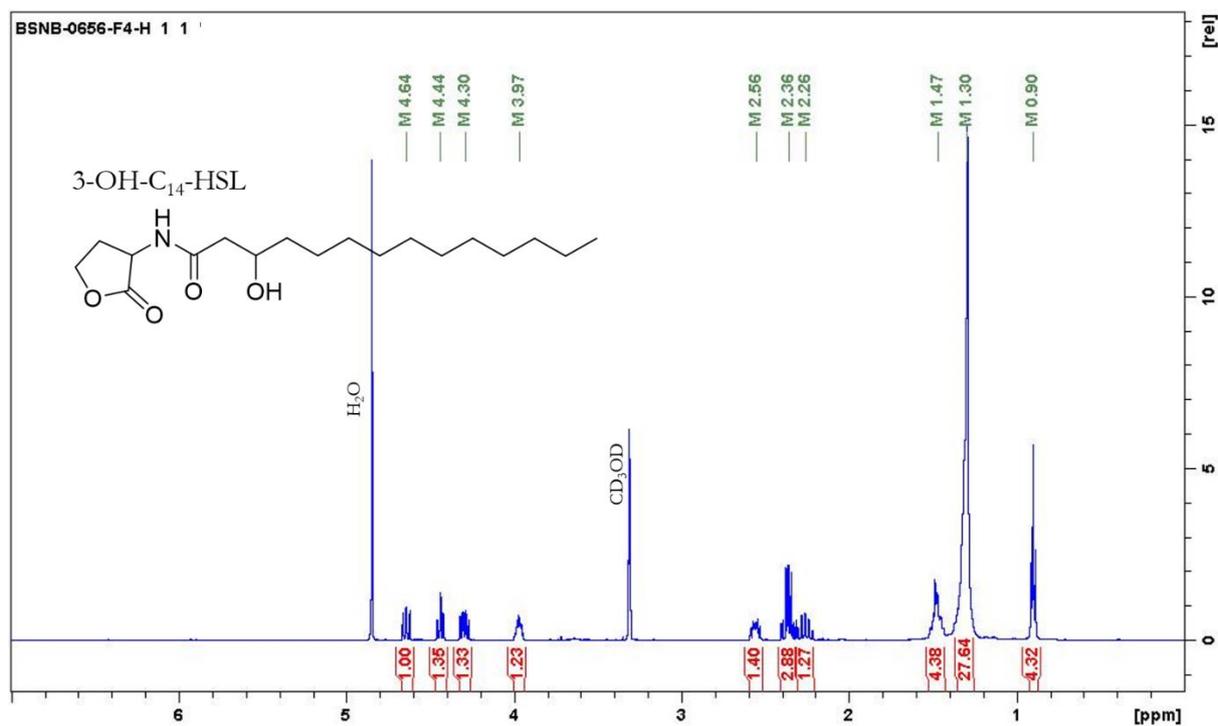
0.2

Annexe S15 : Identification des souches de *Paraburkholderia* de notre communauté et activité antimicrobienne, cytotoxique et quorum quenching de leur extrait à l'AcOEt.

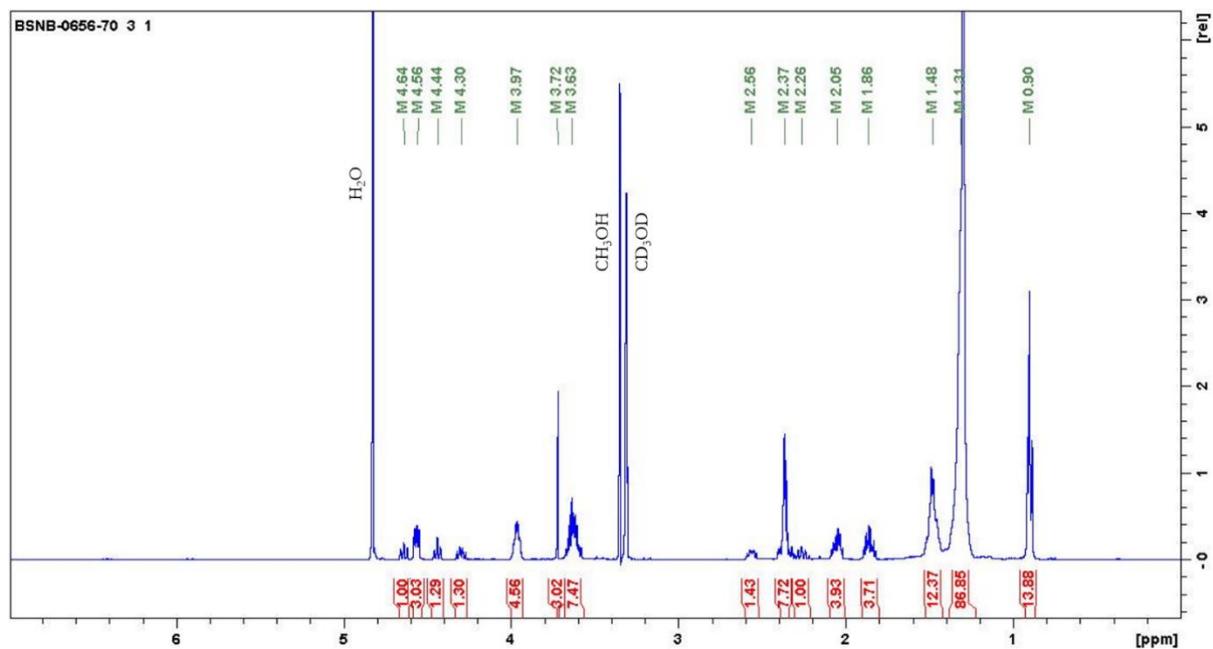
Code BSNB	Astrocaryum sciophilum		GenBank acc. N°	Espèce <sup>1</sup>	CMI SARM (µg/mL)	CMI T. rubrum (µg/mL)	Cytotoxicité MRC-5 (% viabilité)	MT102 6h	MT102 24h	viabilité	F117 6h	F117 24h	viabilité	CV026 (cm inhibition)	viabilité	Agr inhibition (% croissance)
	N°	Feuille						% Fluorescence	% Fluorescence		% Fluorescence					
-0519	1	fermé	MK643330	sp. 8	> 256		102,6 ± 4,6	130 ± 3	85 ± 1	TOX	114 ± 1	20 ± 2	TOX+QQ	3.8	QQ	70.4 ± 7.7
-0521	1	fermé	MK643273	sp. 1	> 256	64	67 ± 2	85 ± 14	57 ± 2		106 ± 1	53 ± 4		-		12.8 ± 1.6
-0545	1	vieille	MK643272	sp. 7	> 256	> 256		85 ± 8	65 ± 4	TOX	112 ± 1	52 ± 3	TOX	-		41.1 ± 8.5
-1020	1	vieille	MK643280	sp. 8	> 256	256	101,4 ± 1,7	103 ± 1	54 ± 2	TOX+QQ	154 ± 8	26 ± 6		4cm	QQ	48.9 ± 14.7
-0562	2	fermé	MK643323	sp. 5	> 256	32	60 ± 1	333 ± 7	181 ± 3		107 ± 1	92 ± 3	TOX	-		29.9 ± 11.3
-0563	2	fermé	MK643324	sp. 5	> 256	32	59 ± 2	162 ± 8	145 ± 13		104 ± 0	113 ± 1		-		36.6 ± 4.3
-0564	2	fermé	MK643325	sp. 5	> 256	32	63 ± 2	145 ± 8	136 ± 6		101 ± 0	228 ± 18		-		31.4 ± 4.5
-0565	2	fermé	MK643328	sp. 4	> 256	256		100 ± 0	108 ± 4		124 ± 1	198 ± 29	TOX	-		29.1 ± 14.8
-0572	2	Jeune	MK643293	sp. 8	> 256	> 256		155 ± 11	113 ± 3		159 ± 6	23 ± 3	TOX	3.1	QQ	46.8 ± 2.9
-0626	3	Jeune	MK643281	sp. 8	> 256	> 256		116 ± 9	110 ± 5		165 ± 5	29 ± 2	TOX	3.2	QQ	33.6 ± 0.5
-0630	3	vieille	MK643284	sp. 8	> 256	> 256		100 ± 1	103 ± 1		199 ± 39	44 ± 3		-		43.8 ± 4.0
-0632	3	vieille	MK643282	sp. 8	> 256	> 256		346 ± 3	209 ± 1		117 ± 2	19 ± 4	TOX+QQ	2.7	QQ	34.0 ± 1.1
-0635	3	vieille	MK643297	sp. 6	> 256	> 256		133 ± 4	252 ± 4	TOX	353 ± 36	96 ± 2	TOX	-		31.3 ± 5.5
-0636	3	vieille	MK643298	sp. 6	> 256	> 256		160 ± 27	261 ± 5		354 ± 4	91 ± 2	TOX	-		27.1 ± 2.7
-0639	3	vieille	MK643279	sp. 8	> 256	> 256		221 ± 54	274 ± 2		449 ± 15	83 ± 8	TOX	3.5	QQ	27.4 ± 12.1
-0640	3	vieille	MK643296	sp. 6	> 256	> 256		100 ± 0	84 ± 2		164 ± 8	33 ± 1		-		33.6 ± 10.6
-0648	4	Jeune	MK643299	sp. 3	> 256	> 256		82 ± 3	89 ± 4		141 ± 15	112 ± 8		-		27.1 ± 6.1
-0656	4	vieille	MK643277	sp. 2	> 256	128	60,2 ± 4,5	105 ± 2	44 ± 6	TOX+QQ	128 ± 7	20 ± 4		4.2	QQ	62.1 ± 3.6
-0658	4	vieille	MK643278	sp. 2	> 256	256	100,1 ± 2,8	103 ± 1	40 ± 0	TOX+QQ	106 ± 4	23 ± 7	TOX	4.4	QQ	75.5 ± 9.4
-0661	4	vieille	MK643276	sp. 2	> 256	256	104,8 ± 3,3	107 ± 3	82 ± 9		123 ± 6	25 ± 5	TOX	2	QQ	57.6 ± 4.7
-0663	4	vieille	MK643283	sp. 8	> 256	> 256		166 ± 5	291 ± 4		422 ± 19	77 ± 3	TOX	3.4	QQ	43.4 ± 6.0
-0670	5	fermé	MK643275	sp. 8	256	> 256	97,8 ± 3,0	104 ± 1	61 ± 9	TOX	116 ± 1	21 ± 2	TOX	3.3	QQ	32.1 ± 3.5

<sup>1</sup> La répartition en différentes espèces est donnée par la comparaison de l'empreinte protéique de chaque souche analysée par MALDI-TOF MS

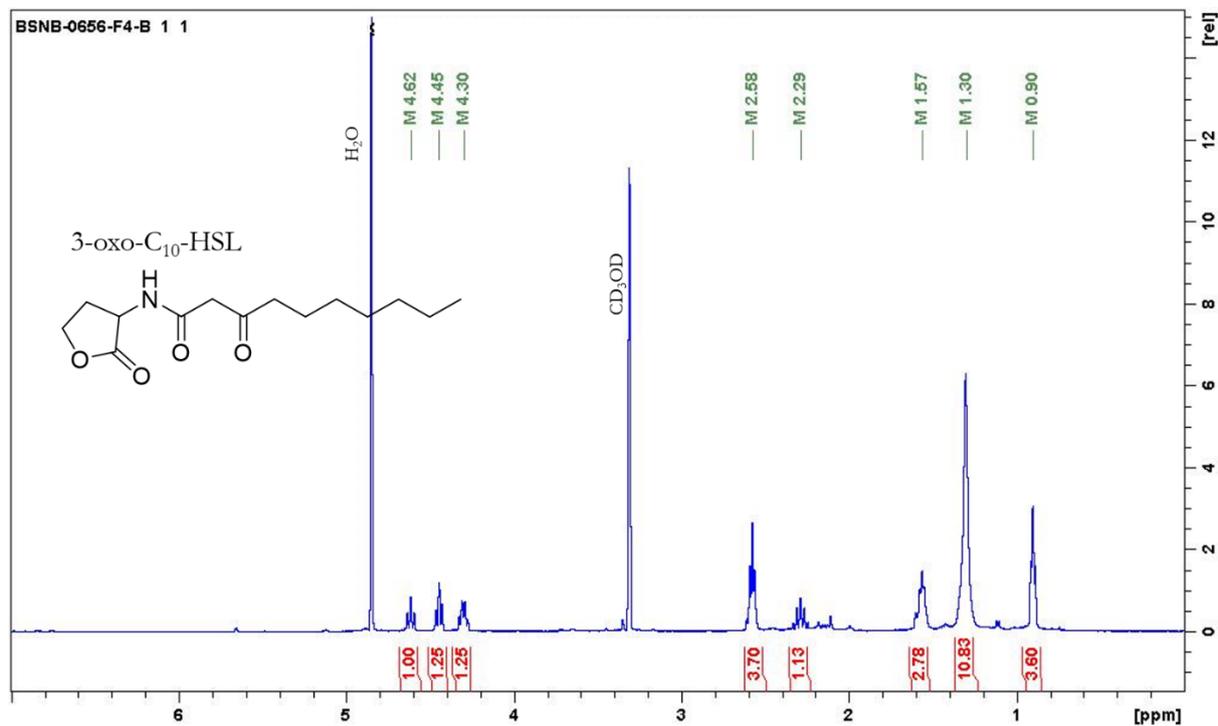
Annexe S16 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la 3-OH-C<sub>14</sub>-HSL (**1**) avant dégradation.



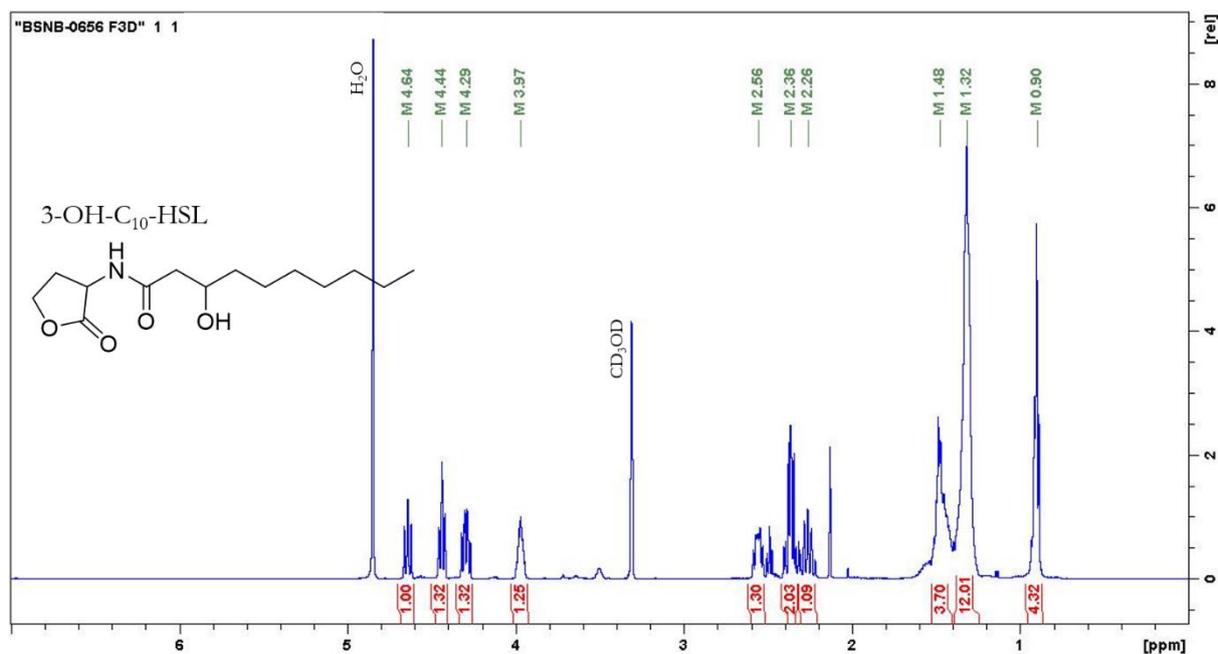
Annexe S17 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la 3-OH-C<sub>14</sub>-HSL (**1**) en cours de dégradation.



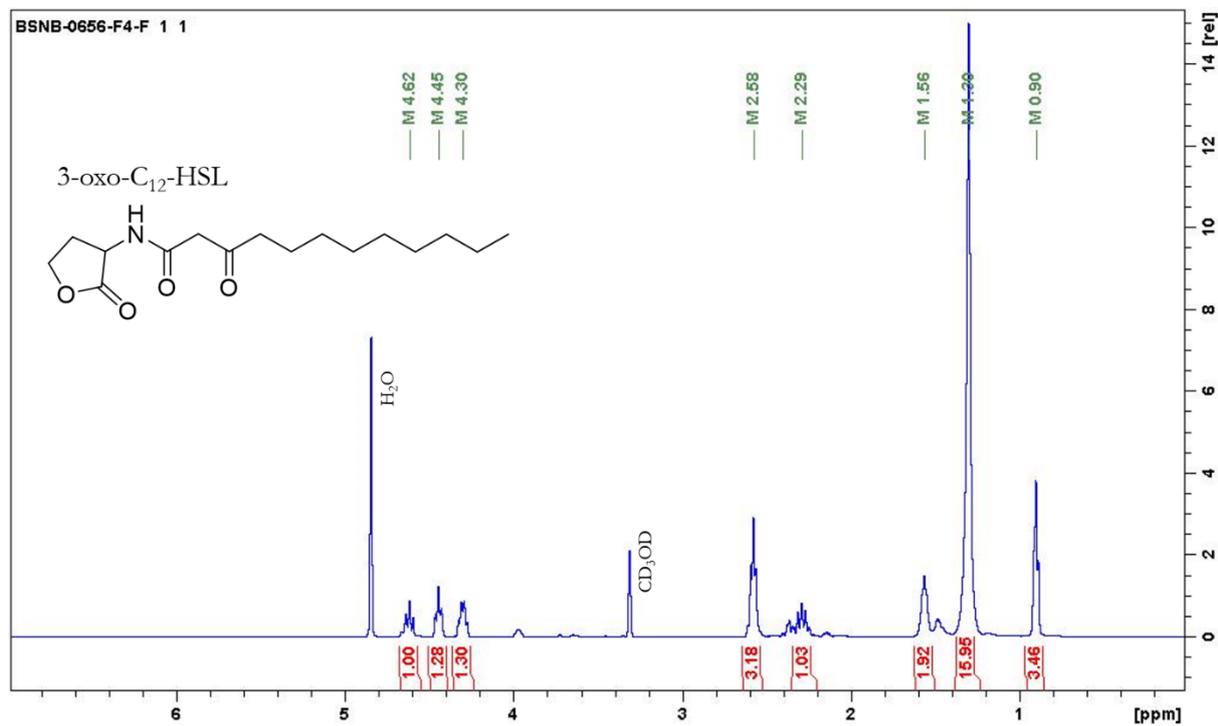
Annexe S18: Spectre RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la 3-oxo- $\text{C}_{10}$ -HSL (**2**) avant dégradation.



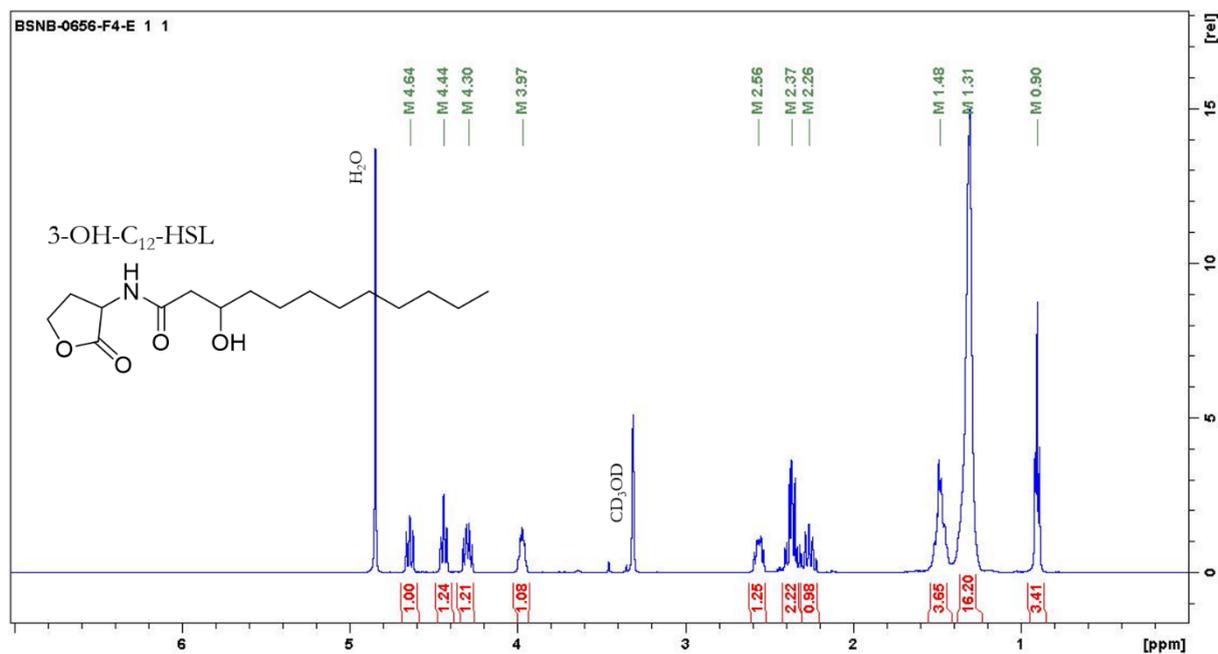
Annexe S19: Spectre RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la 3-OH- $\text{C}_{10}$ -HSL (**3**) avant dégradation.



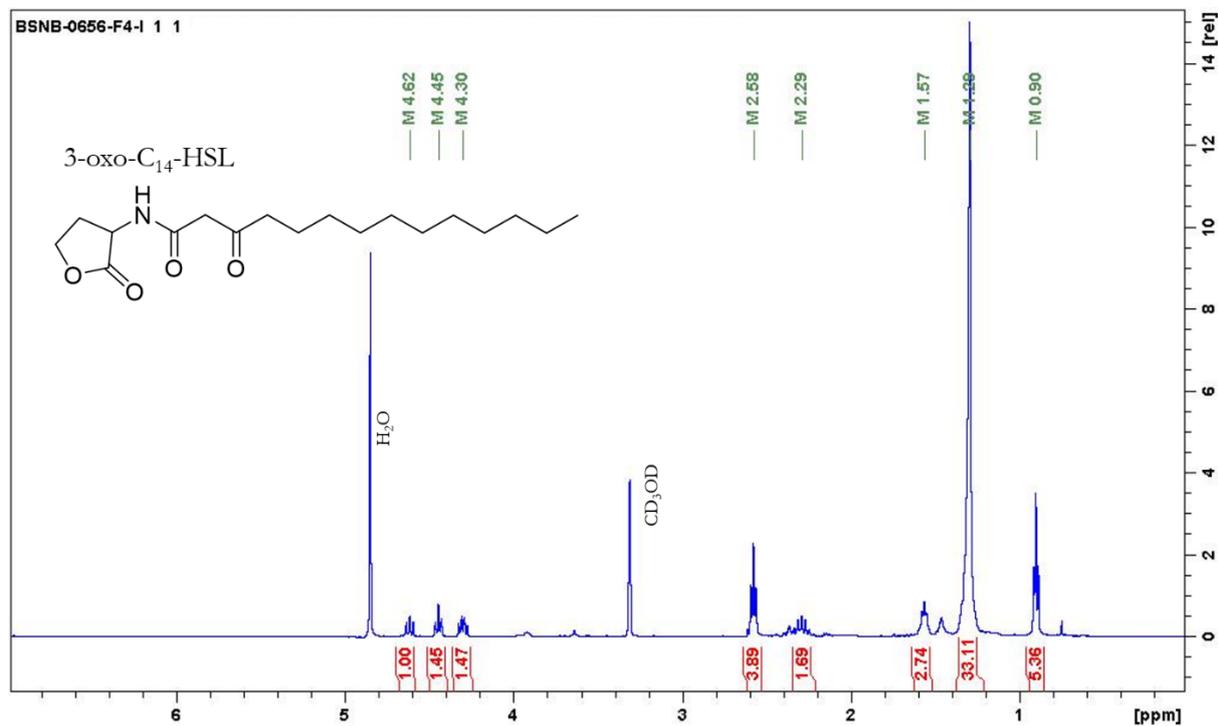
Annexe S20: Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL (**4**) avant dégradation.



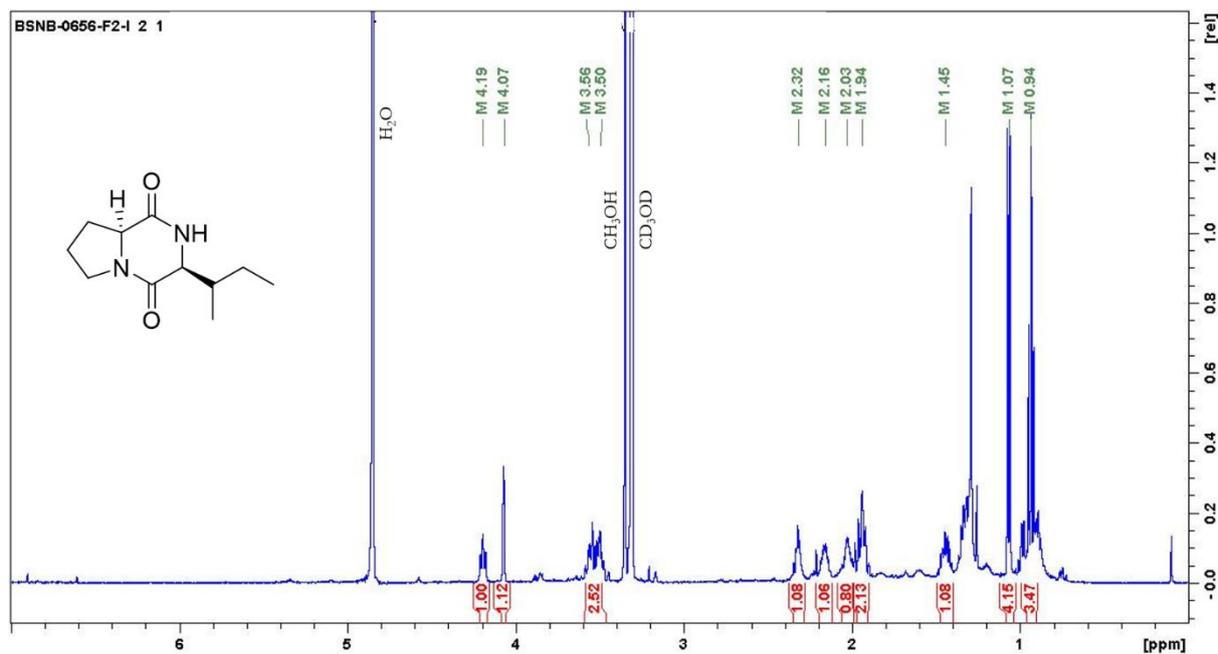
Annexe S21: Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL (**5**) avant dégradation.

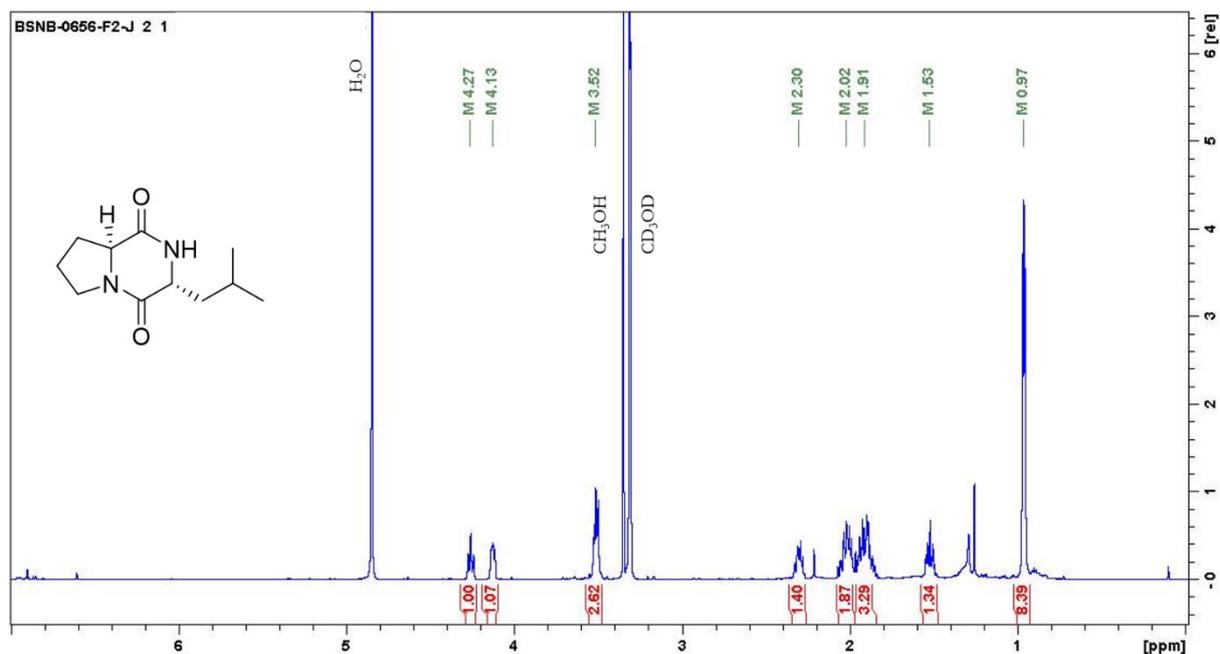
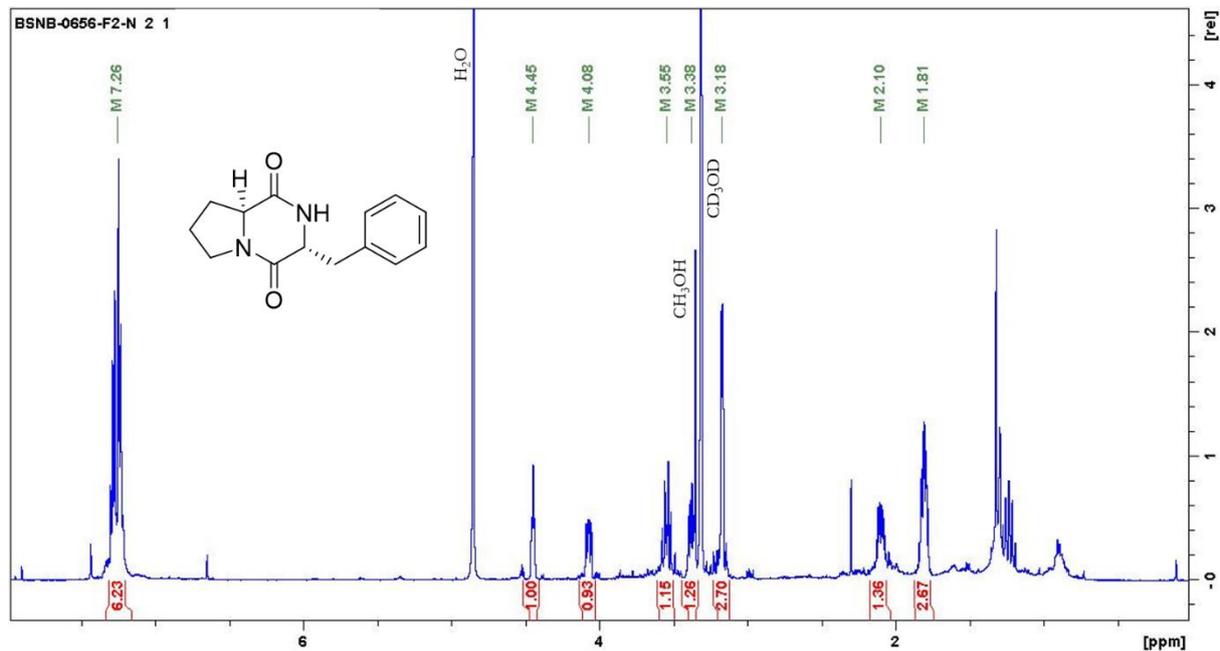


Annexe S22 : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la 3-oxo- $\text{C}_{14}$ -HSL (**6**) avant dégradation.



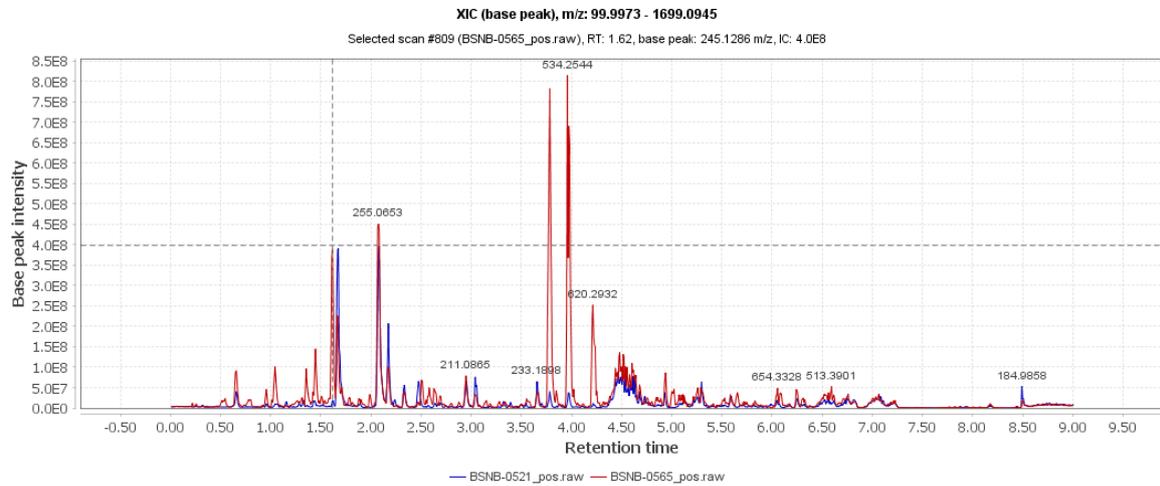
Annexe S23 : Spectre RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de la cyclo-(*S*-Pro-*S*-Ile) (**7**).



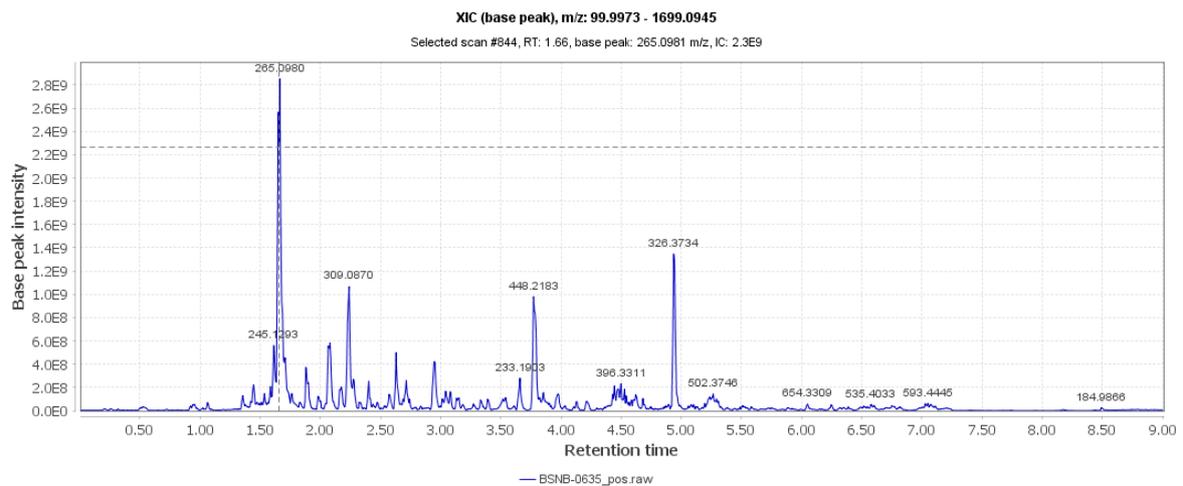
Annexe S24 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la cyclo-(*S*-Pro-*R*-Leu) (**8**).Annexe S25 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la cyclo-(*S*-Pro-*R*-Phe) (**9**).

## Annexe S26 : Profils UHPLC MS/MS des différentes espèces/ sous-espèces de *Paraburkholderia* sp.

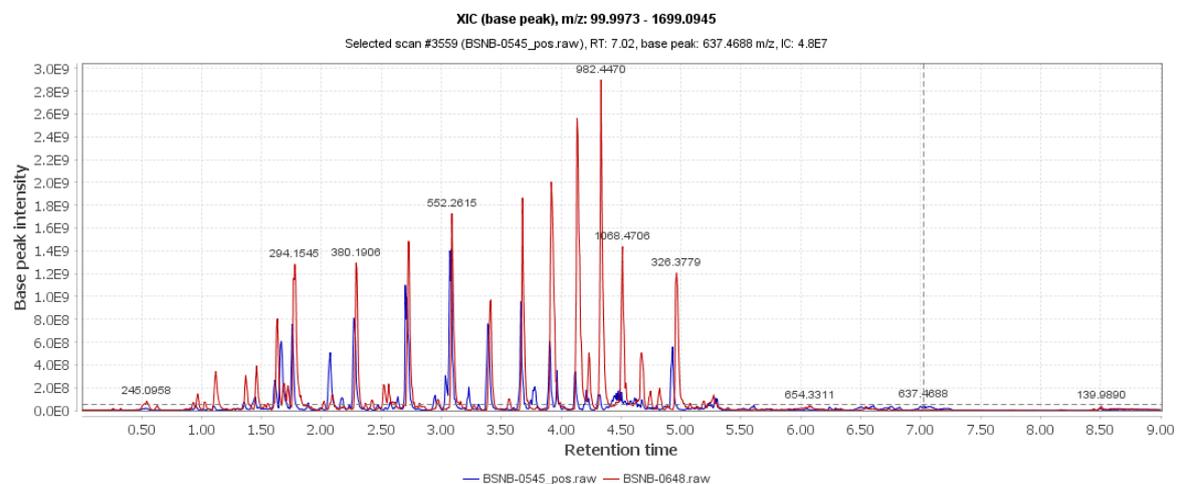
### *Paraburkholderia* sp.1 et sp.2



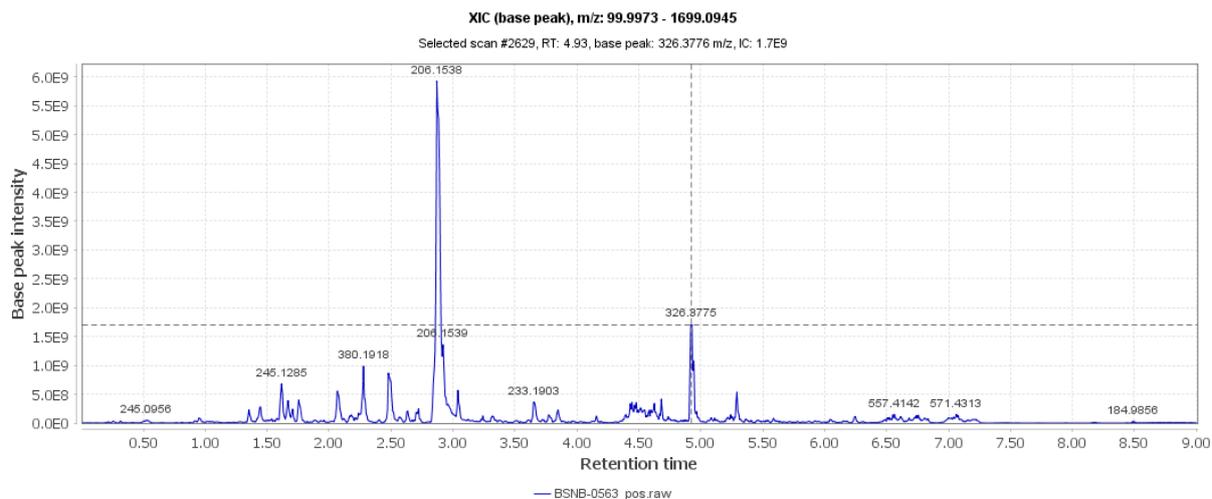
### *Paraburkholderia* sp.6



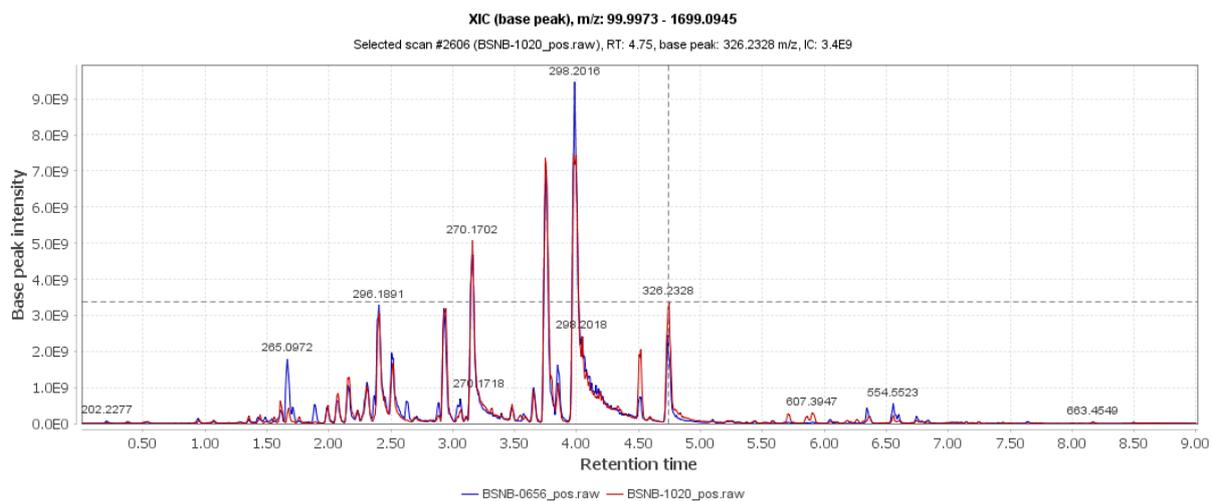
### *Paraburkholderia* sp.7 et sp.3



***Paraburkholderia* sp.5**



***Paraburkholderia* sp.2 et sp.8**



Annexe S27 : Quantités (mg) obtenu lors de l'extraction des souches BSNB-0661, BSNB-0670 et du milieu gélosé suivant les conditions de températures et de solvants.

***Paraburkholderia* sp. BSNB-0661**

Extrait AcOEt	Quantité (mg)
Culture 10°C N°1	2,7
Culture 10°C N°2	0,9
Culture 10°C N°3	1,3
Culture 15°C N°1	10,4
Culture 15°C N°2	10,3
Culture 15°C N°3	12,4
Culture 20°C N°1	10,4
Culture 20°C N°2	10,2
Culture 20°C N°3	10,1
Culture 28°C N°1	7,1
Culture 28°C N°2	5,8
Culture 28°C N°3	6,9
Culture 35°C N°1	5,7
Culture 35°C N°2	4,3
Culture 35°C N°3	2,9

***Paraburkholderia* sp. BSNB-0670**

Extrait AcOEt	Quantité (mg)
Culture 10°C N°1	-
Culture 10°C N°2	-
Culture 10°C N°3	-
Culture 15°C N°1	8,5
Culture 15°C N°2	8,6
Culture 15°C N°3	9,5
Culture 20°C N°1	4,1
Culture 20°C N°2	5,4
Culture 20°C N°3	7,5
Culture 28°C N°1	12,7
Culture 28°C N°2	12,5
Culture 28°C N°3	12,6
Culture 35°C N°1	14,9
Culture 35°C N°2	13,5
Culture 35°C N°3	11,9

**Milieu gélosé**

Extrait AcOEt	Quantité (mg)
10°C	2,1
15°C	2,5
20°C	1,7
28°C	2,3
35°C	1,2

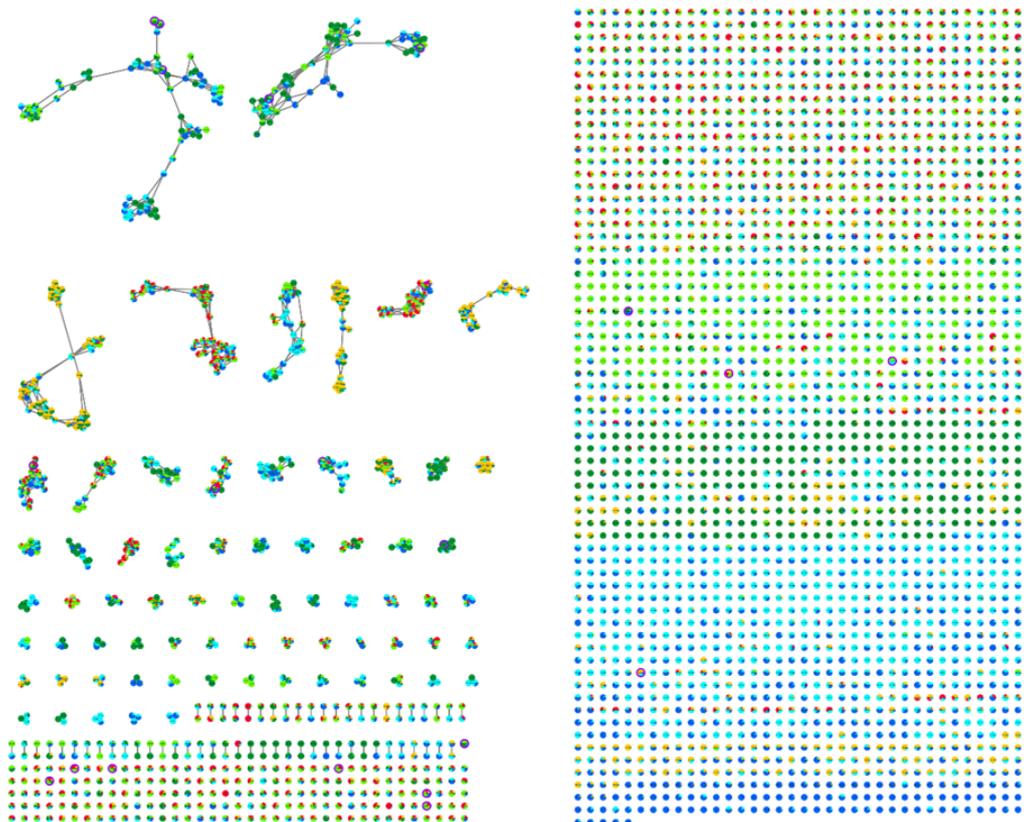
Extrait sans lavage à l'eau	Quantité (mg)
Culture 20°C N°1	11,8
Culture 20°C N°2	9,1
Culture 20°C N°3	11,8

Extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Quantité (mg)
Culture 28°C	5,6

Annexe S28 : Liste des standards AHLs utilisés avec leur temps de rétention dans les conditions chromatographiques utilisées. A chaque standard, le  $m/z$  de l'ion correspondant à la molécule hydrolysée est associé, ainsi que le temps de rétention dans les conditions chromatographiques utilisées.

Standard	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	RT (min)	$m/z$ [M+H+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	RT (min)
3-OH-C <sub>4</sub> -HSL	188,0919	1,14	206,1025	?
C <sub>6</sub> -HSL	200,1277	5,97	218,1383	?
C <sub>7</sub> -HSL	214,144	6,39	232,1546	6,29
C <sub>8</sub> -HSL	228,1594	6,77	246,17	6,73
3-oxo-C <sub>8</sub> -HSL	242,1388	6,21	260,1494	?
C <sub>9</sub> -HSL	242,1752	7,17	260,1858	7,18
OH-C <sub>8</sub> -HSL	244,1545	5,97	262,1651	6
C <sub>10</sub> -HSL	256,191	7,57	274,2016	7,65
3-oxo-C <sub>10</sub> -HSL	270,1702	6,96	288,1808	?
C <sub>11</sub> -HSL	270,2077	7,99	288,2183	8,15
OH-C <sub>10</sub> -HSL	272,1861	6,68	290,1967	6,82
C <sub>12</sub> -HSL	284,2243	8,45	302,2349	8,68
3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL	298,2014	7,73	316,212	?
3-OH-C <sub>12</sub> -HSL	300,2168	7,41	318,2274	7,69
C <sub>13</sub> -HSL	298,2399	8,95	316,2505	9,25
C <sub>14</sub> :1-Δ <sup>9</sup> -cis-(L)-HSL	310,2383	8,77	328,2489	9,09
C <sub>14</sub> -HSL	312,2565	9,48	330,2671	9,86
3-oxo-C <sub>14</sub> :1-Δ <sup>7</sup> -cis-(L)-HSL	324,2173	8,13	342,2279	?
C <sub>15</sub> -HSL	326,2708	10,06	344,2814	10,52
3-OH-C <sub>14</sub> -HSL	328,2502	8,26	346,2608	8,69
3-oxo-C <sub>14</sub> -HSL	326,2327	8,59	344,2433	?
C <sub>16</sub> :1-Δ <sup>9</sup> -(L)-HSL	338,2691	9,8	356,2797	10,27
C <sub>16</sub> -HSL	340,2863	10,6	358,2969	11,27
3-oxo-C <sub>16</sub> :1-Δ <sup>11</sup> cis-(L)-HSL	352,2489	8,9	370,2595	?
3-oxo-C <sub>16</sub> -HSL	354,2641	9,62	372,2747	?
C <sub>18</sub> :1-Δ <sup>9</sup> cis-(L)-HSL	366,3004	11	384,311	11,61
C <sub>18</sub> -HSL	368,3181	12	386,3287	12,65

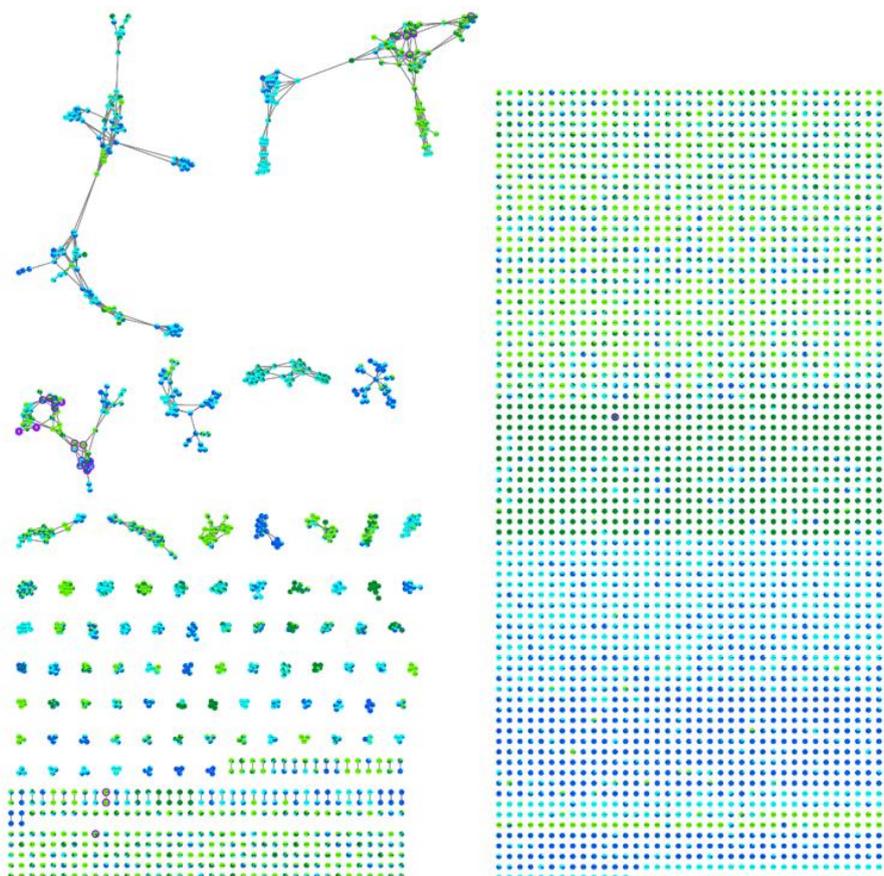
Annexe S29 : Réseau moléculaire formé à partir de données UHPLC-MS/MS des extraits à l'AcOEt de *Paraburkholderia* sp. (BSNB-0661) cultivée à différentes températures. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par un diagramme circulaire dont les proportions dépendent de l'intégration du signal XIC de l'ion dans les extraits.



Nœud retrouvé dans les extraits

- Milieu gélosé
- BSNB-0661 en culture à 10°C
- BSNB-0661 en culture à 15°C
- BSNB-0661 en culture à 20°C
- BSNB-0661 en culture à 28°C
- BSNB-0661 en culture à 35°C
- Nœud relatif à un des standards AHL

Annexe S30 : Réseau moléculaire formé à partir de données UHPLC-MS/MS des extraits à l'AcOEt de *Paraburkholderia* sp. (BSNB-0670) cultivée à différentes températures. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par un diagramme circulaire dont les proportions dépendent de l'intégration du signal XIC de l'ion dans les extraits.



Nœud retrouvé dans les extraits

- Milieu gélosé
- BSNB-0670 en culture à 15°C
- BSNB-0670 en culture à 20°C
- BSNB-0670 en culture à 28°C
- BSNB-0670 en culture à 35°C
- Nœud relatif à un des standards AHL

## Annexe S31 : Détermination des droites de calibration des standards AHLs à partir de leur dosage dans différentes solutions stock.

	Aire					
Concentration solution stock	C <sub>8</sub> -HSL	3-oxo-C <sub>8</sub> -HSL	OH-C <sub>8</sub> -HSL	C <sub>10</sub> -HSL	3-oxo-C <sub>10</sub> -HSL	OH-C <sub>10</sub> -HSL
2 ng/mL	924919	728431	2034069	1644743	1000572	1093404
20 ng/mL	9229497	7929150	6992164	11258143	10252066	8572919
300 ng/mL	122535537	111779757	91970720	163184634	146468553	134119104
600 ng/mL	265726330	224022784	193692412	355753744	310393212	276599745
1000 ng/mL	456516939	406639126	350100086	622406128	518656684	476622574
2000 ng/mL	869291946	706658407	645033826	1157723100	954105206	897228448
Coeff. Directeur	438772	364755	327337	587202	487533	454544
R2	0,9991	0,9938	0,9979	0,9983	0,9974	0,9989

	Aire					
Concentration solution stock	C <sub>12</sub> -HSL	3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL	3-OH-C <sub>12</sub> -HSL	C <sub>14</sub> -HSL	3-oxo-C <sub>14</sub> -HSL	3-OH-C <sub>14</sub> -HSL
2 ng/mL	1491514	1286370	1244075	1622285	1138272	1479120
20 ng/mL	14619525	12286719	12261434	16061193	9904566	12518147
300 ng/mL	215898042	173566371	182972449	245670499	159941971	195226189
600 ng/mL	452255079	353073941	376175408	496826803	332703686	399575339
1000 ng/mL	765104675	624824555	659750497	885466352	548606417	705174620
2000 ng/mL	1422531344	1119999080	1198495804	1707860171	1080608791	1270000827
Coeff. Directeur	724090	574083	612356	857424	542644	650180
R2	0,9982	0,9963	0,9972	0,9994	0,9999	0,9966

	Aire							
Concentration solution stock	C <sub>8</sub> -HSL DEG	3-OH-C <sub>8</sub> -HSL DEG	C <sub>10</sub> -HSL DEG	3-OH-C <sub>10</sub> -HSL DEG	C <sub>12</sub> -HSL DEG	3-OH-C <sub>12</sub> -HSL DEG	C <sub>14</sub> -HSL DEG	3-OH-C <sub>14</sub> -HSL DEG
2 ng/mL	389314	400553	739506	637298	1714090	750559	1013151	1166734
20 ng/mL	6275980	4583126	8901736	8203835	13007394	11426191	15771654	13736624
300 ng/mL	81792702	78950602	115732555	133256836	165865473	204116803	213728590	238307129
600 ng/mL	125161453	124520047	185557902	224333485	253847931	338111839	353366904	382572068
Coeff. Directeur	221492	218670	324673	387968	449223	586878	613796	668983
R2	0,9728	0,9795	0,982	0,9897	0,9726	0,9876	0,987	0,9827

Annexe 32 : Quantité (µg) en AHLs dans les extraits de *Paraburkholderia* sp.2 (BSNB-0661) et *Paraburkholderia* sp.8 (BSNB-0670).

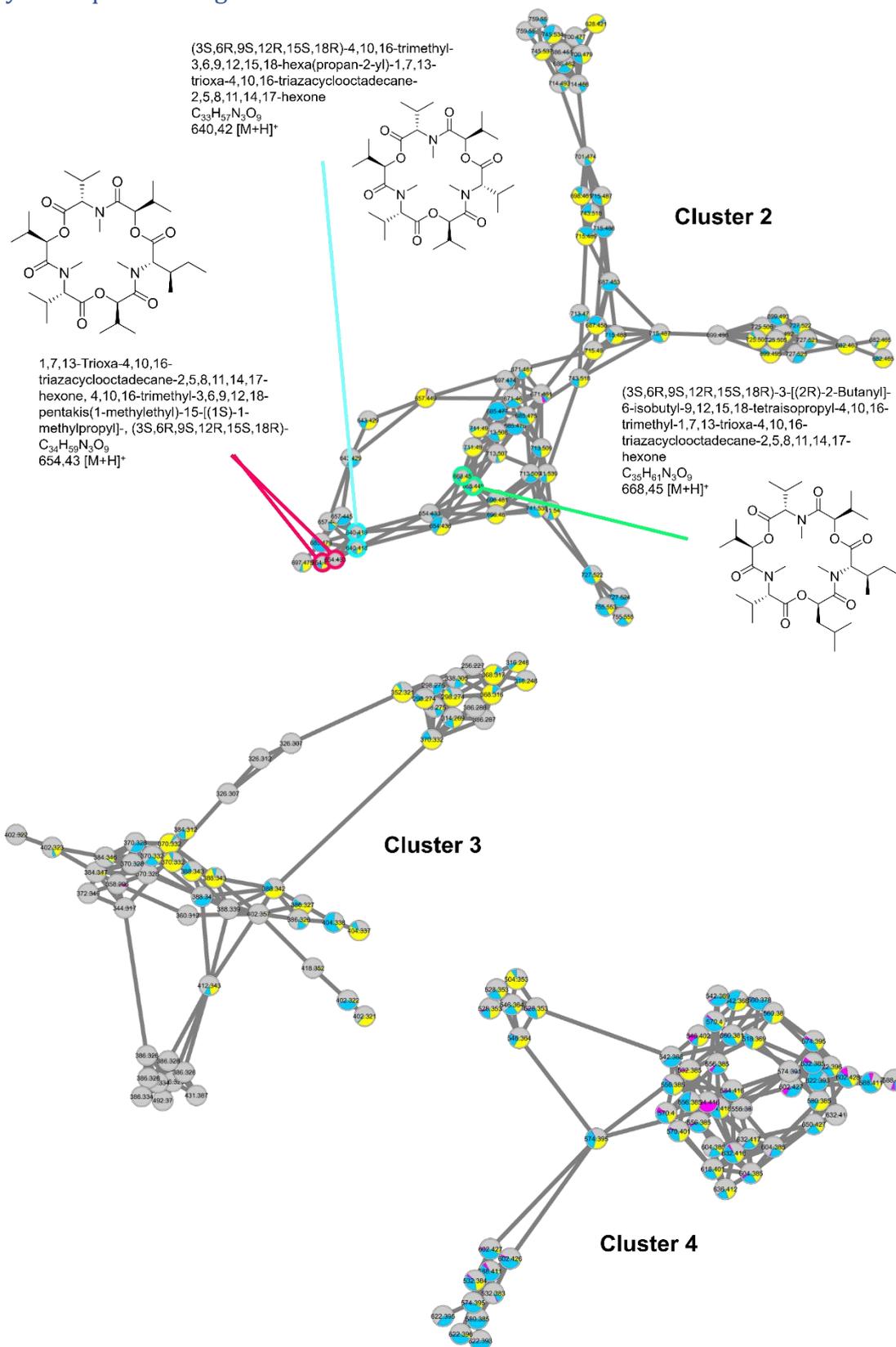
	C8-HSL					C10-HSL					C12-HSL					C14-HSL				
	NF	3-oxo	OH	NF DEG	3-OH DEG	NF	3-oxo	3-OH	NF DEG	3-OH DEG	NF	3-oxo	3-OH	NF DEG	3-OH DEG	NF	3-oxo	3-OH	NF DEG	3-OH DEG
<b>BSNB-0661</b>																				
Culture 15°C N°1	51.11	7896.14	435.64	0.97	160.63	74.91	51781.11	1448.21	3.04	192.55	1188.74	99382.81	14881.09	102.64	2507.27	326.27	42054.49	4603.48	4.52	1052.06
Culture 15°C N°2	59.64	9442.81	566.02	0.35	127.80	88.76	59500.92	2279.05	2.83	246.84	1157.98	109189.72	20259.68	71.69	4465.40	341.74	55039.69	5682.73	12.03	1259.56
Culture 15°C N°3	37.57	5791.50	210.47	0.77	28.27	83.18	45287.86	885.66	0.57	38.99	1126.39	89699.79	7819.67	58.52	509.68	251.18	37297.85	2313.23	10.78	210.05
Culture 20°C N°1	133.94	11207.59	3032.45	1.91	269.15	157.16	55396.03	10065.87	1.10	3369.00	1532.78	107495.12	28525.41	23.29	6722.65	552.52	50103.23	11291.01	13.17	2406.20
Culture 20°C N°2	140.86	16862.10	4671.18	1.48	650.18	175.38	68972.13	20570.99	0.93	5058.43	2030.15	147482.28	43159.94	44.52	12508.78	699.15	68401.07	16291.05	13.76	3724.84
Culture 20°C N°3	119.13	13906.51	4278.39	1.00	600.88	107.95	55466.07	16175.64	2.39	1402.28	1181.18	108459.91	36177.51	31.42	3769.28	462.92	52215.26	14070.47	9.51	1014.62
Culture 28°C N°1	8.86	662.26	1065.18	11.06	823.05	8.11	5760.40	15708.34	0.00	30943.32	52.64	9365.35	40086.45	21.79	47466.45	217.78	13816.94	11494.98	22.26	11115.21
Culture 28°C N°2	15.32	2124.72	5145.74	21.31	4284.89	16.80	9959.38	23359.37	0.00	30003.15	187.09	21449.49	43049.73	49.33	43688.31	349.44	20188.30	12674.21	26.67	11015.51
Culture 28°C N°3	11.84	541.88	1045.35	15.21	534.33	7.34	5434.54	18347.89	0.00	22878.07	71.79	10520.37	47037.99	17.11	40444.62	187.73	15691.12	13835.14	19.72	9048.17
Culture 35°C N°1	10.80	20.08	6.00	31.34	51.77	3.54	253.22	208.99	6.79	2503.51	84.02	666.83	686.11	23.92	4293.45	53.24	214.43	310.29	9.03	1178.16
Culture 35°C N°2	11.88	48.10	38.24	20.73	54.54	1.95	308.17	167.31	1.94	1691.28	26.38	723.60	537.40	7.43	2935.43	44.65	337.10	408.85	11.60	1002.59
Culture 35°C N°3	12.91	37.14	16.92	20.23	21.72	4.38	849.73	599.14	2.75	1002.24	59.77	2196.74	2523.45	11.82	2286.04	74.24	671.88	1063.37	6.94	790.08
<b>BSNB-0670</b>																				
Culture 15°C N°1	1008.74	7130.57	1308.75	15.65	71.75	3517.19	53707.55	6625.90	18.36	273.05	2884.00	100934.77	25493.70	7.52	1440.80	508.13	46302.97	6598.48	12.22	340.86
Culture 15°C N°2	528.94	10498.84	1129.18	8.15	57.98	2093.50	92996.64	5376.67	23.97	181.59	3026.54	181078.55	32315.47	10.79	1342.35	511.90	83105.35	7481.23	15.31	355.71
Culture 15°C N°3	1054.77	8435.63	1860.37	16.27	130.67	4265.03	49255.31	9894.29	18.30	601.55	3315.19	95354.30	29293.02	10.07	2507.99	579.97	51704.11	7593.11	3.89	395.22
Culture 20°C N°1	24.00	3503.14	600.54	25.71	566.64	19.22	14807.20	6240.55	1.45	5261.16	278.58	34714.64	14095.69	76.94	16937.79	66.65	11442.65	2860.92	12.75	3350.03
Culture 20°C N°2	41.57	4218.84	740.43	22.95	625.48	20.77	19626.74	8918.23	1.77	7073.22	289.46	39873.36	20063.05	60.92	23323.58	74.07	13458.94	2801.31	15.82	3049.27
Culture 20°C N°3	39.06	3483.79	711.47	19.85	704.76	33.29	16818.89	7344.72	3.03	5600.26	418.36	44421.83	18908.88	89.14	25409.35	99.73	13760.06	1804.49	23.63	2830.55
Culture 28°C N°1	100.51	92.12	30.94	17.14	9.08	14.88	2475.50	1756.51	1.20	4740.35	10.96	7873.70	10875.25	9.48	16347.84	10.22	753.96	1442.59	6.69	1325.25
Culture 28°C N°2	42.17	1121.14	143.85	17.66	7.54	175.23	9105.73	4498.37	1.79	5258.60	143.97	39421.88	31232.27	38.84	29067.20	51.10	5143.49	3098.71	9.47	2789.67
Culture 28°C N°3	100.30	45.16	19.61	11.93	11.58	21.25	1912.15	1972.46	0.91	4657.36	14.24	5064.23	9084.10	23.44	12607.88	8.61	647.44	1312.19	15.54	1112.73
Culture 35°C N°1	3068.31	1298.39	442.65	10.93	32.28	34.13	4174.85	7182.53	0.21	1458.13	315.86	12786.17	31035.75	37.94	5088.57	292.59	2479.55	8522.46	20.26	702.79
Culture 35°C N°2	732.06	661.34	213.88	10.19	0.00	20.92	2401.12	4105.94	1.11	1989.92	81.40	8509.67	19359.96	12.46	4204.47	112.53	1609.58	5077.62	18.09	579.48
Culture 35°C N°3	1600.14	1393.17	343.56	14.65	29.83	34.18	5576.63	6134.57	0.57	1470.60	146.11	16830.82	24696.76	53.07	5612.29	156.40	3584.61	6639.25	12.38	896.36

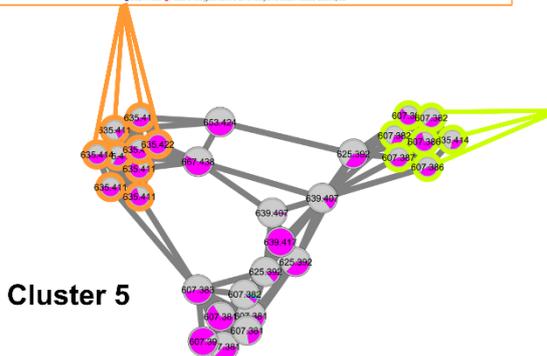
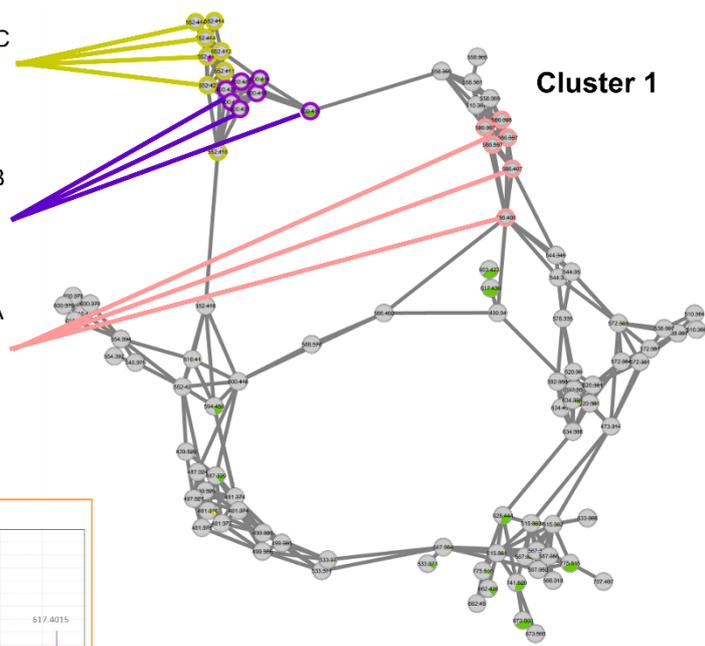
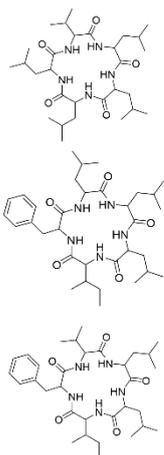
NF : non fonctionnalisé

Annexe 33 : Quantité ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  d'extrait) en AHLs dans les extraits de *Paraburkholderia* sp.2 (BSNB-0661) et *Paraburkholderia* sp.8 (BSNB-0670), sur la moyenne des trois répliquats.

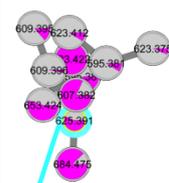
T (°C)	Souche	C <sub>8</sub> -HSL	3-oxo-C <sub>8</sub> -HSL	OH-C <sub>8</sub> -HSL	C <sub>8</sub> -DEG	OH-C <sub>8</sub> -DEG	C <sub>10</sub> -HSL	3-oxo-C <sub>10</sub> -HSL	OH-C <sub>10</sub> -HSL	C <sub>10</sub> -DEG	OH-C <sub>10</sub> -DEG	C <sub>12</sub> -HSL	3-oxo-C <sub>12</sub> -hsl	3-OH-C <sub>12</sub> -HSL	C <sub>12</sub> -DEG	OH-C <sub>12</sub> -DEG	C <sub>14</sub> -HSL	3-oxo-C <sub>14</sub> -HSL	3-OH-C <sub>14</sub> -HSL	C <sub>14</sub> -DEG	OH-C <sub>14</sub> -DEG
15	BSNB-0661	4.6	714.4	37.9	0.1	10.0	7.5	4802.7	144.0	0.2	15.2	105.9	9130.3	1342.8	7.2	238.6	28.3	4131.8	393.6	0.8	80.1
	BSNB-0670	97.1	982.5	160.4	1.5	9.6	368.7	7439.0	815.4	2.3	38.9	346.7	14322.5	3280.1	1.1	196.5	60.1	6851.1	815.2	1.2	41.0
20	BSNB-0661	12.8	1369.2	391.0	0.1	49.7	14.3	5860.1	1528.7	0.1	319.6	154.5	11844.6	3518.7	3.2	748.7	55.8	5564.5	1358.7	1.2	232.3
	BSNB-0670	6.3	700.1	126.2	4.4	116.0	4.3	3162.9	1384.3	0.4	1113.3	59.1	7258.0	3224.8	14.0	3946.1	14.4	2372.7	485.7	3.1	586.4
28	BSNB-0661	1.9	179.4	396.2	2.5	310.7	1.7	1105.4	2966.3	0.0	4282.3	16.7	2180.6	6628.5	4.7	6693.1	39.4	2567.0	1936.4	3.5	1592.0
	BSNB-0670	6.4	33.5	5.2	1.2	0.7	5.6	358.4	218.2	0.1	387.9	4.5	1391.9	1358.6	1.9	1537.7	1.9	174.1	155.2	0.8	138.6
35	BSNB-0661	3.0	9.2	5.3	5.8	9.8	0.9	136.4	94.1	0.9	392.7	13.8	347.6	371.8	3.3	741.4	15.1	115.9	172.1	2.2	237.4
	BSNB-0670	131.5	84.4	24.8	0.9	1.6	2.2	308.9	433.9	0.0	122.9	13.2	967.6	1864.1	2.6	374.9	13.7	195.6	502.0	1.2	55.1

Annexe 34 : Zoom sur les clusters du réseau moléculaire formé avec les données UHPLC-MS/MS des 131 extraits à l'AcOEt des endophytes fongiques, clusters comportant des nœuds spécifiques aux extraits porteurs d'une activité antibactérienne contre SARM et cytotoxique sur la lignée MRC-5.

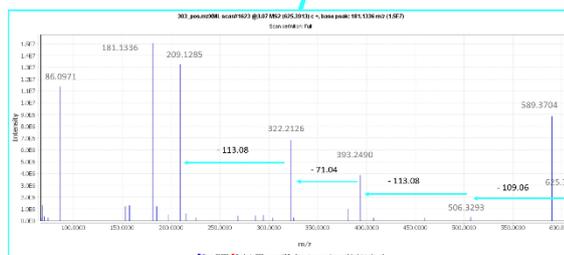
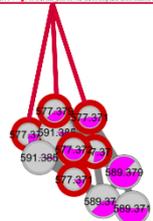




**Cluster 7**

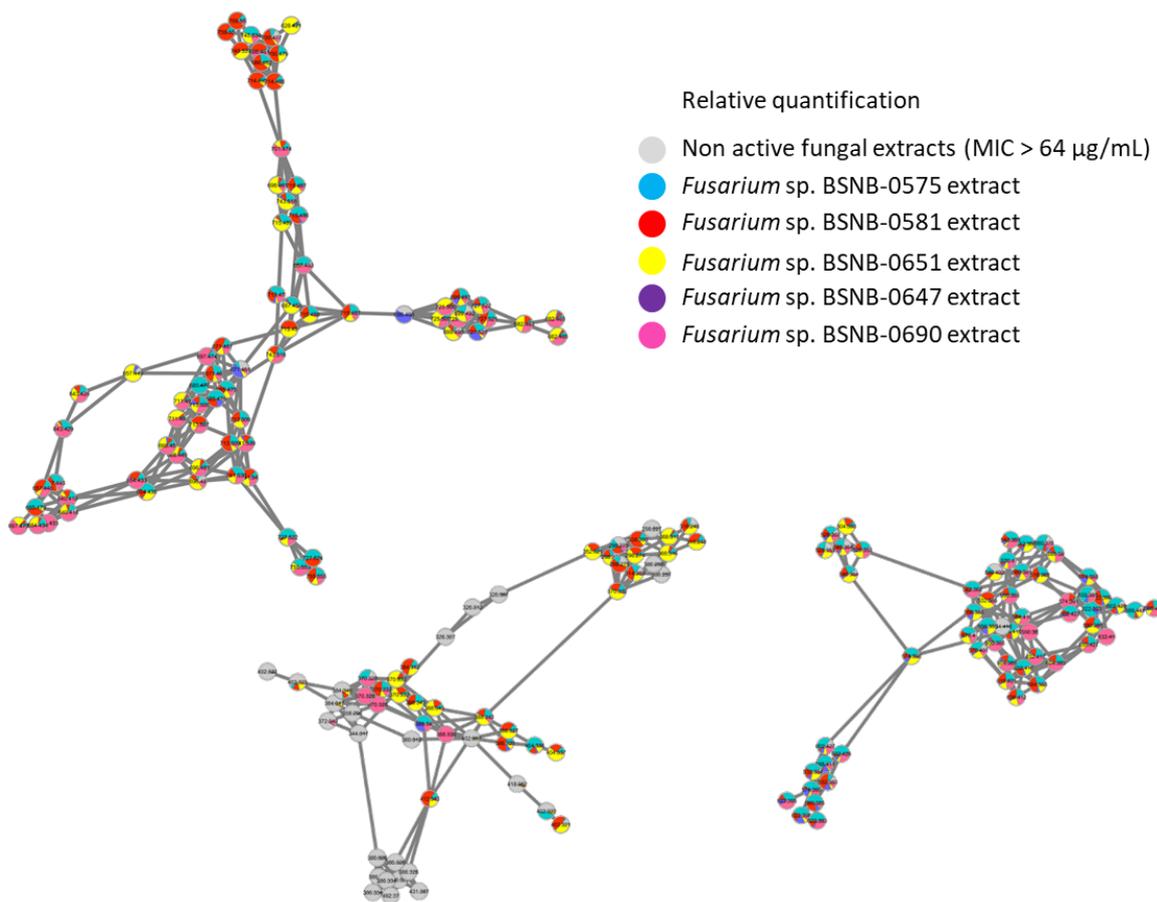


**Cluster 7**

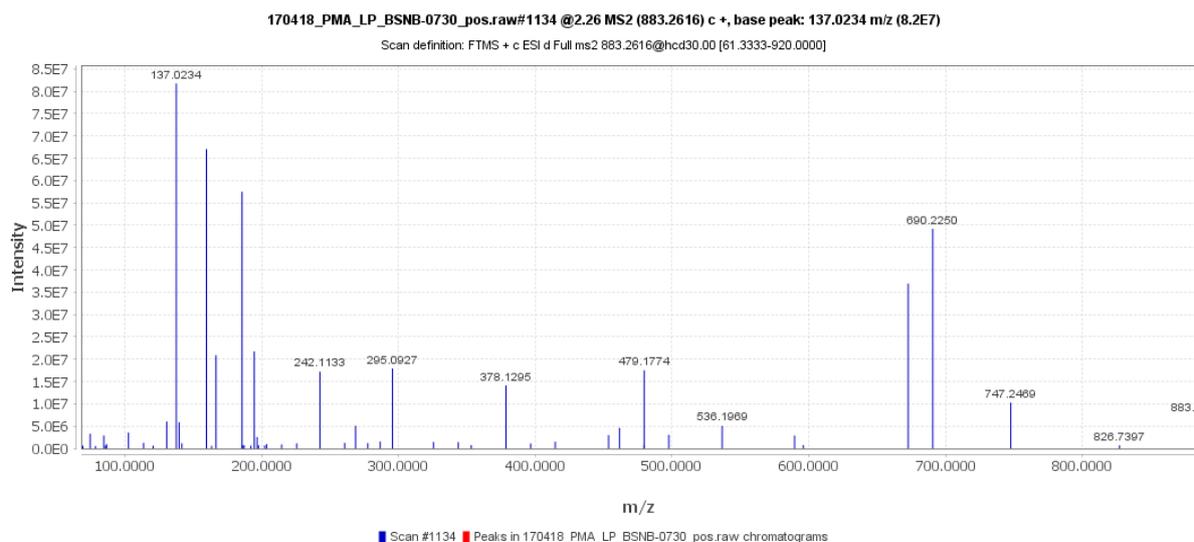


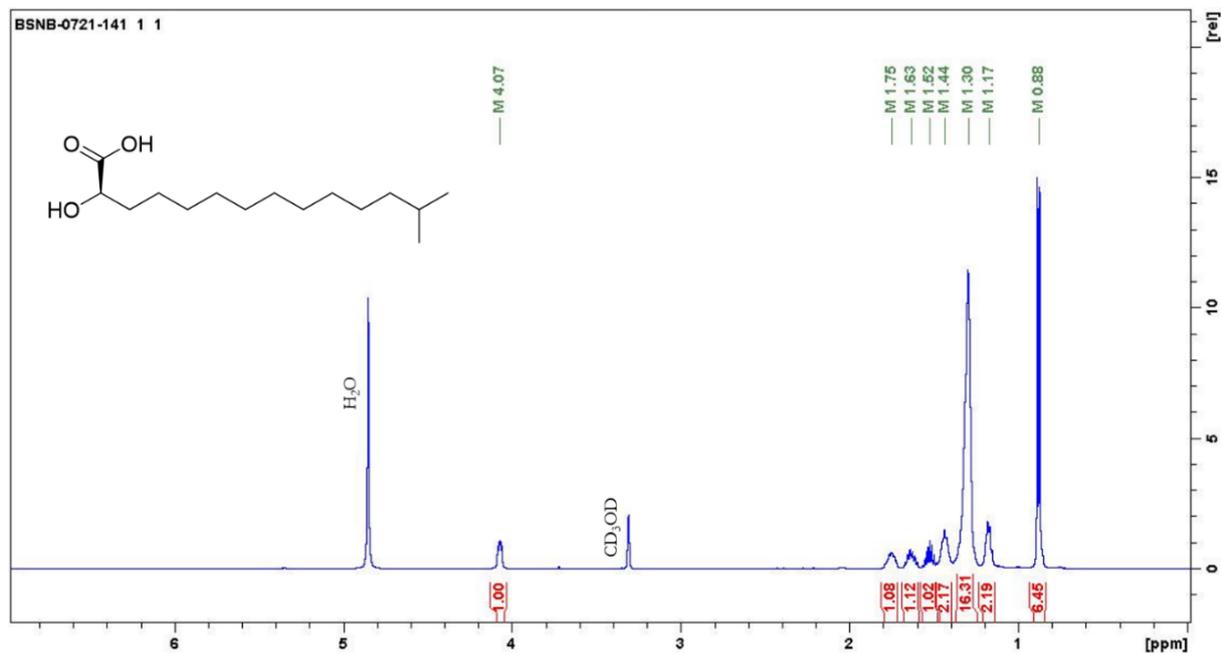
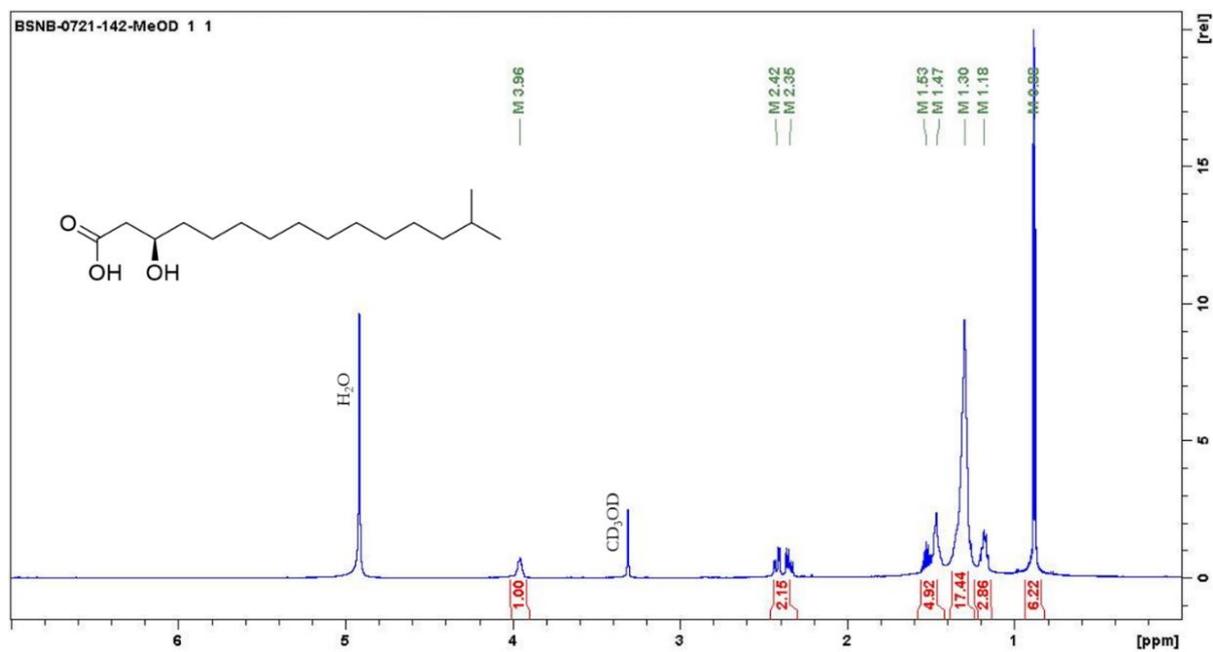


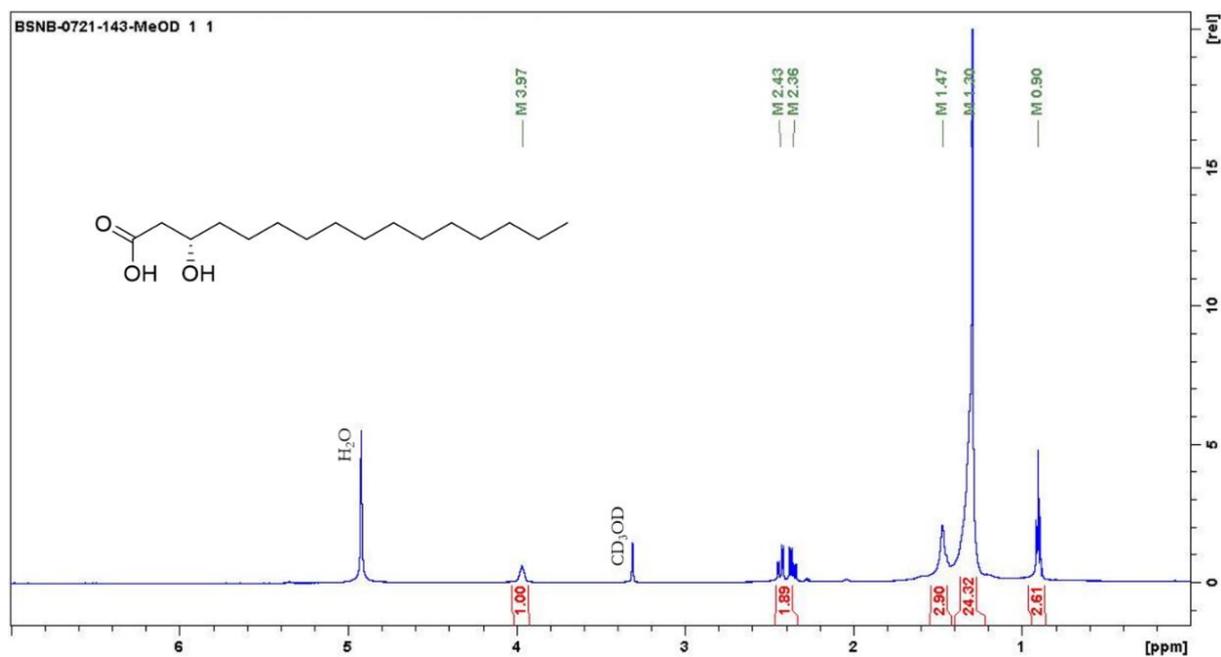
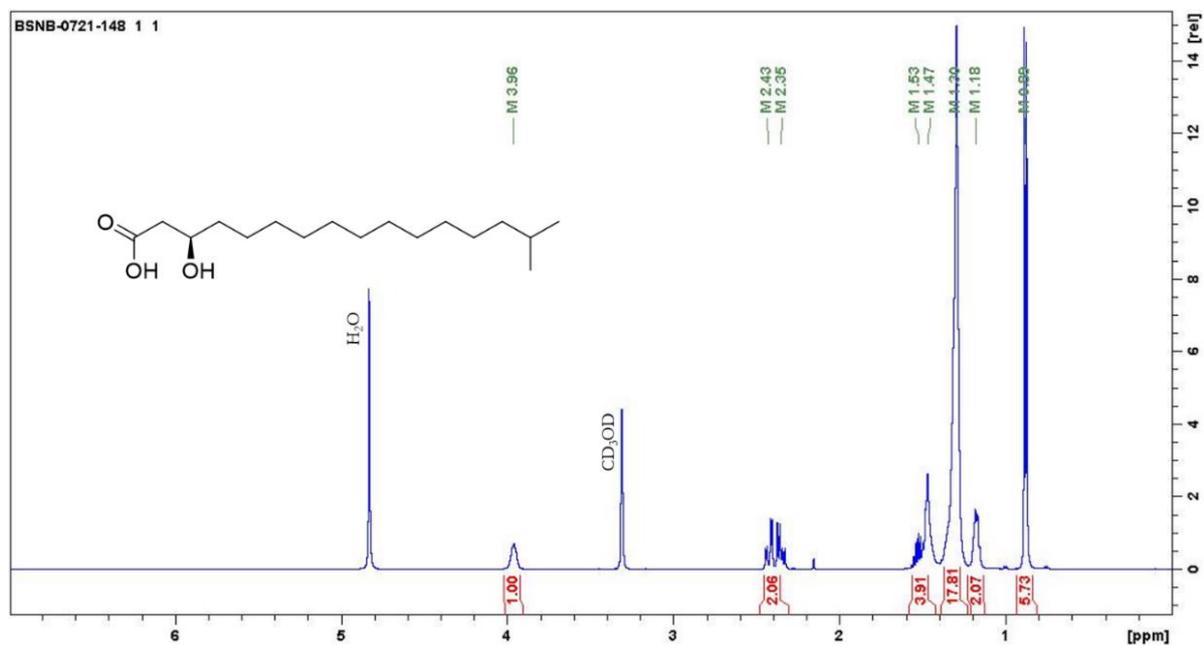
Annexe 35 : Répartition des nœuds spécifiques aux extraits de *Fusarium* sp. au sein des clusters

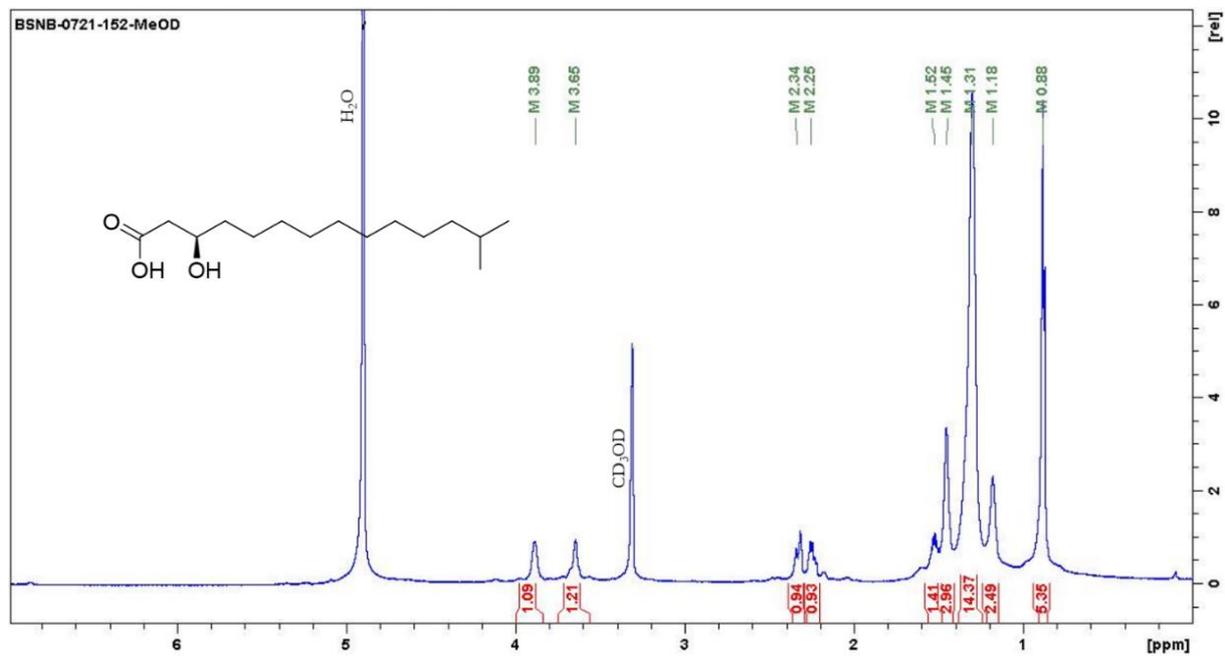
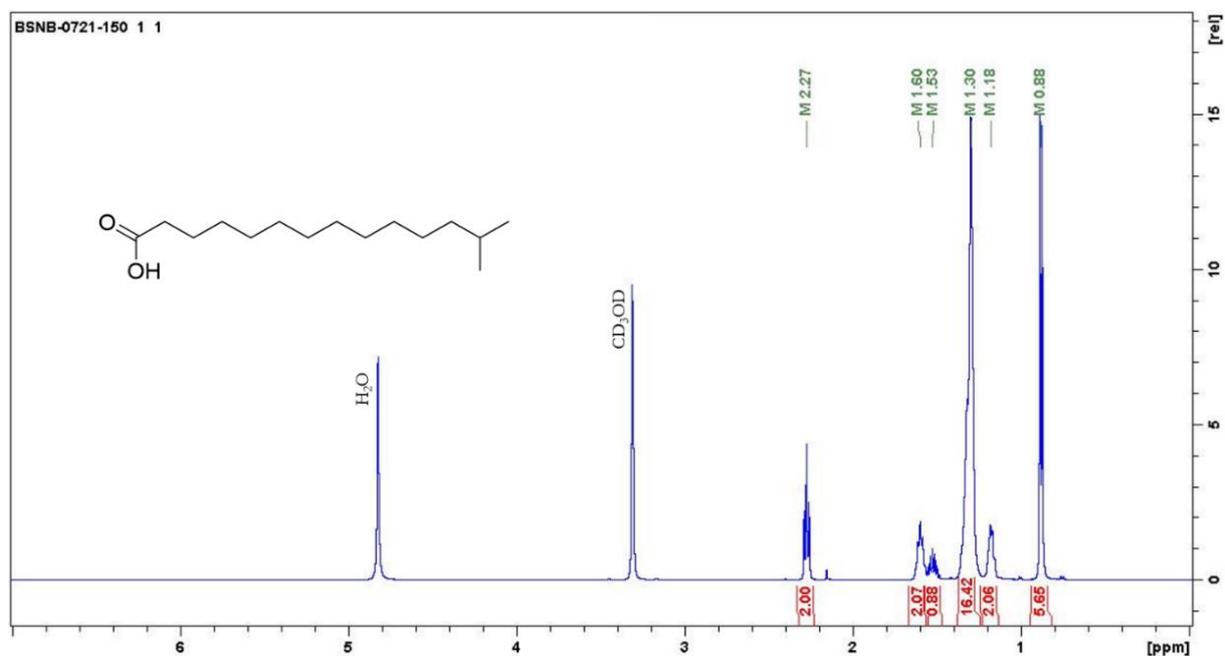


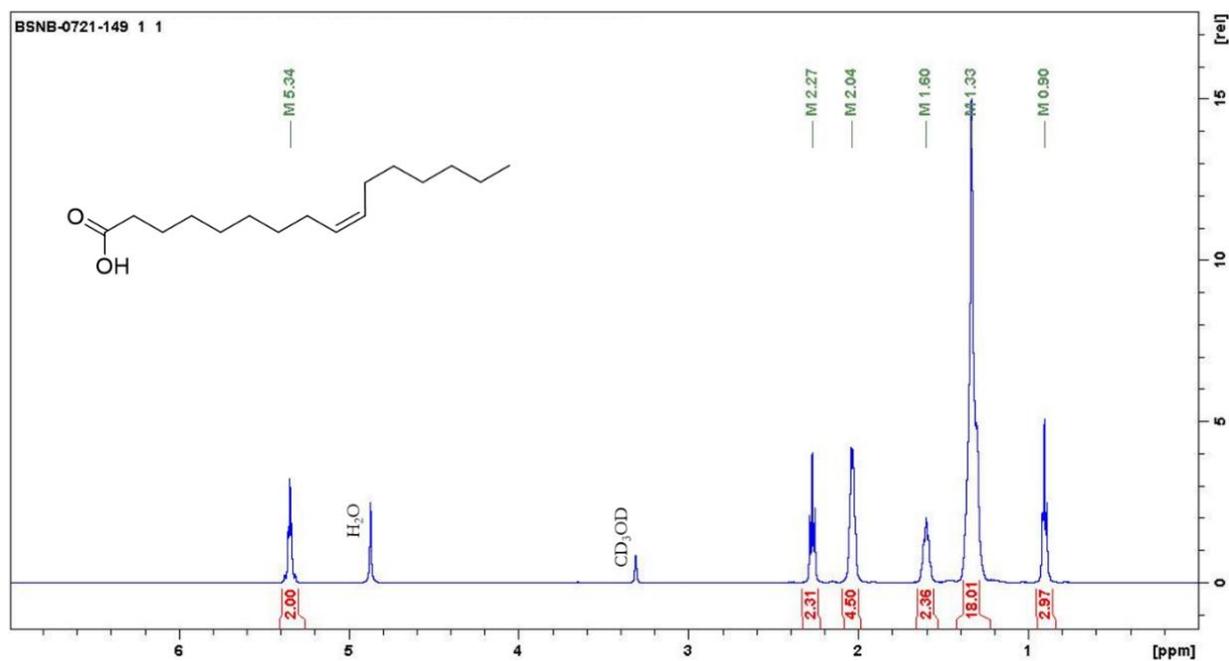
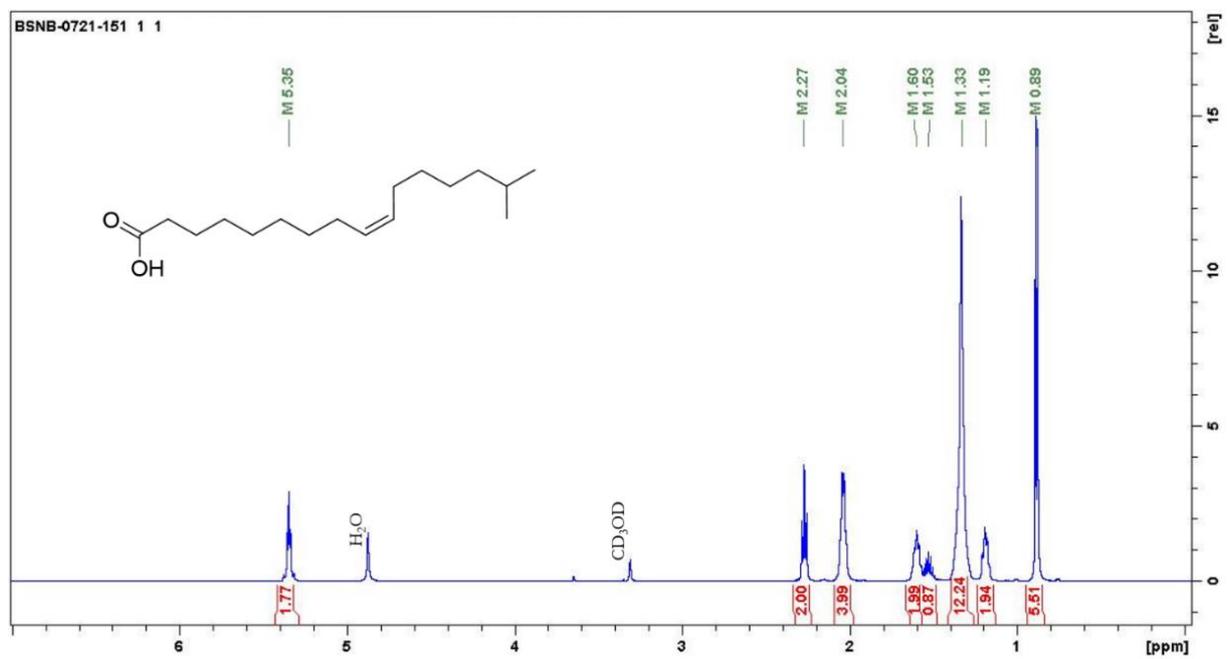
Annexe 36 : Spectre de fragmentation du signal à  $m/z$  883,2625 dans l'extrait de BSNB-0730.

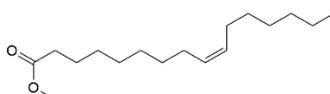
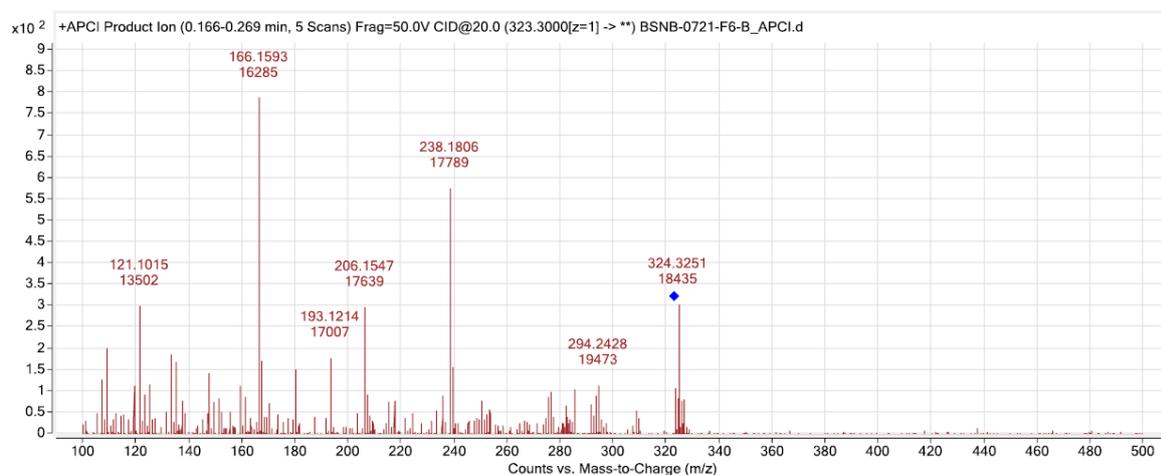


Annexe 37 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide (*R*)-2-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque (**10**).Annexe 38 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide (*R*)-3-hydroxy-14-méthylpentadécanoïque (**11**).

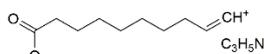
Annexe 39 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide (*S*)-β-hydroxypalmitique (**12**).Annexe 40 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide (*R*)-3-hydroxy-15-méthylhexadécanoïque (**13**).

Annexe 41 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide (*R*)-3-hydroxy-13-méthyltétradécanoïque (**14**).Annexe 42 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide 13-méthyltétradécanoïque (**15**).

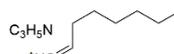
Annexe 43 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide (9Z)-hexadécénoïque (**16**).Annexe 44 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide 15-méthyl-(9Z)-hexadécénoïque (**17**).

Annexe 45 : Spectres de fragmentation des acides (9Z)-hexadécénoïque (**16**) et 15-méthyl-(9Z)-hexadécénoïque (**17**) estérifiés.

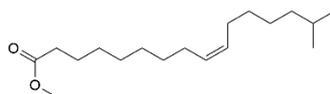
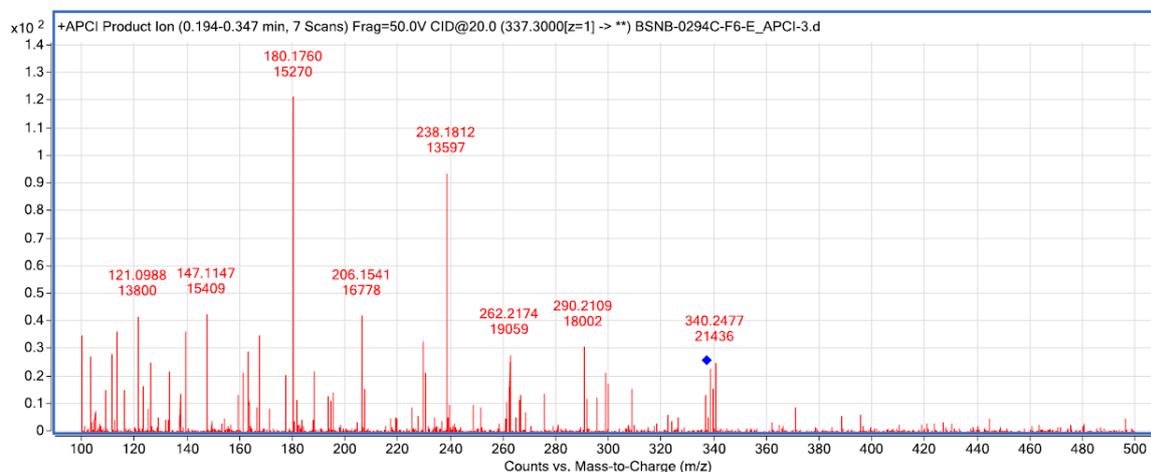
Chemical Formula:  $C_{17}H_{32}O_2$   
Exact Mass: 268.2402



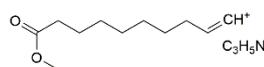
Chemical Formula:  $C_{14}H_{24}NO_2^+$   
Exact Mass: 238.1802



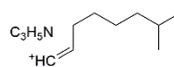
Chemical Formula:  $C_{11}H_{20}N^+$   
Exact Mass: 166.1590



Chemical Formula:  $C_{18}H_{34}O_2$   
Exact Mass: 282.2559

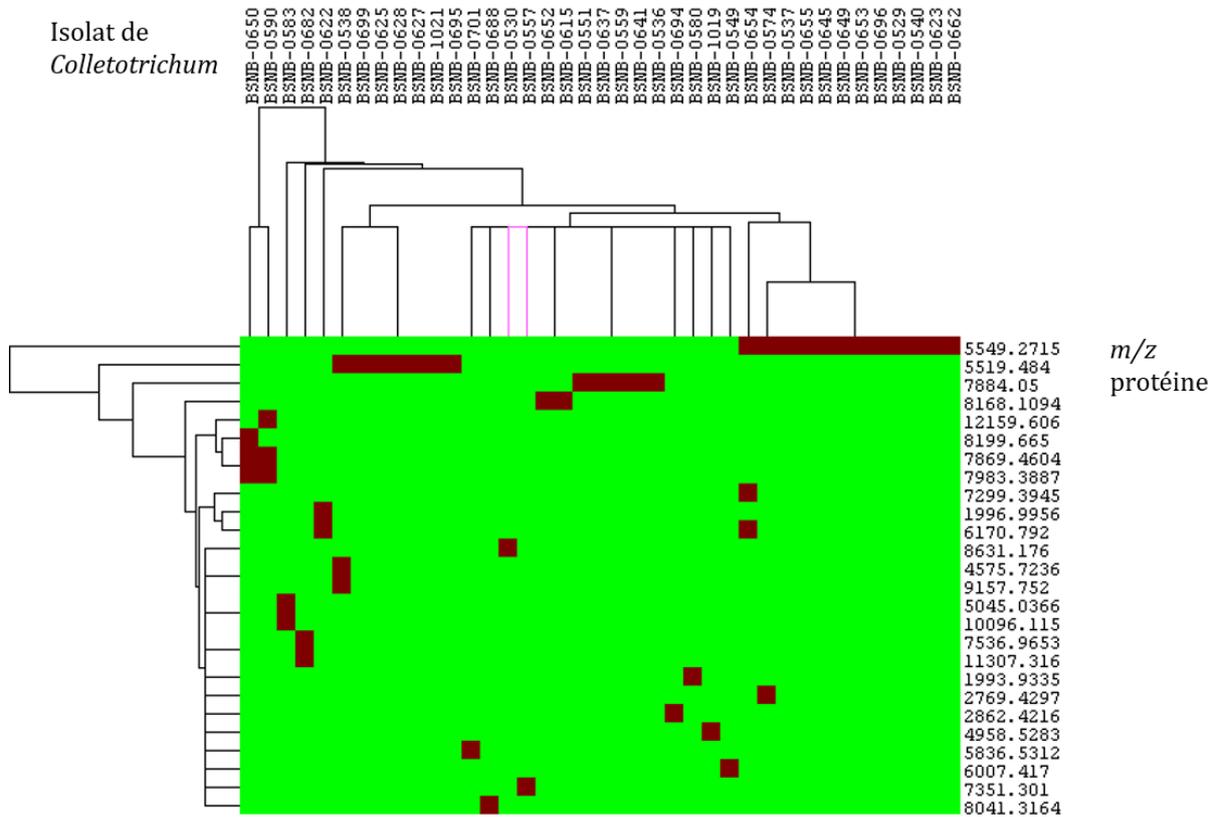


Chemical Formula:  $C_{14}H_{24}NO_2^+$   
Exact Mass: 238.1802

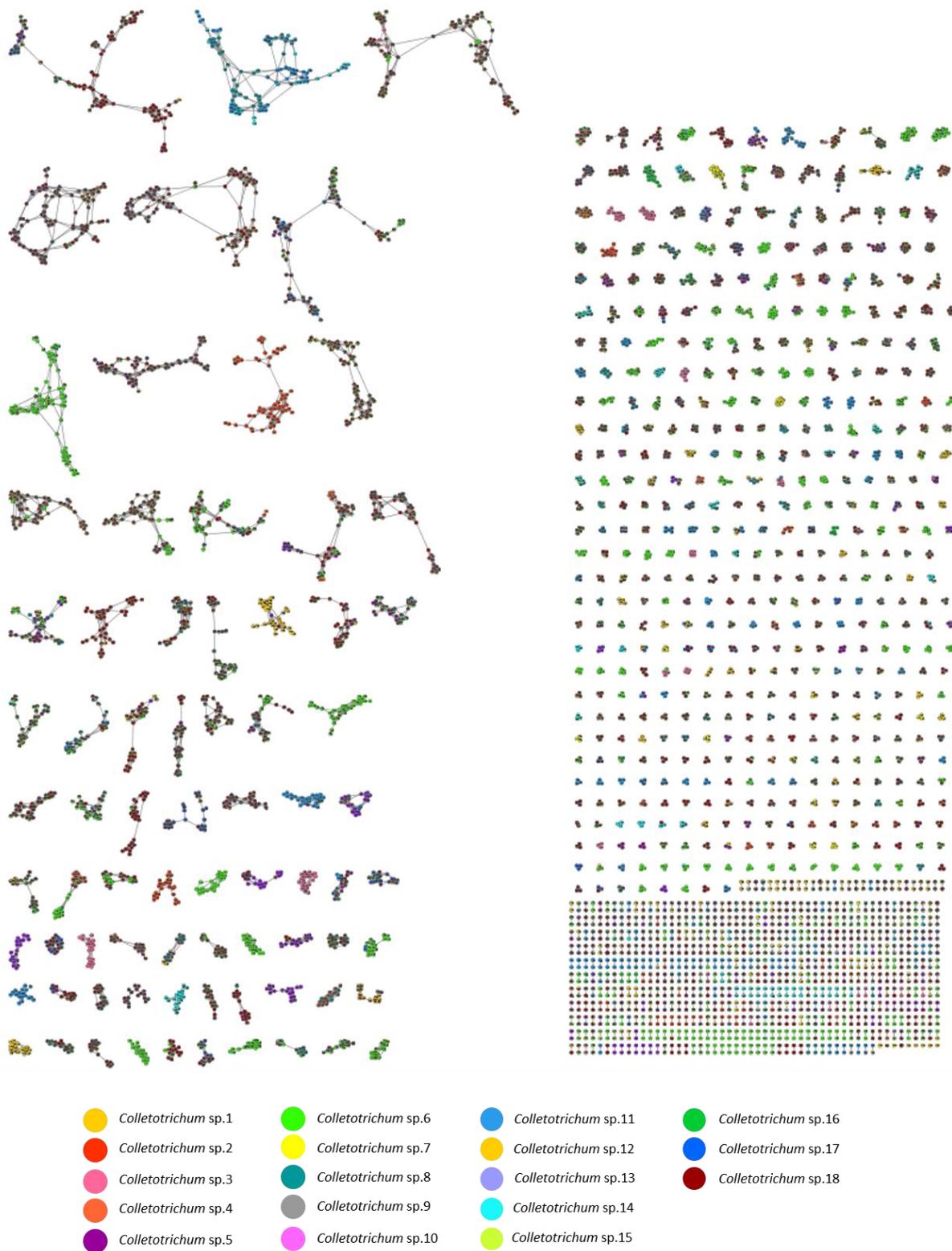


Chemical Formula:  $C_{12}H_{22}N^+$   
Exact Mass: 180.1747

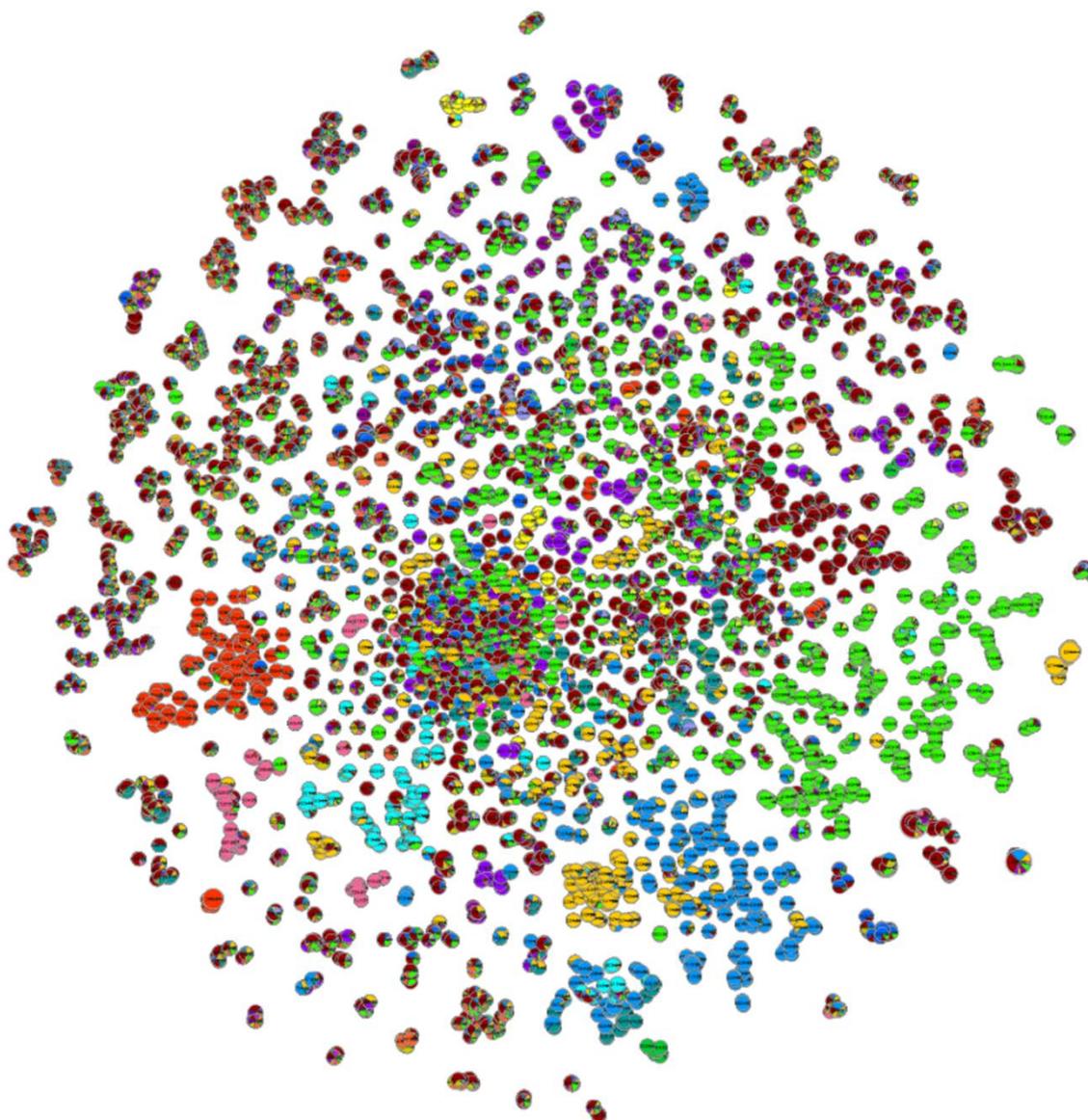
Annexe 46 : Ions les plus intenses présents sur les empreintes protéiques MALDI-TOF de quarante isolats de *Colletotrichum* sp. (les ions de BSNB-0290 et BSNB-0646 ne sont pas détectés) La présence ou non d'ions en commun entre les souches permet un regroupement hiérarchique de ces souches. Les carrés rouges indiquent la présence de l'ion de masse associé dans l'empreinte protéique de l'isolat.



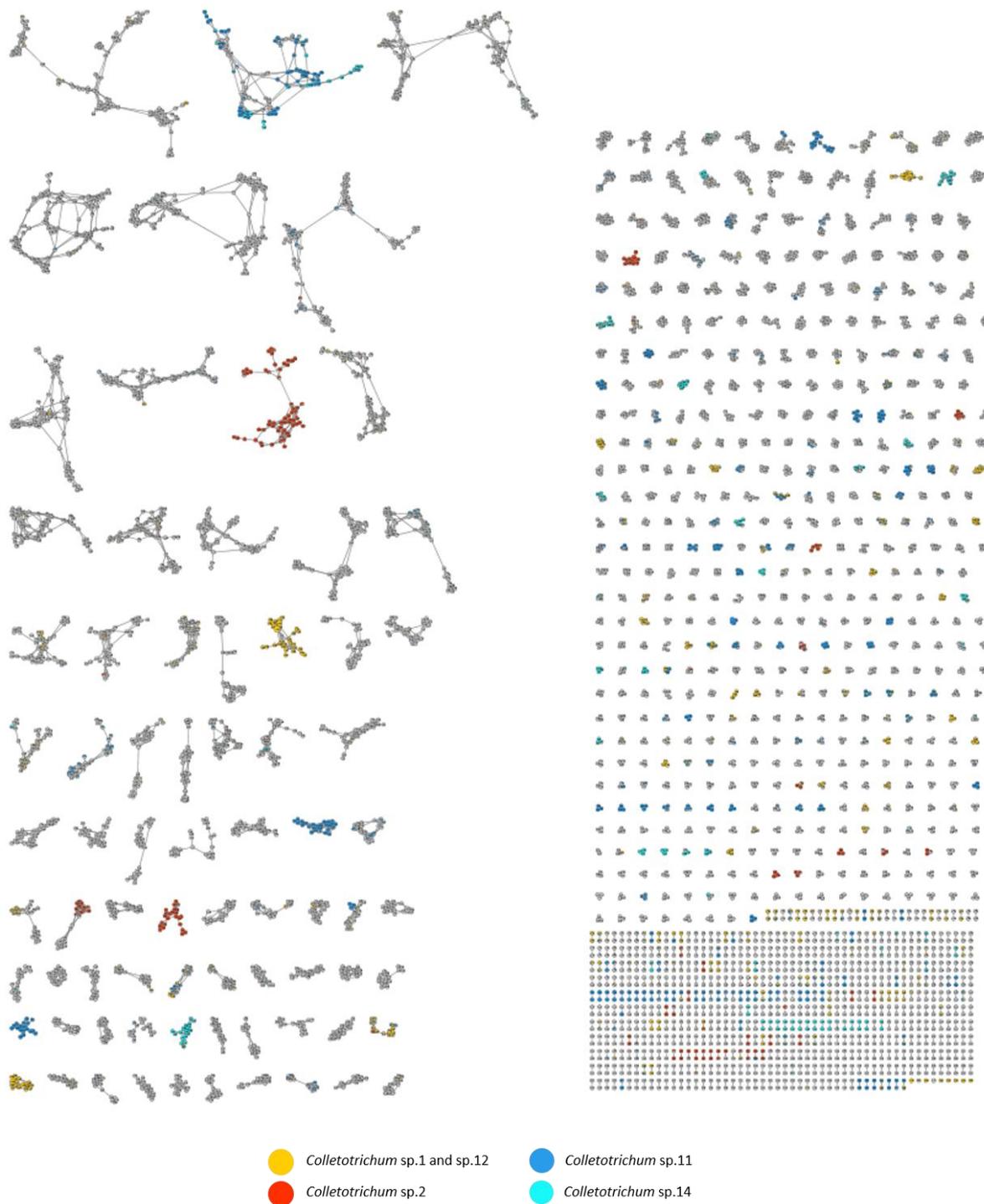
Annexe 47 : Réseau moléculaire formé à partir des données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt de *Colletotrichum* sp. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par une répartition en diagramme circulaire du nœud suivant l'intégration du signal XIC.



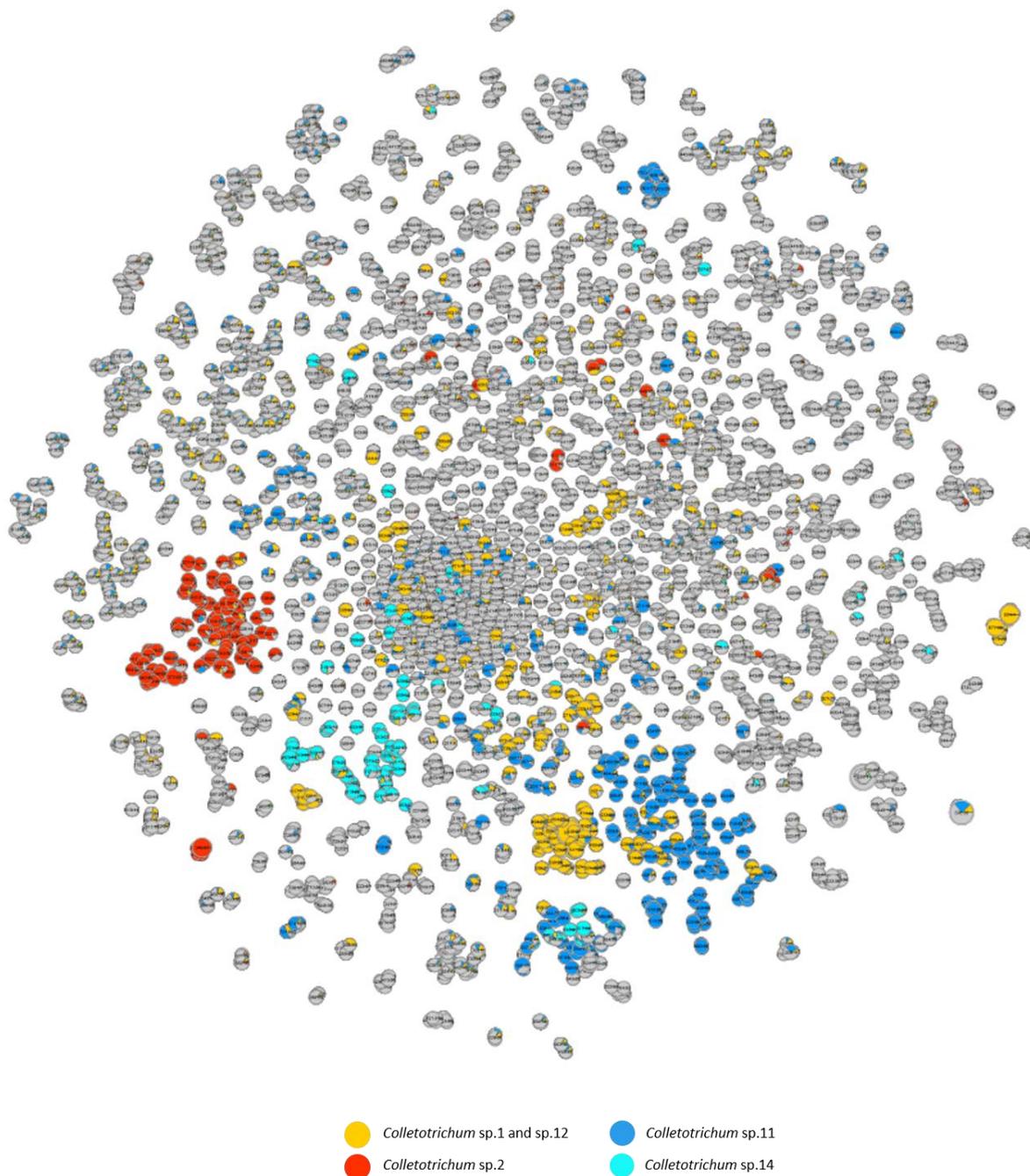
Annexe 48 : Représentation t-SNE du réseau moléculaire formé à partir des données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt de *Colletotrichum* sp. La quantification relative de chaque ion dans les extraits est représentée par une répartition en diagramme circulaire du nœud suivant l'intégration du signal XIC.



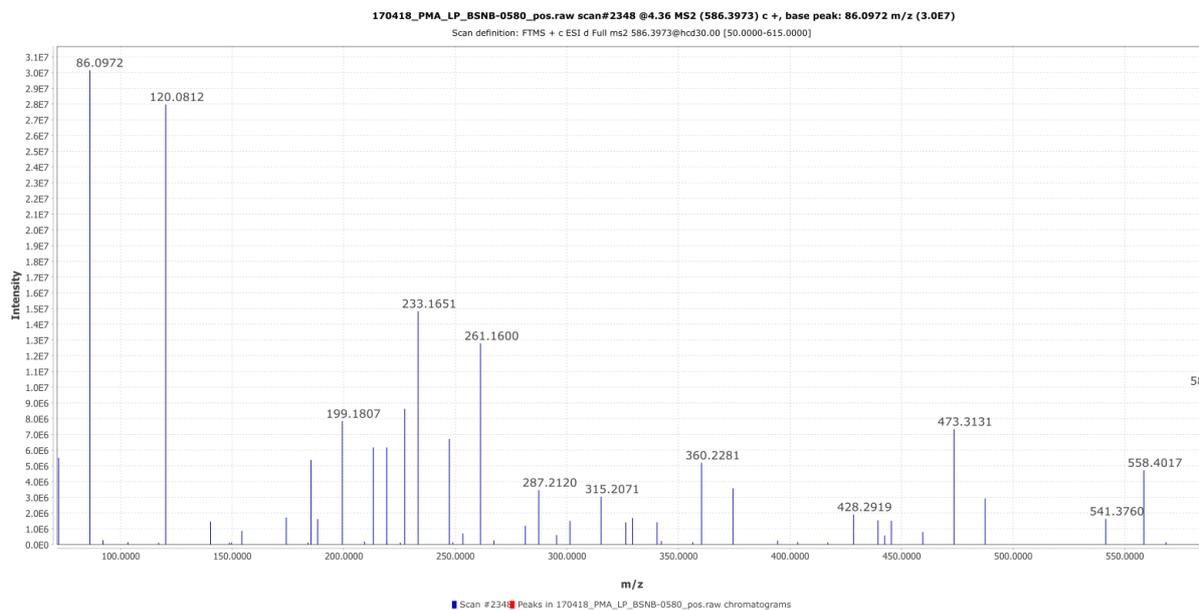
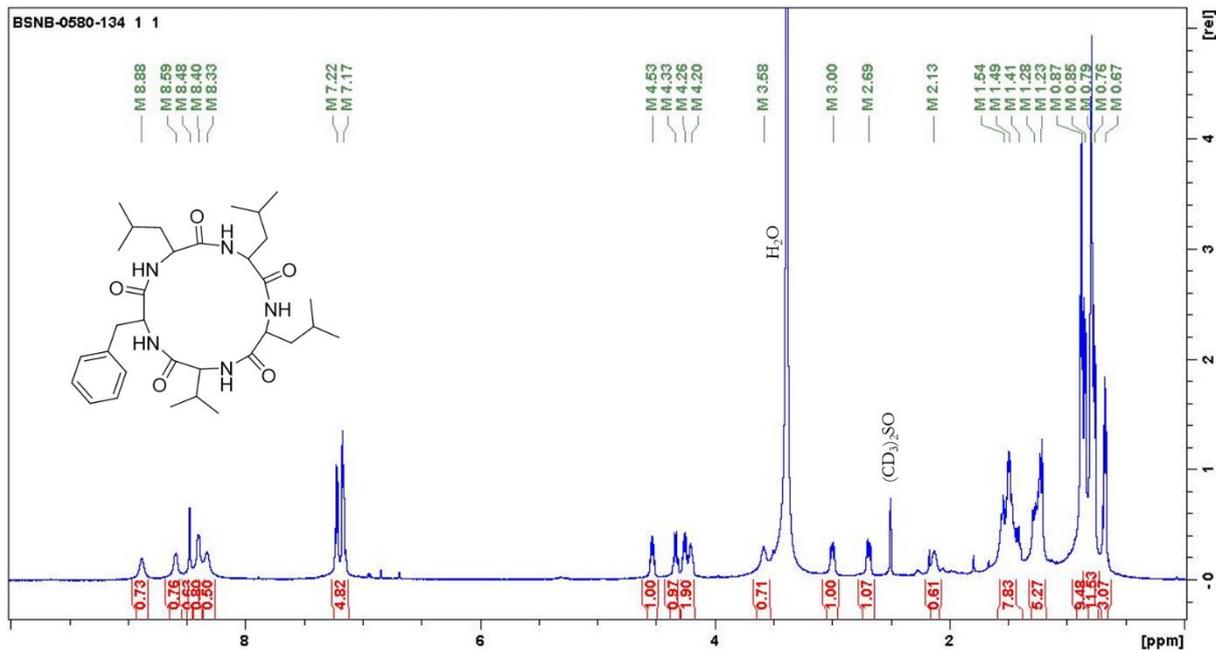
Annexe 49 : Réseau moléculaire formé à partir des données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt de *Colletotrichum* sp.

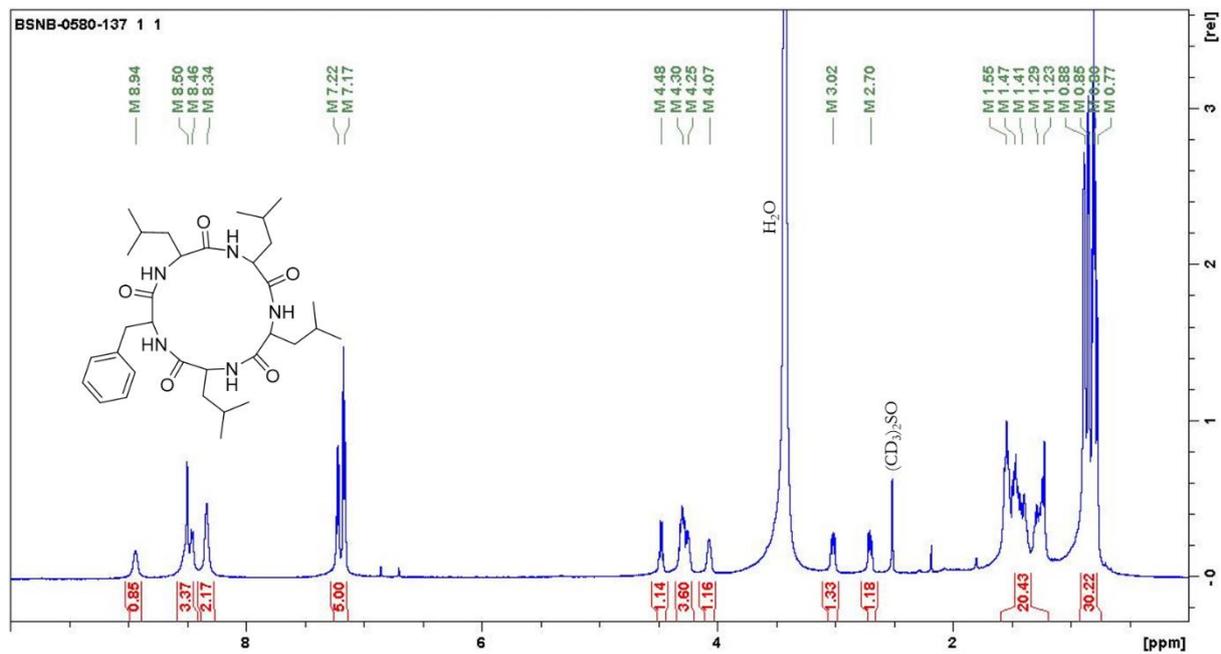


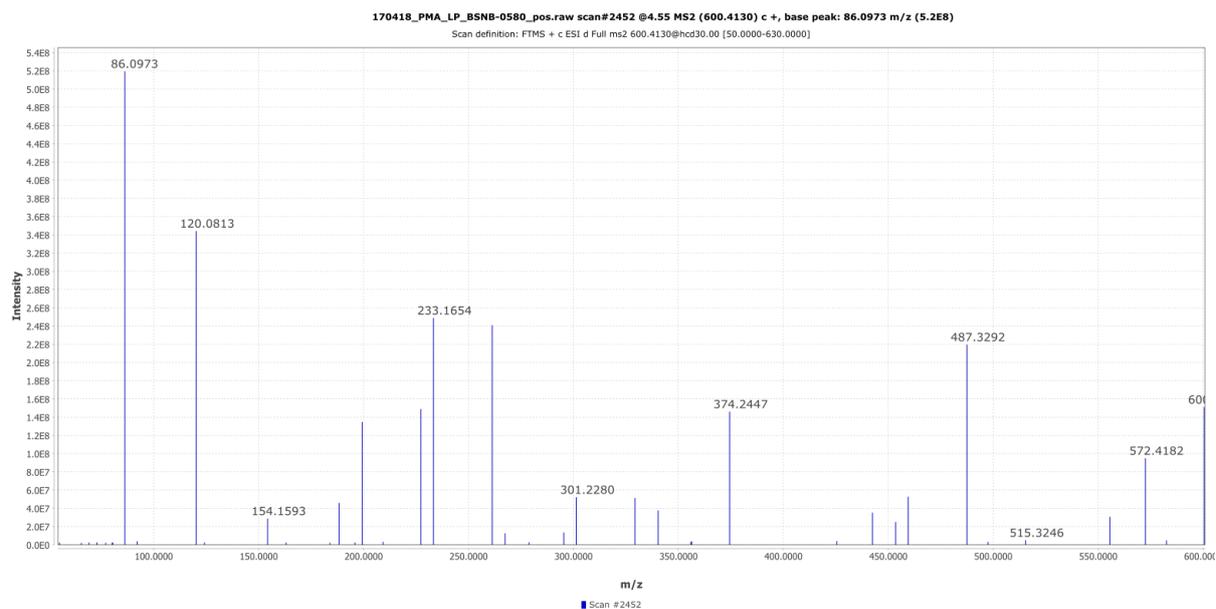
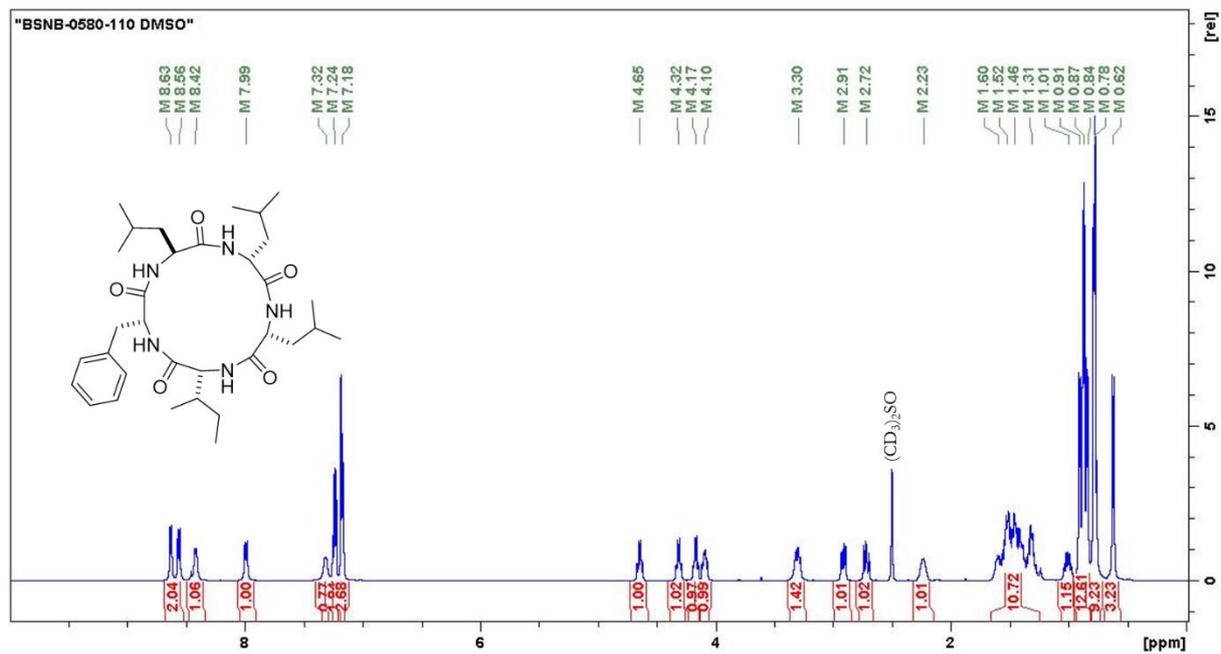
Annexe 50 : Représentation t-SNE du réseau moléculaire formé à partir des données UHPLC-MS/MS des extraits AcOEt de *Colletotrichum* sp.

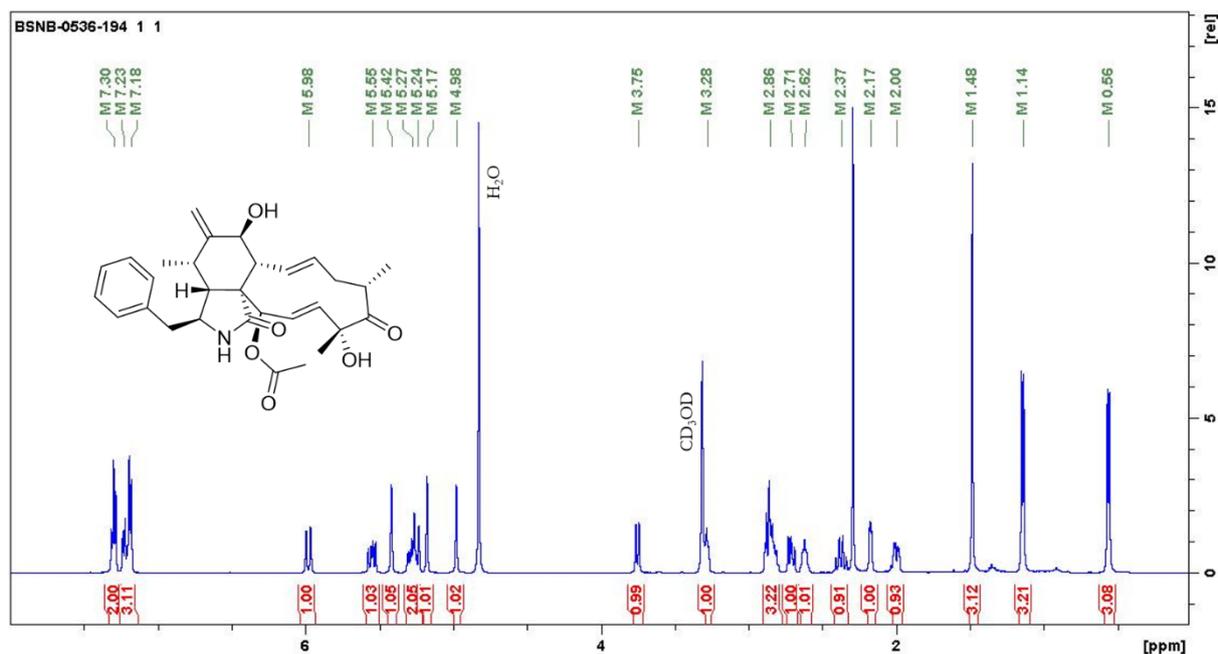
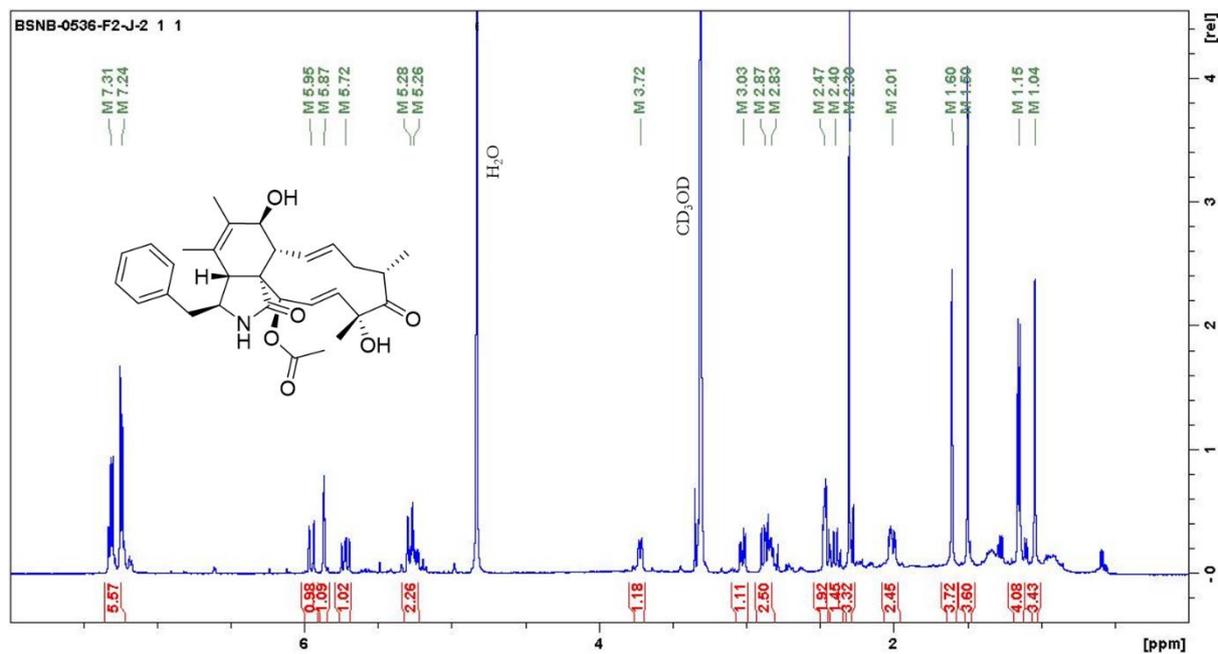


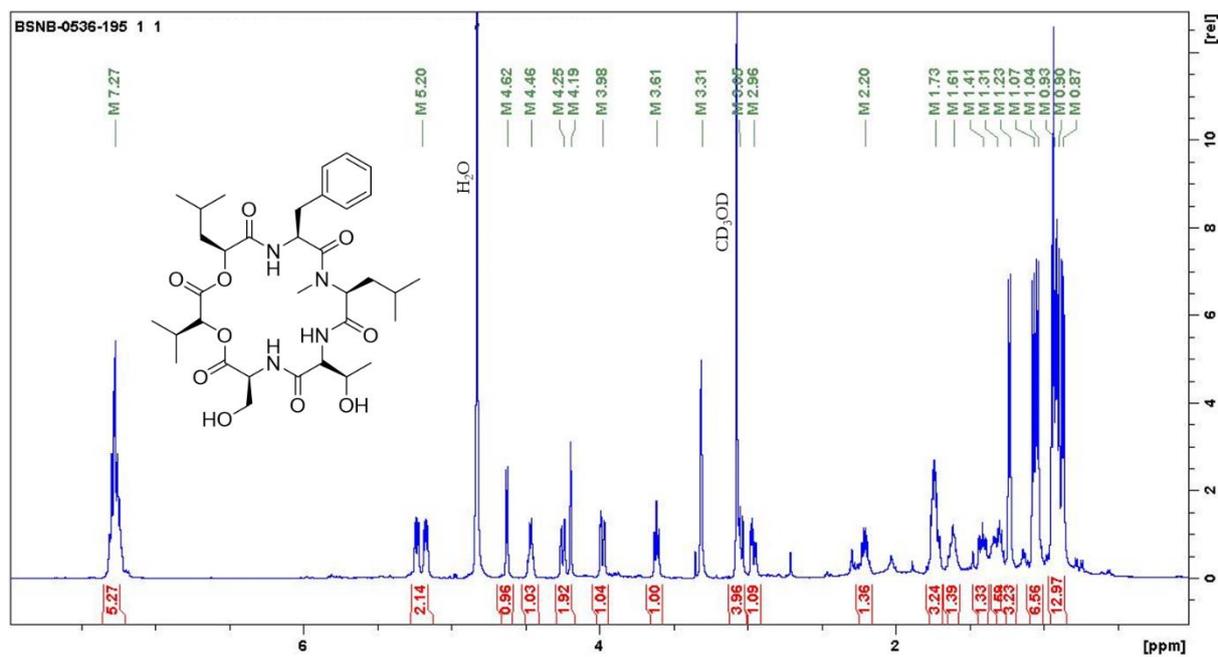
Annexe 51 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) et spectre de fragmentation de la cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Val) (**18**).



Annexe 52 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) de la cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Leu) (19).

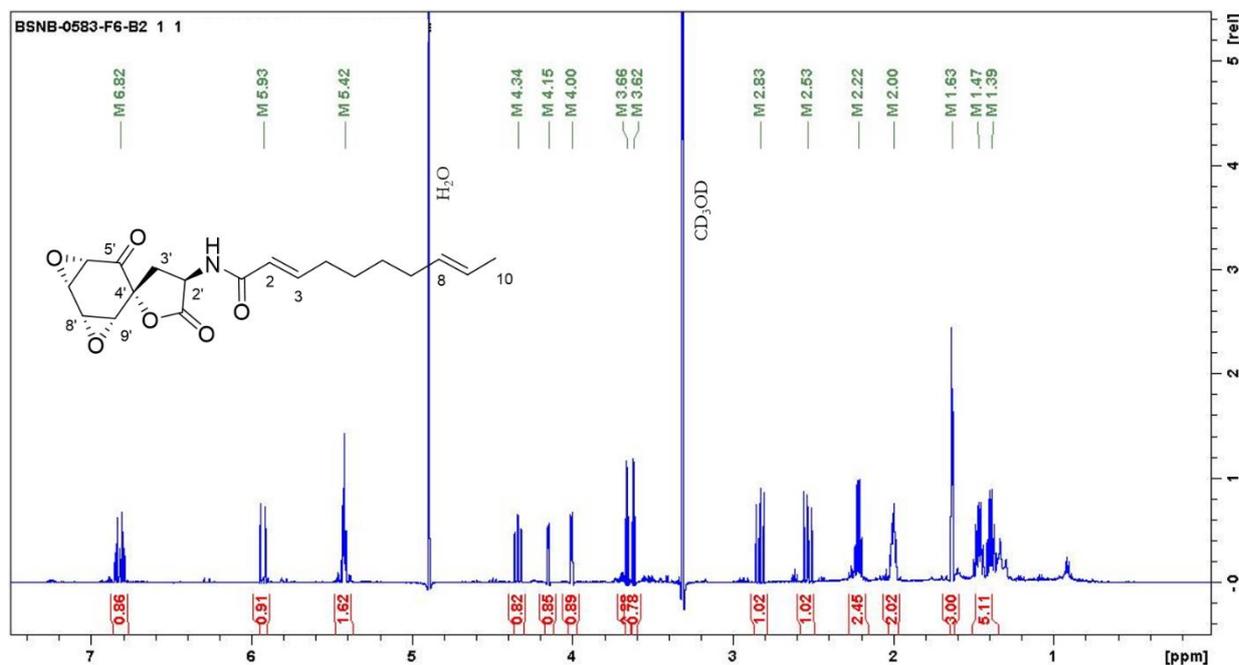
Annexe 53 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) et spectre de fragmentation de la cyclo-(Phe-Leu-Leu-Leu-Ile) (**20**).

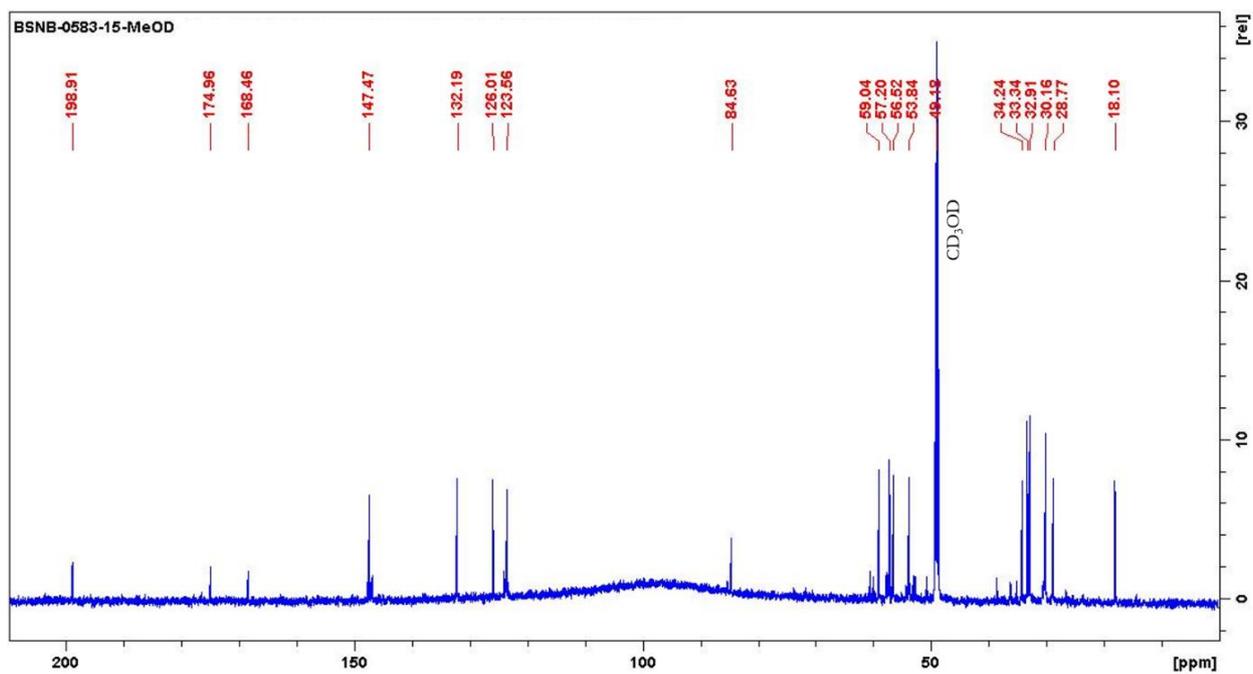
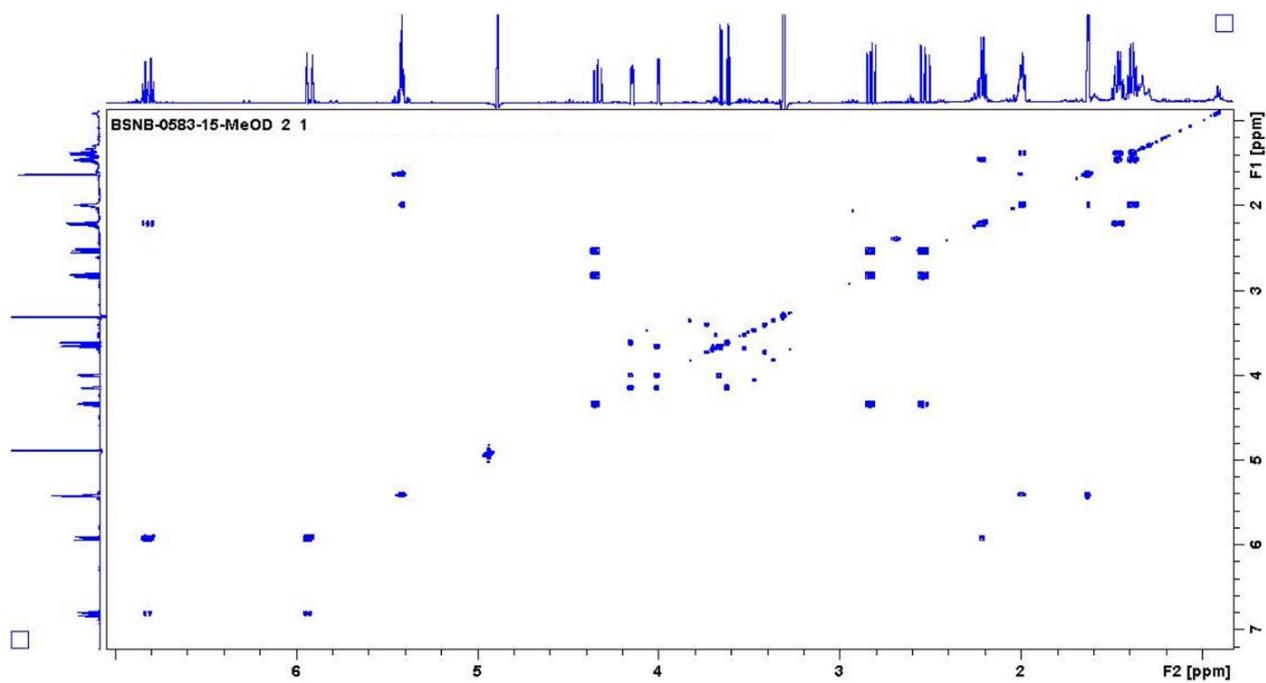
Annexe 54 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la cytochalasine D (21).Annexe 55 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la cytochalasine C (22).

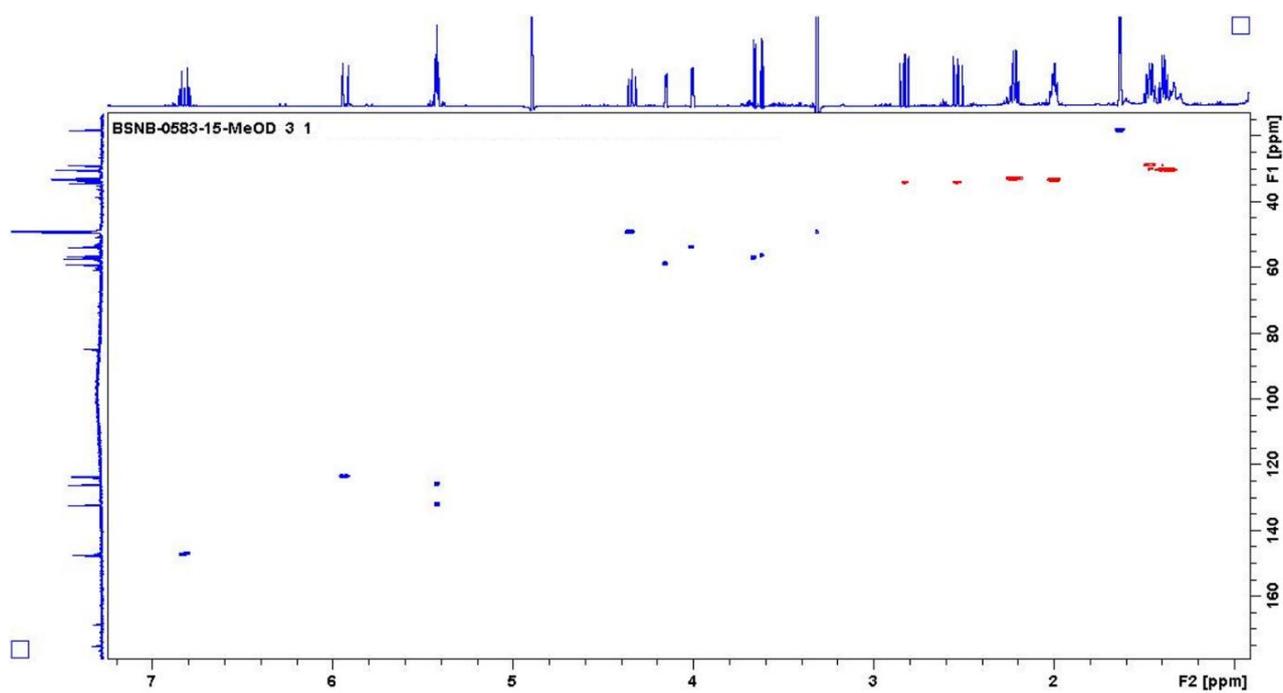
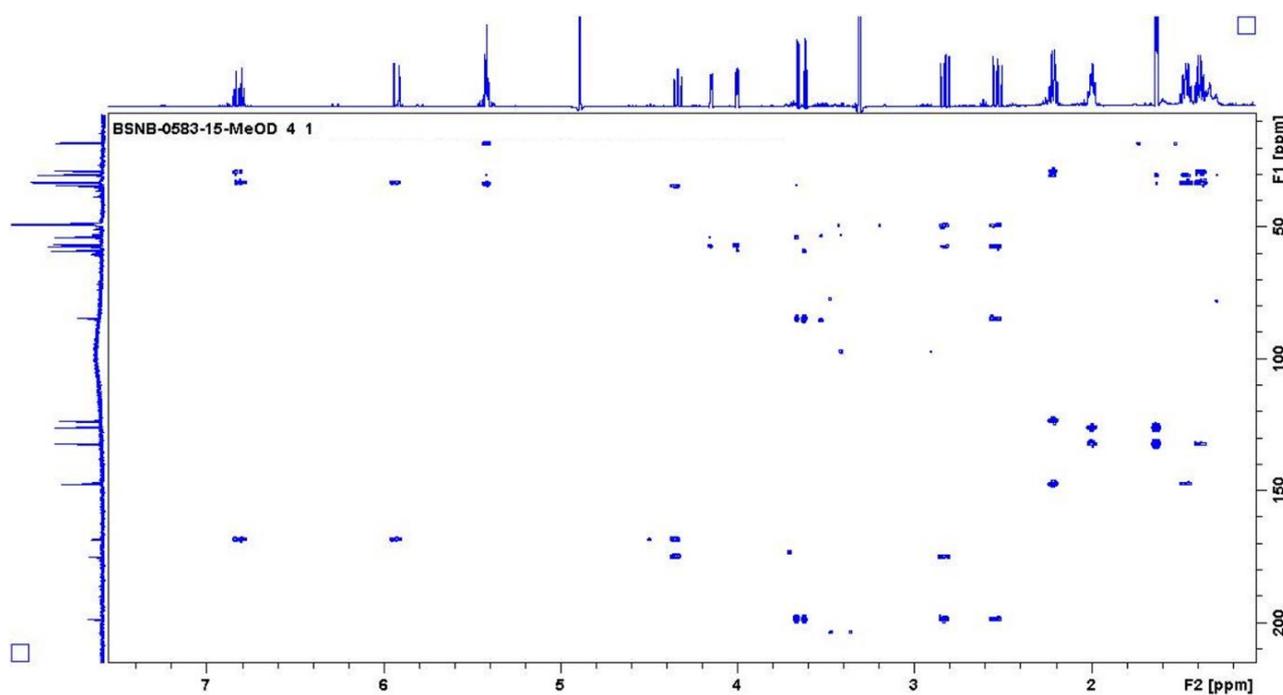
Annexe 56 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'hirsutatine A (23).

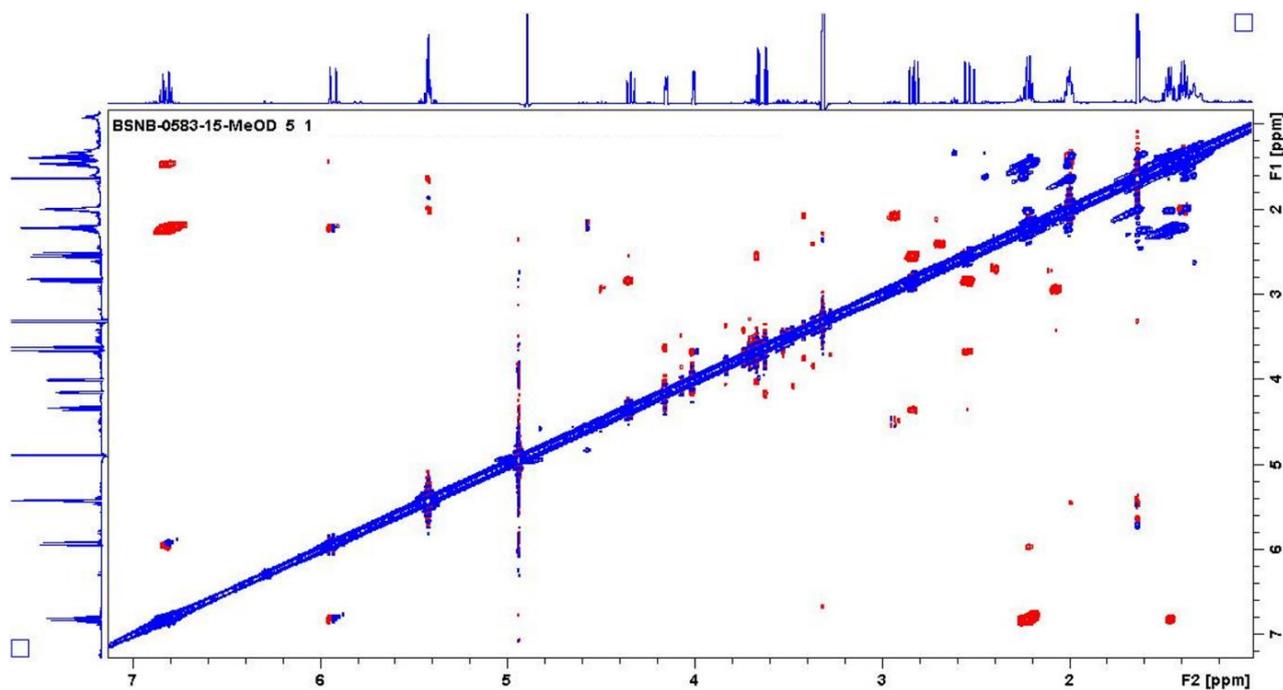
Annexe 57 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), spectre de masse en haute résolution et comparaison entre le spectre ECD prédit et expérimental de la colletamide A (**24**).

Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, $J$ (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	NOESY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )
1	-	168,5	-	-	-
2	5,93 (1H, d, $J = 15,3$ )	123,6	H-3 H-4	C-1 C-4	H-3 H-4
3	6,82 (1H, dt, $J = 15,2, 7,1$ )	147,5	H-2 H-4	C-1 C-4 C-5	H-2 H-4 H-5
4	2,22 (2H, m)	32,9	H-2 H-3 H-5	C-2 C-3 C-5 C-6	H-5
5	1,47 (2H, m)	28,8	H-4 H-6	C-3 C-4 C-6	H-4
6	1,39 (2H, m)	30,2	H-5 H-7	C-5 C-7	H-7
7	2,00 (2H, m)	33,3	H-6 H-8	C-5 C-6 C-8 C-9	H-10 H-5 H-6
8	5,42 (2H, m)	132,2	H-7 H-10	C-7 C-10	H-7 H-10
9		126,0			
10	1,63 (3H, d, $J = 4,3$ )	18,1	H-9	C-8 C-9	
1'	-	175,0	-	-	-
2'	4,34 (1H, t, $J = 10,1$ )	49,2	H-3'	C-1 C-1' C-3'	H-3'a (H-3'b)
3' a	2,83 (1H, dd, $J = 13,7, 9,5$ ) 2,53 (1H, dd, $J = 13,7, 11,0$ )	34,2	H-2' (H-6' faible) H-9' (H-2' faible)	C-1' C-2' C-4' C-5' C-9'	H-2' (H-6') H-9' (H-2')
3' b					
4'	-	84,6	-	-	-
5'	-	198,9	-	-	-
6'	3,62 (1H, d, $J = 4,3$ )	56,5	H-7'	C-4' C-5' C-7'	H-7' H-3'a
7'	4,15 (1H, dd, $J = 3,6, 1,8$ )	59,0	H-6' H-8'	C-8' C-9'	H-6'
8'	4,00 (1H, dd, $J = 3,9, 2,0$ )	53,8	H-7' H-9'	C-6' C-7'	H-9' (H-3'b faible)
9'	3,66 (1H, d, $J = 4,3$ )	57,2	H-8'	C-4' C-5' C-8'	H-8' H-3'b (H-3'a faible)

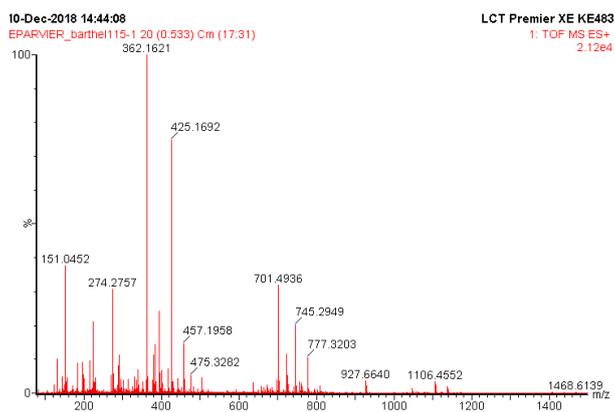
RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

RMN- $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

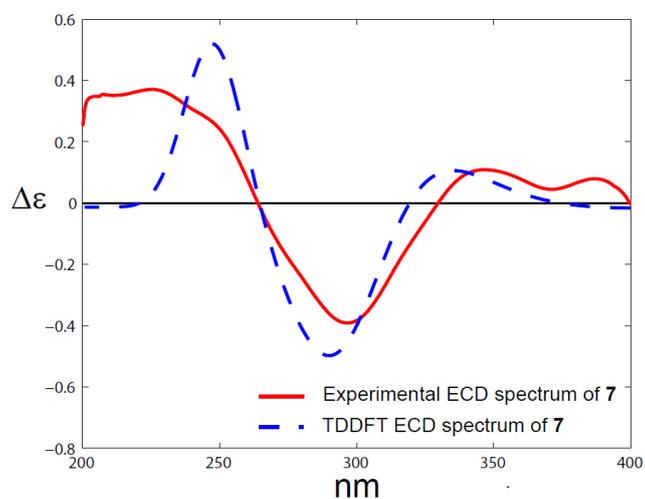
HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

## Spectre de masse haute résolution



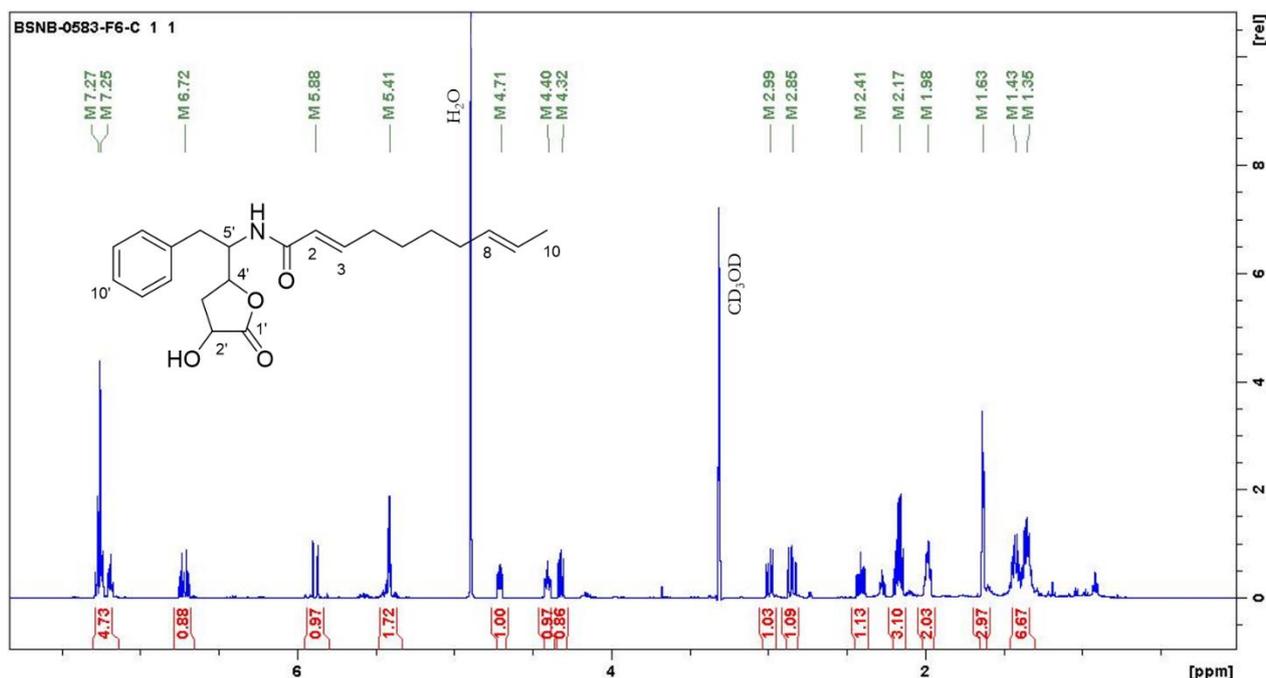
## Comparaison des spectres théorique et expérimental de dichroïsme circulaire électronique

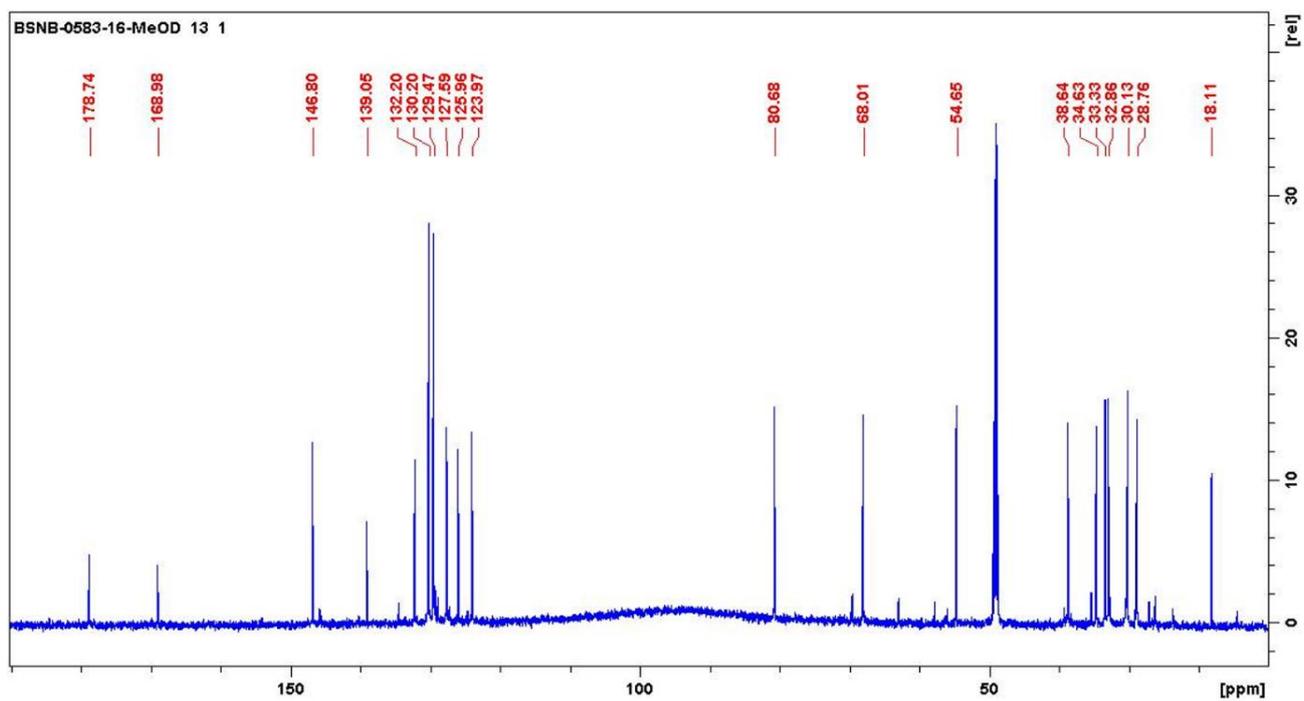
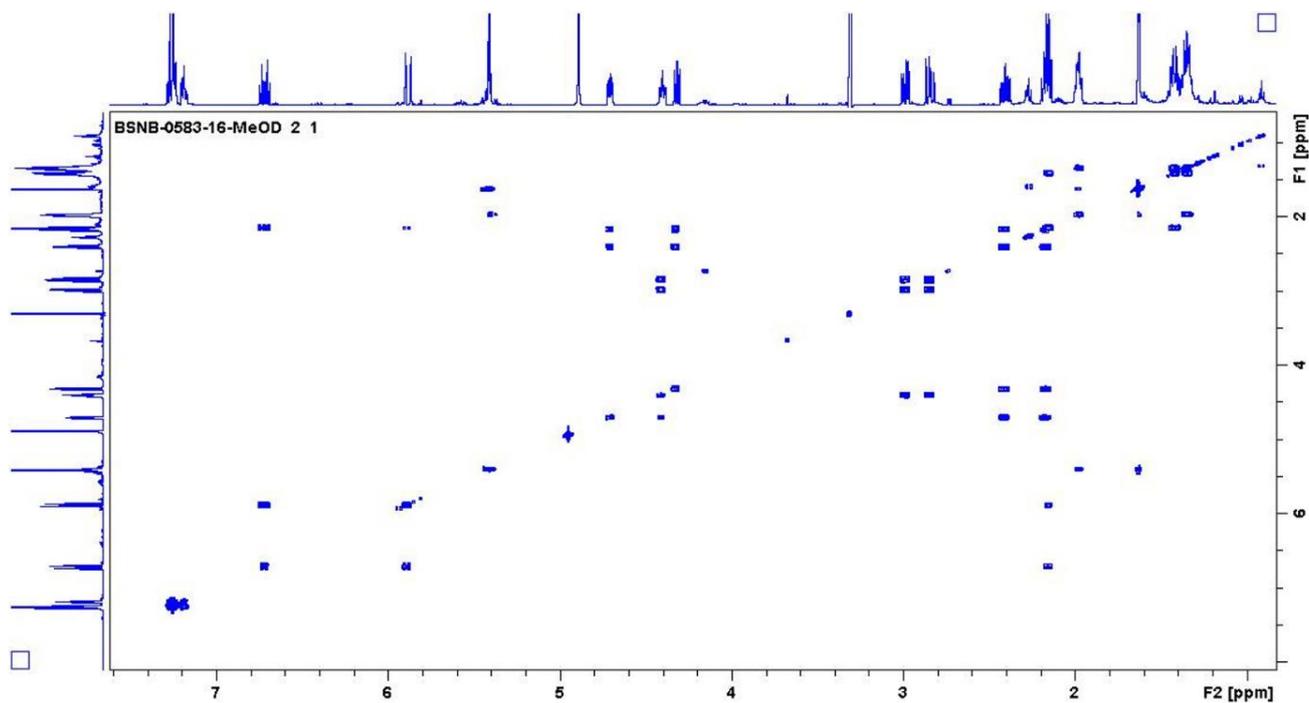


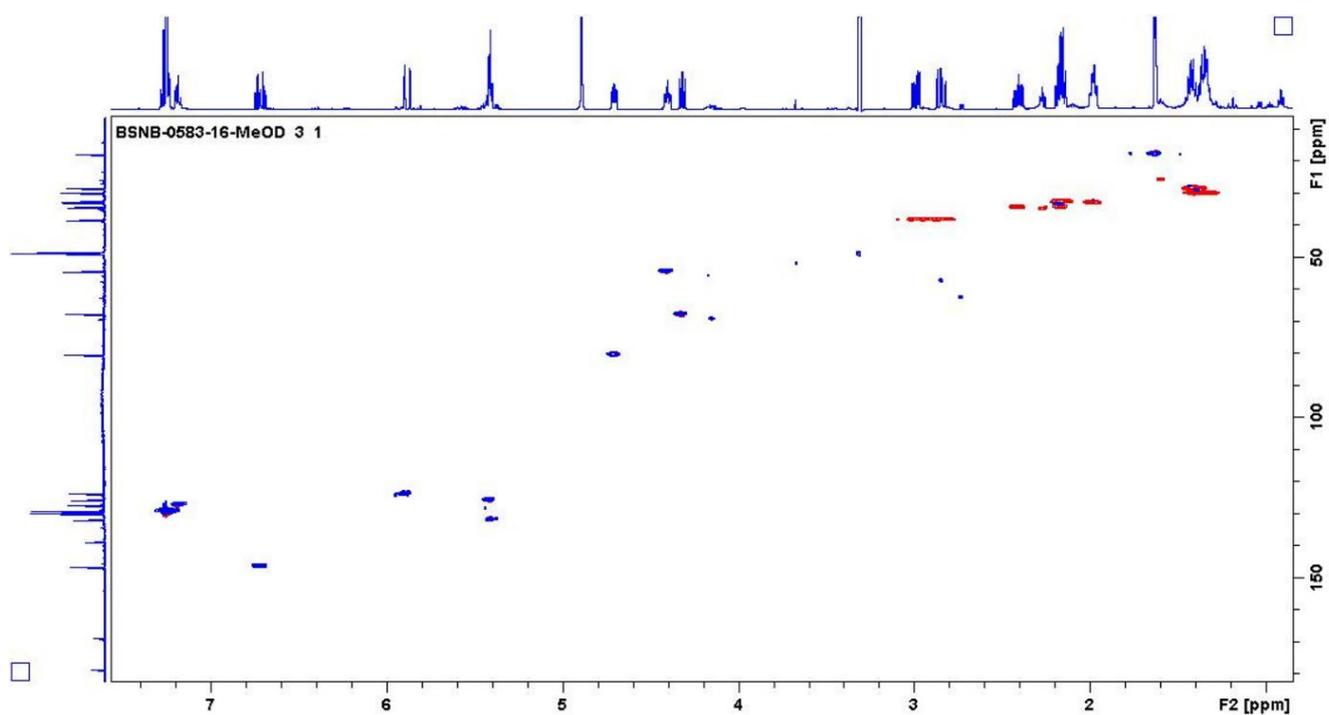
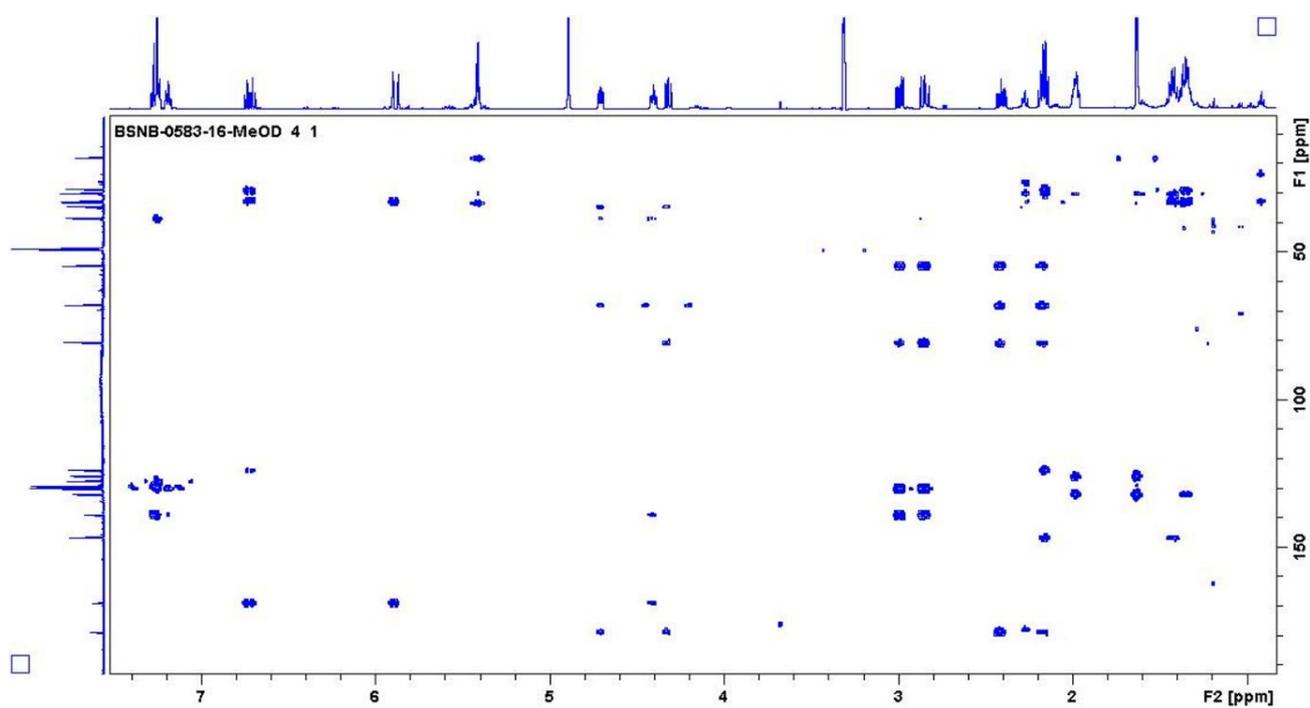
Annexe 58 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), spectre de masse en haute résolution et comparaison des déplacements RMN- $^{13}\text{C}$  prédits et expérimentaux de la colletamide B (**25**).

Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, $J$ (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	NOESY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )
1	-	169,0	-	-	-
2	5,88 (1H, d, $J = 15,1$ )	124,0	H-3 H-4	C-1 C-3	H-3 H-4 (H-2' faible)
3	6,72 (1H, dt, $J = 15,1, 7,0$ )	146,8	H-2 H-4	C-1 C-2 C-4 C-5	H-2 H-4 H-5
4	2,16 (2H, m)	32,9	H-2 H-3 H-5	C-2 C-3 C-5 C-6	H-2 H-3 H-5
5	1,43 (2H, m)	28,8	H-4 H-6	C-3 C-6 C-7	
6	1,35 (2H, m)	30,1	H-7	C-5 C-7 C-8	
7	1,98 (2H, m)	33,3	H-6 H-8 H-9 H-10	C-6 C-8 C-9	
8	5,41 (2H, m)	132,2	H-7 H-10	C-7 C-10	H-7 H-10
9		126,0			
10	1,63 (3H, d, $J = 4,1$ )	18,1	H-8 H-9	C-8 C-9	
1'	-	178,4	-	-	-
2'	4,32 (1H, dd, $J = 8,2, 7,1$ )	68,0	H-3'	C-1' C-3' C-4'	H-3' (H-2 faible)
3' a	2,41 (1H, ddd, $J = 13,7, 8,6, 4,3$ ) 2,17 (1H, m)	34,6	H-2' H-4'	C-1' C-2' C-4' C-5'	H-2' H-4' H-5'
3' b					
4'	4,71 (1H, ddd, $J = 8,3, 4,3, 2,9$ )	80,7	H-3' H-5'	C-1' C-2' C-3' C-5' C-6'	H-3' H-5' H-6'
5'	4,40 (1H, ddd, $J = 9,3, 7,3, 2,8$ )	54,7	H-4' H-6'	C-1 C-3' C-6' C-7'	H-3' H-4' H-6'
6'	2,99 (1H, dd, $J = 14,0, 6,1$ ) 2,85 (1H, dd, $J = 14,0, 9,3$ )	38,6	H-5'	C-4' C-5' C-7' C-8'	H-4' H-5' H-6'
7'					
8'	7,25 (2H, m)	130,2	H-9'	C-8' C-10'	
9'	7,26 (2H, m)	129,5	H-8' H-10'	C-7' C-9'	
10'	7,18 (1H, m)	127,6	H-9'	C-8'	

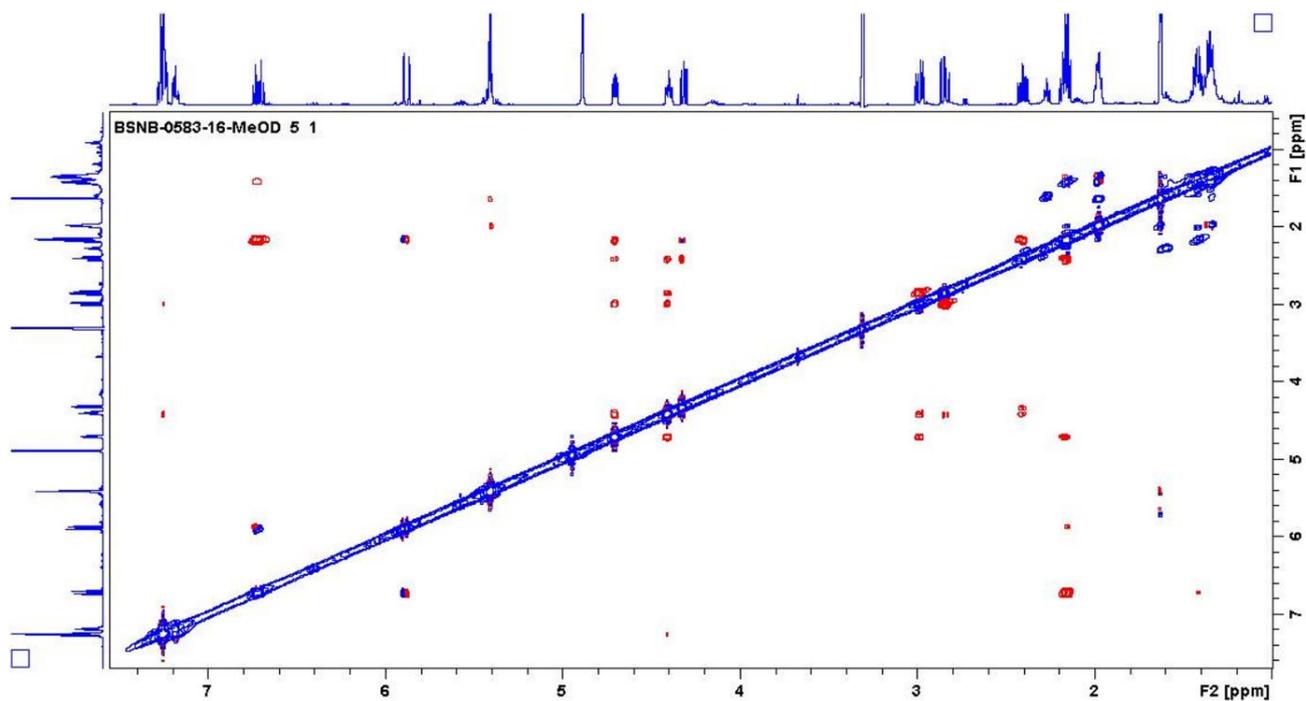
### RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )



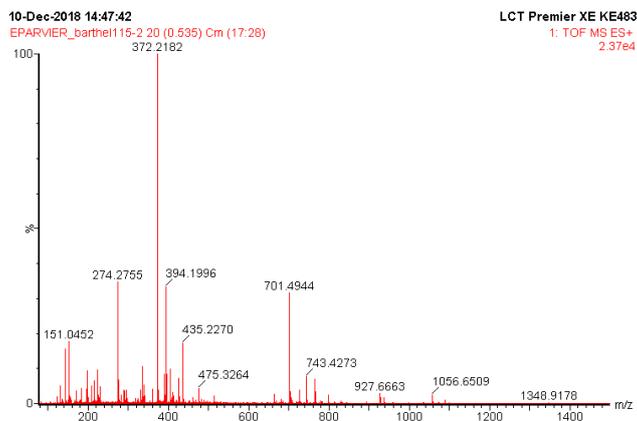
RMN- $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

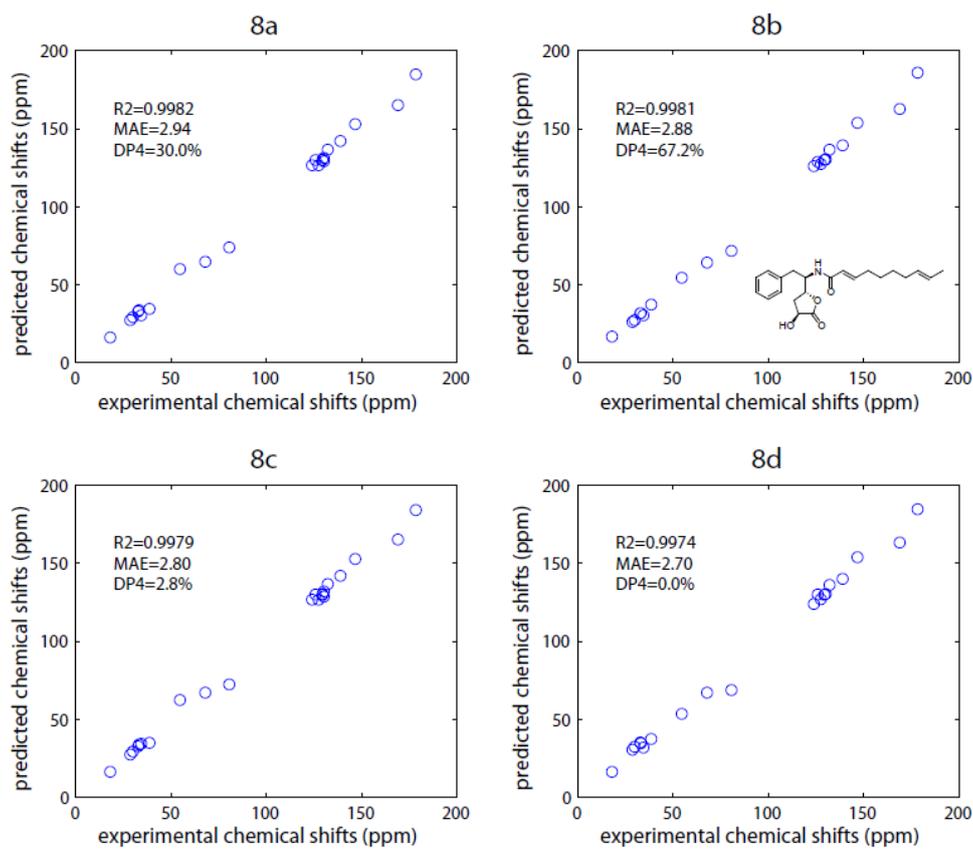
HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



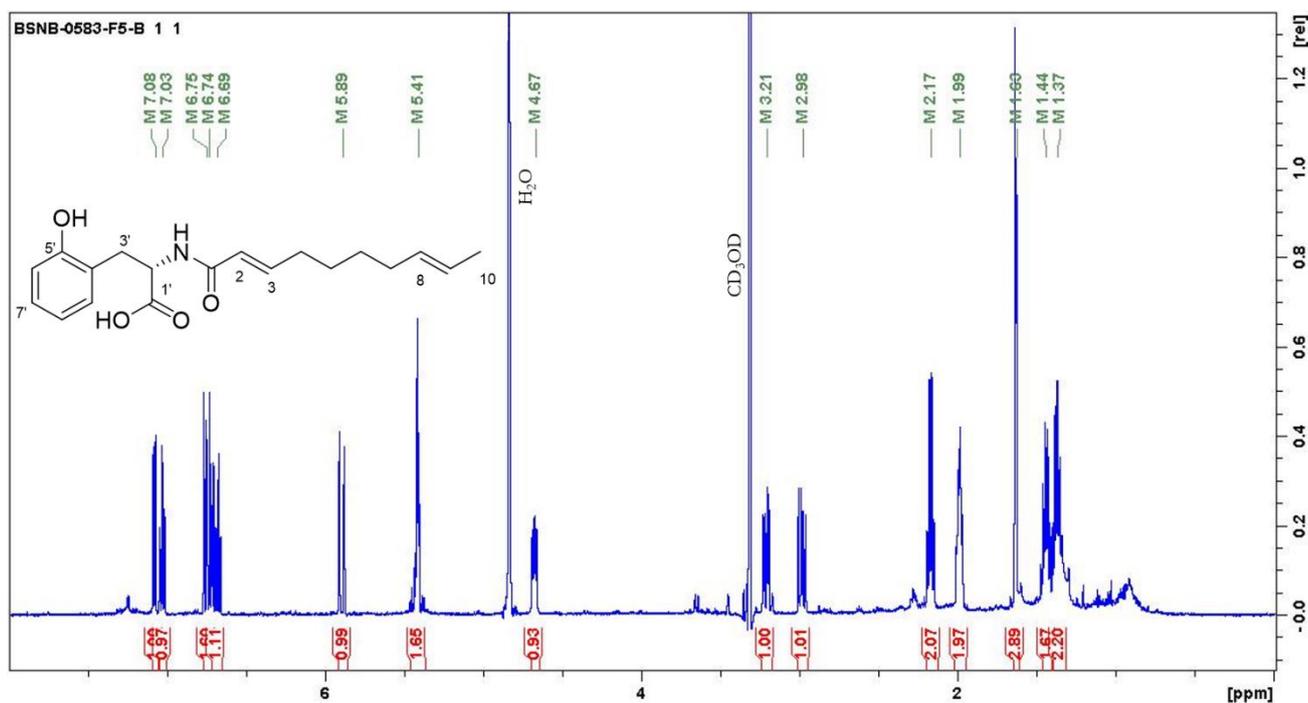
Spectre de masse haute résolution

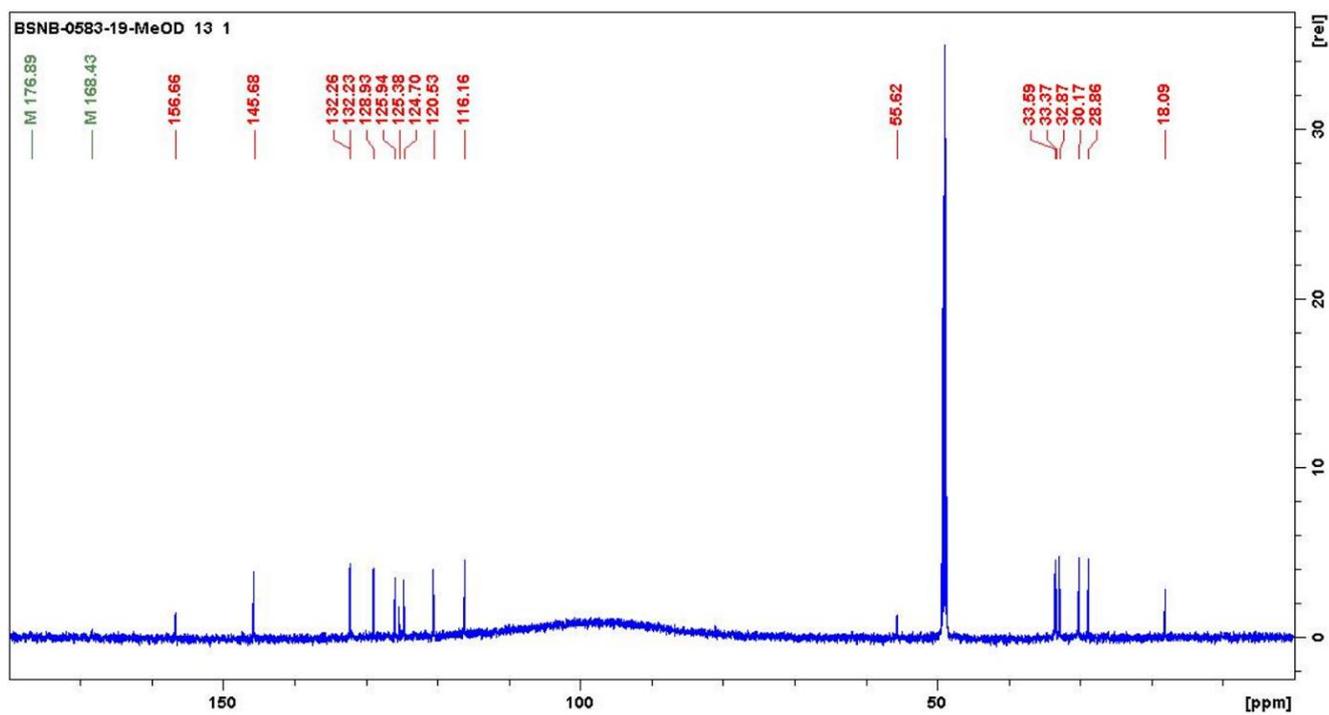
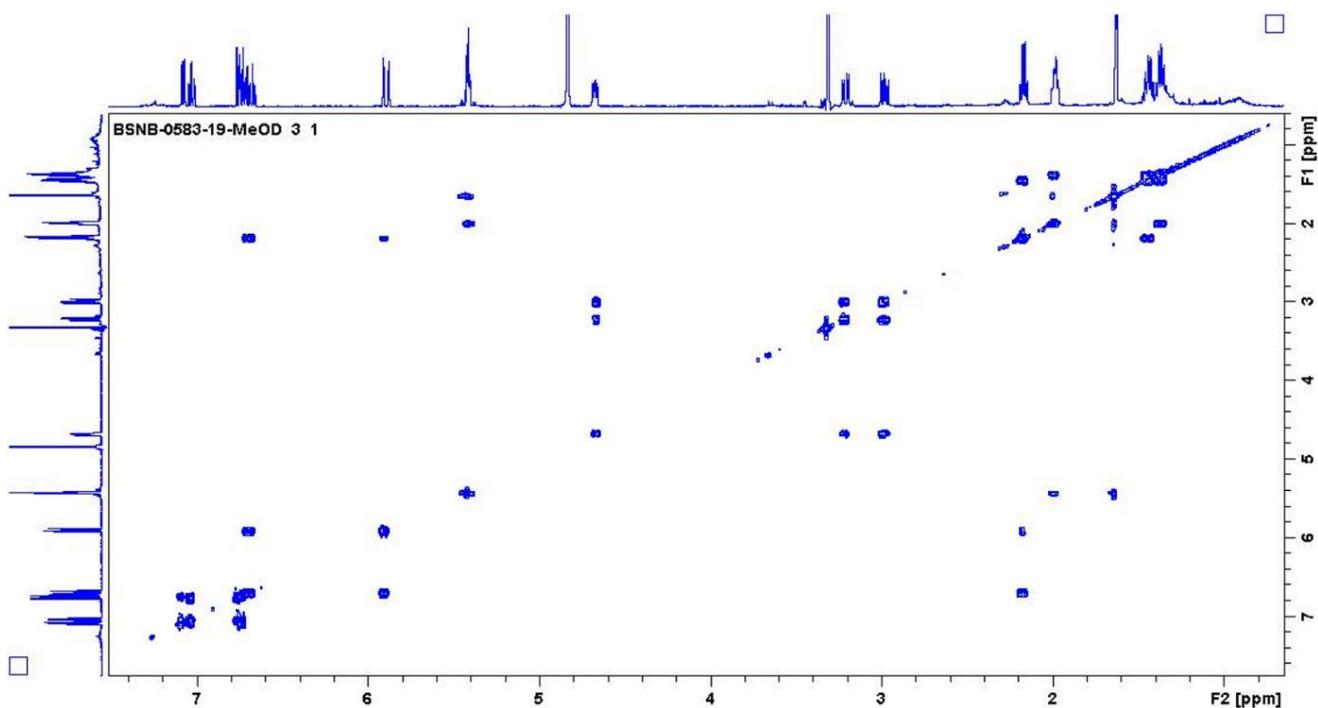


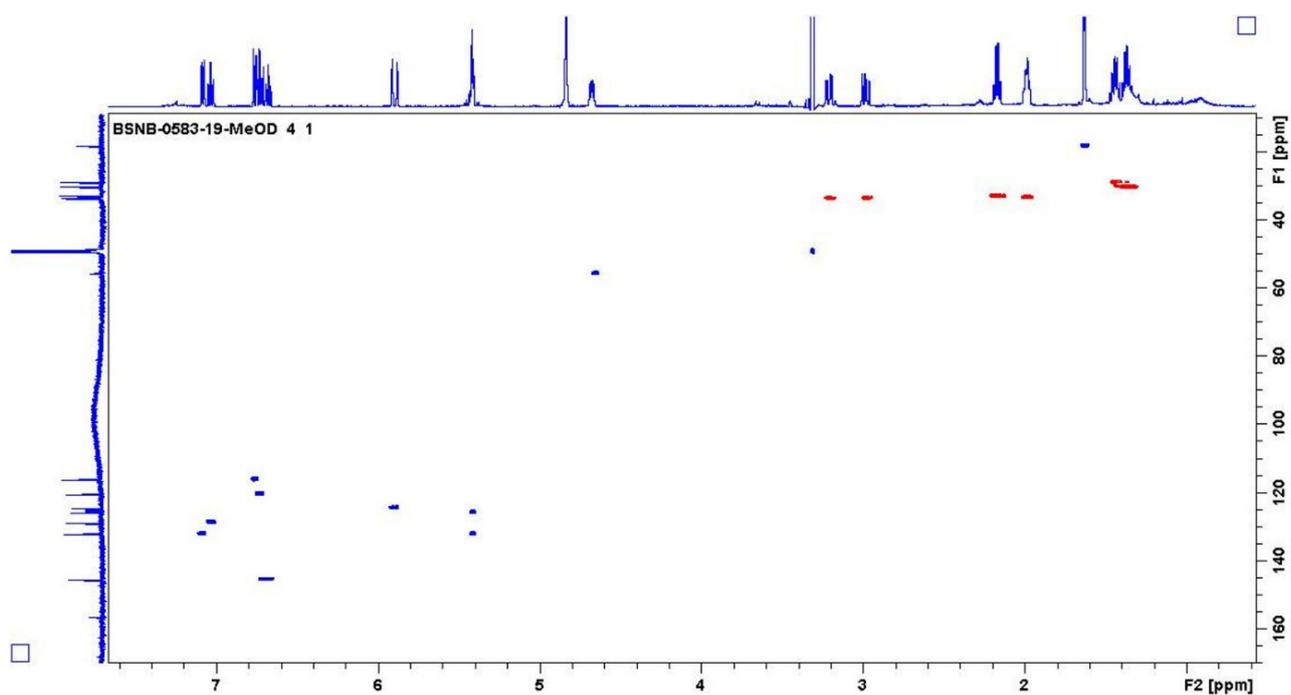
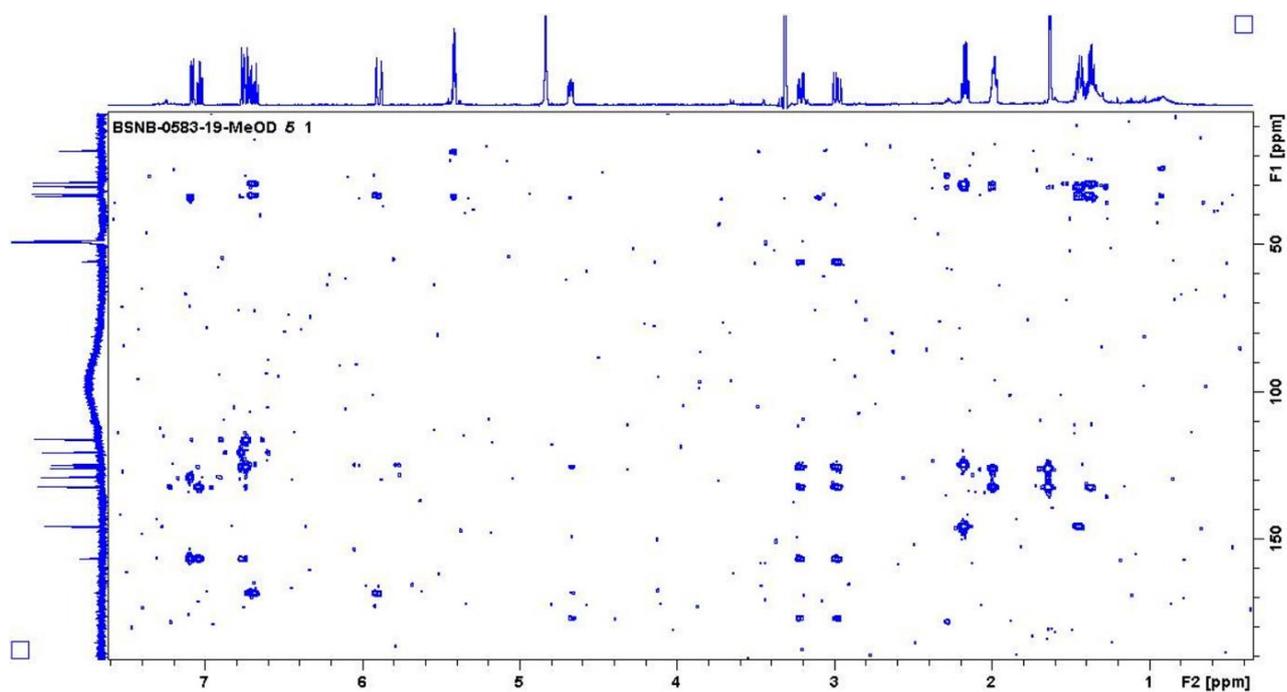
Comparaison des déplacements chimiques RMN-<sup>13</sup>C théoriques et expérimentaux

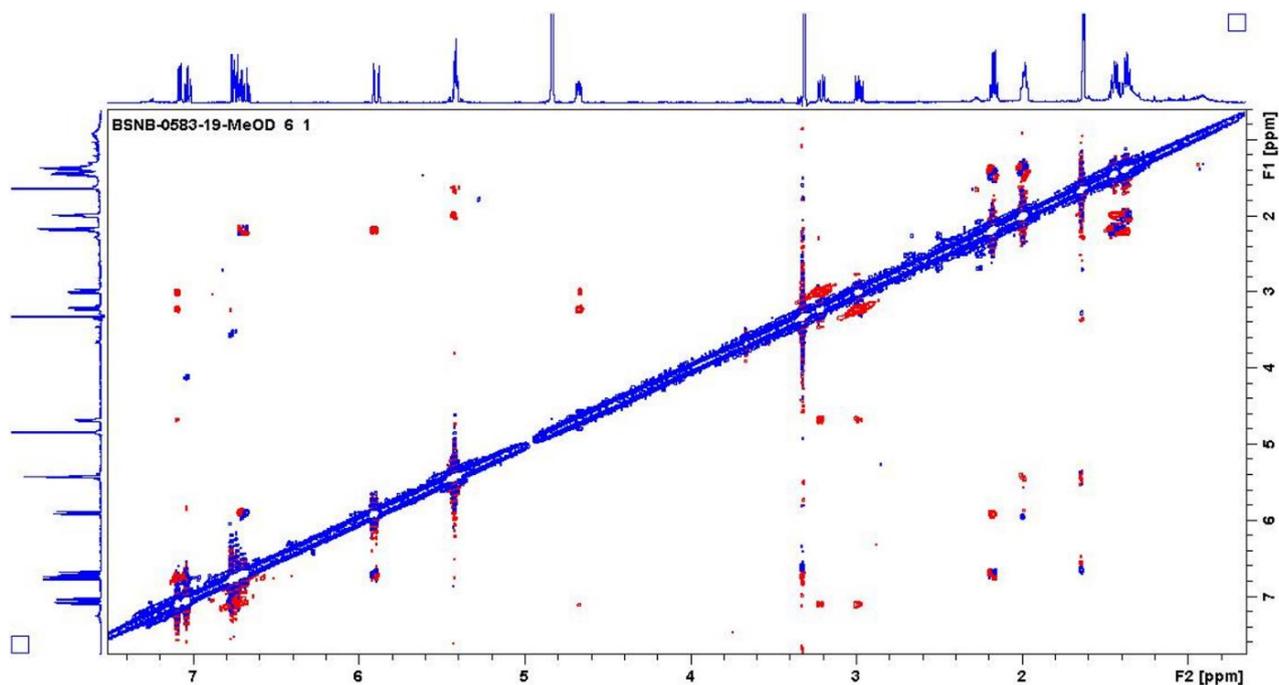
Annexe 59 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), spectre de masse en haute résolution et comparaison entre le spectre ECD prédit et expérimental de la colletamide C (**26**).

Position	$^1\text{H} : \delta$ (ppm) (multiplicité, $J$ (Hz))	$^{13}\text{C} : \delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	NOESY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )
1	-	168,4	-	-	-
2	5,89 (1H, d, $J = 15,3$ )	124,7	H-3 H-4	C-1 C-4	H-3 H-4
3	6,69 (1H, dt, $J = 15,2, 7,0$ )	145,7	H-2 H-4	C-1 C-4 C-5	H-2 H-4
4	2,17 (2H, ddd, $J = 14,0, 7,3, 1,2$ )	32,9	H-2 H-3 H-5	C-2 C-3 C-5 C-6	H-5
5	1,44 (2H, m)	28,9	H-4 H-6	C-3 C-4 C-6	H-4
6	1,37 (2H, m)	30,2	H-5 H-7	C-5 C-7	H-7
7	1,99 (2H, m)	33,4	H-6 H-8	C-5 C-6 C-8 C-9	H-5 H-6
8	5,41 (2H, m)	132,3	H-7 H-10	C-7 C-10	H-5 H-10
9		125,9			
10	1,63 (3H, d, $J = 3,7$ )	18,1	-	C-8 C-9	-
1'	-	176,9	-	-	-
2'	4,67 (1H, dd, $J = 8,7, 5,2$ )	55,6	H-3'	C-1 C-1' C-3' C-4'	H-3' (H-9' faible)
3'	3,21 (1H, dd, $J = 13,9, 5,0$ ) 2,98 (1H, dd, $J = 13,9, 8,9$ )	33,6	H-2' H-3'	C-1' C-2' C-4' C-5' C-9'	H-2' H-9'
4'	-	125,4	-	-	-
5'	-	156,7	-	-	-
6'	6,75 (1H, d, $J = 7,6$ )	116,2	H-7'	C-4' C-8'	-
7'	7,03 (1H, td, $J = 7,6, 1,2$ )	128,9	H-6' H-8'	C-5' C-9'	-
8'	6,74 (1H, t, $J = 7,4, 1,1$ )	120,5	H-7' H-9'	C-6' C-4'	-
9'	7,08 (1H, dd, $J = 7,5, 1,2$ )	132,2	H-8'	C-3' C-5' C-7'	-

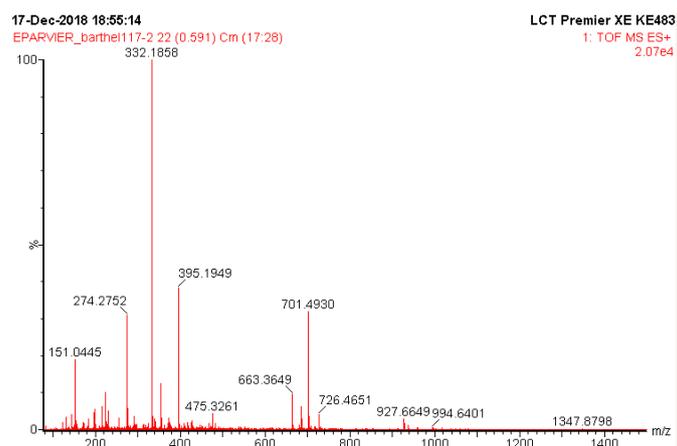
RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

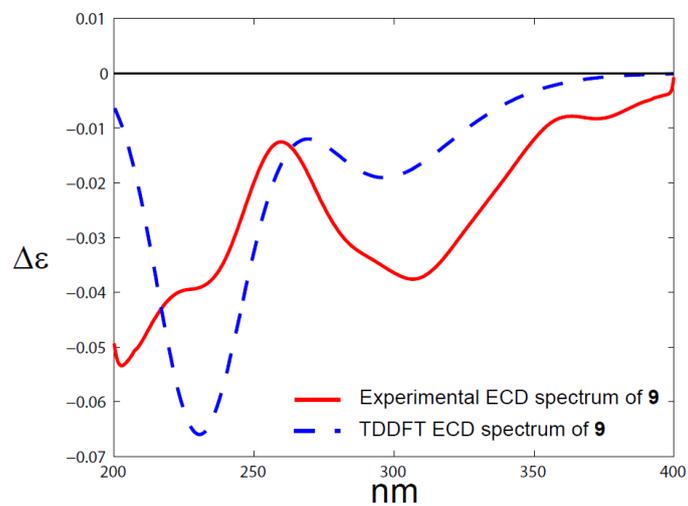
HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

## Spectre de masse haute résolution



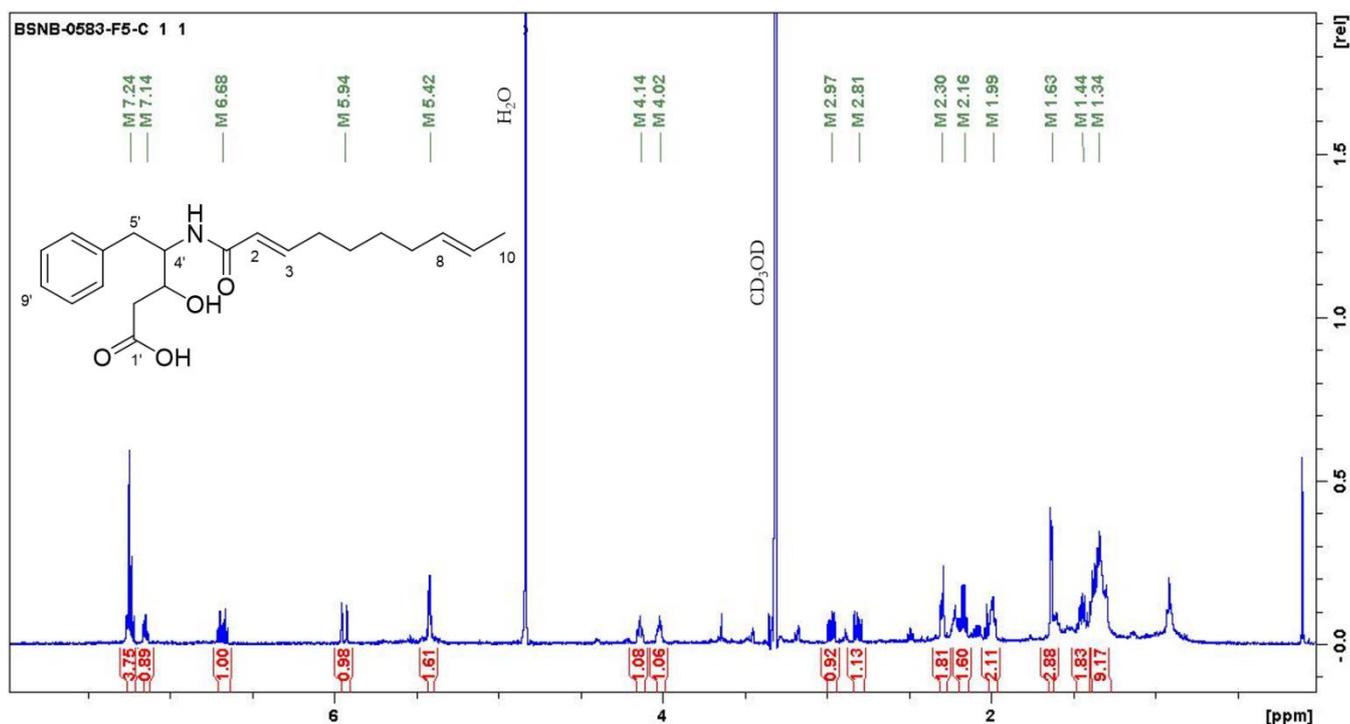
## Comparaison des spectres théorique et expérimental de dichroïsme circulaire électronique

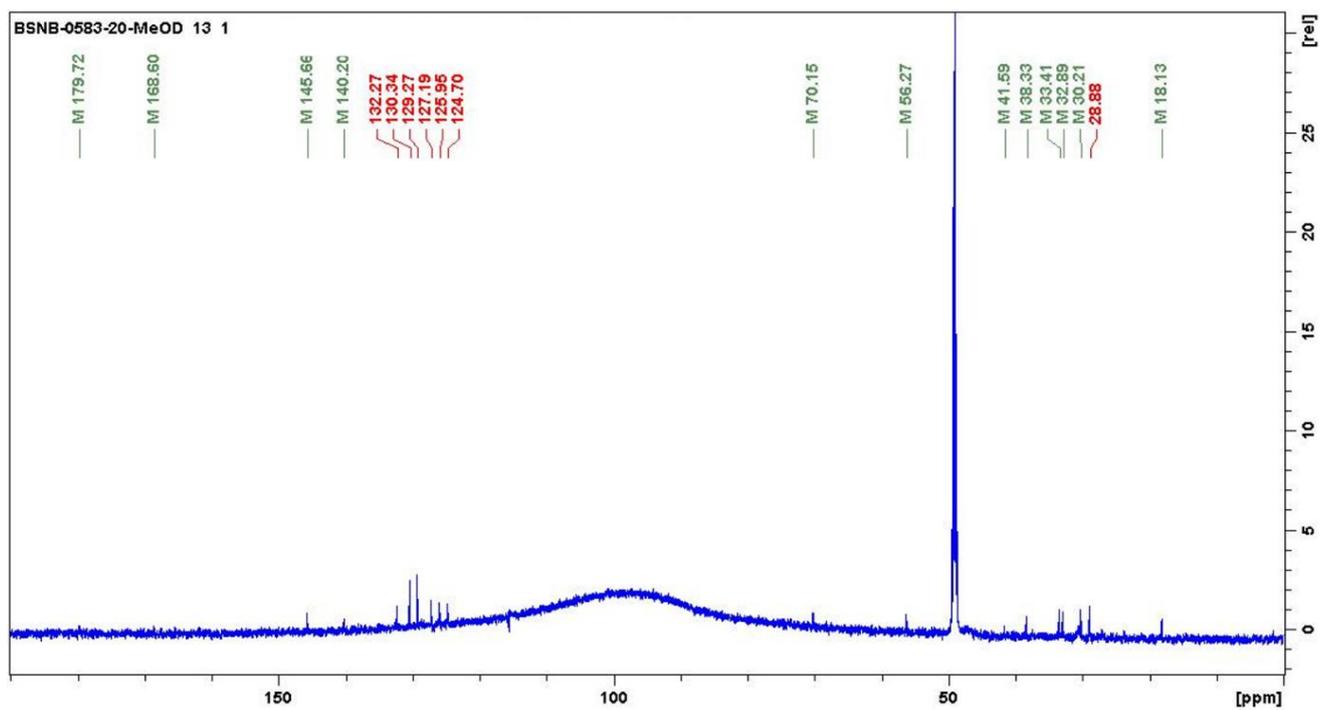
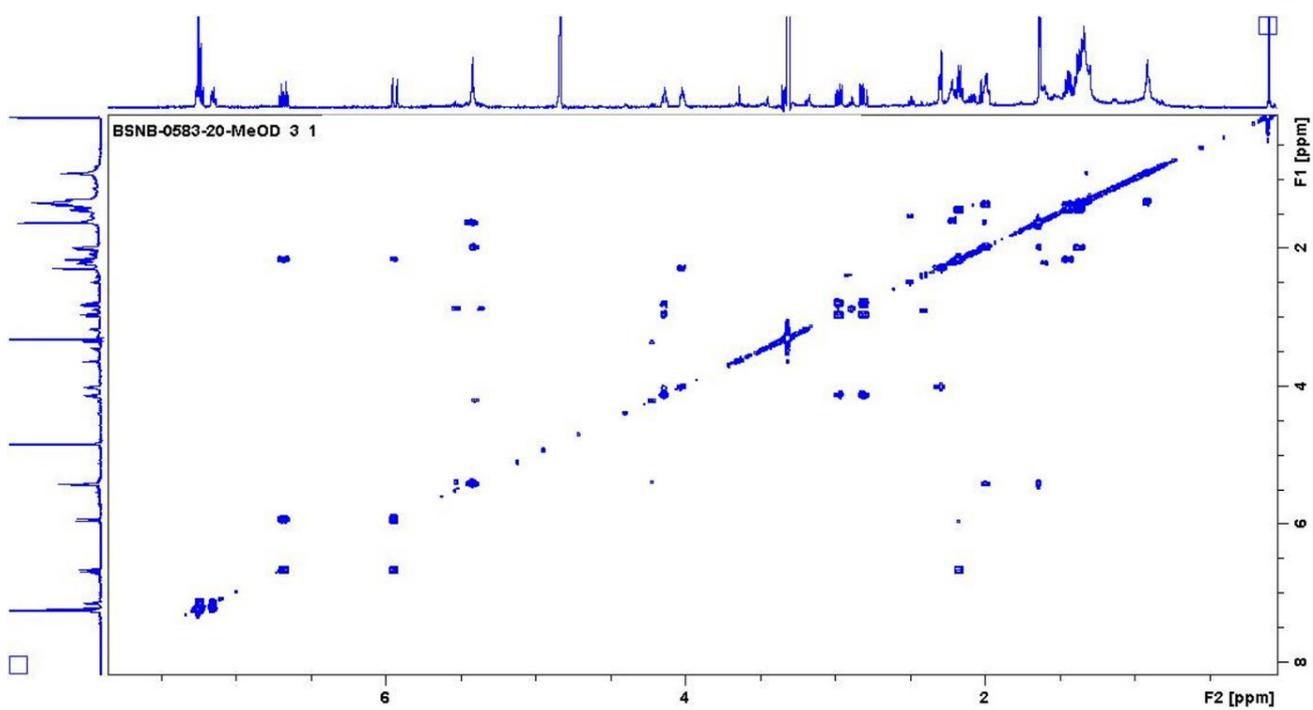


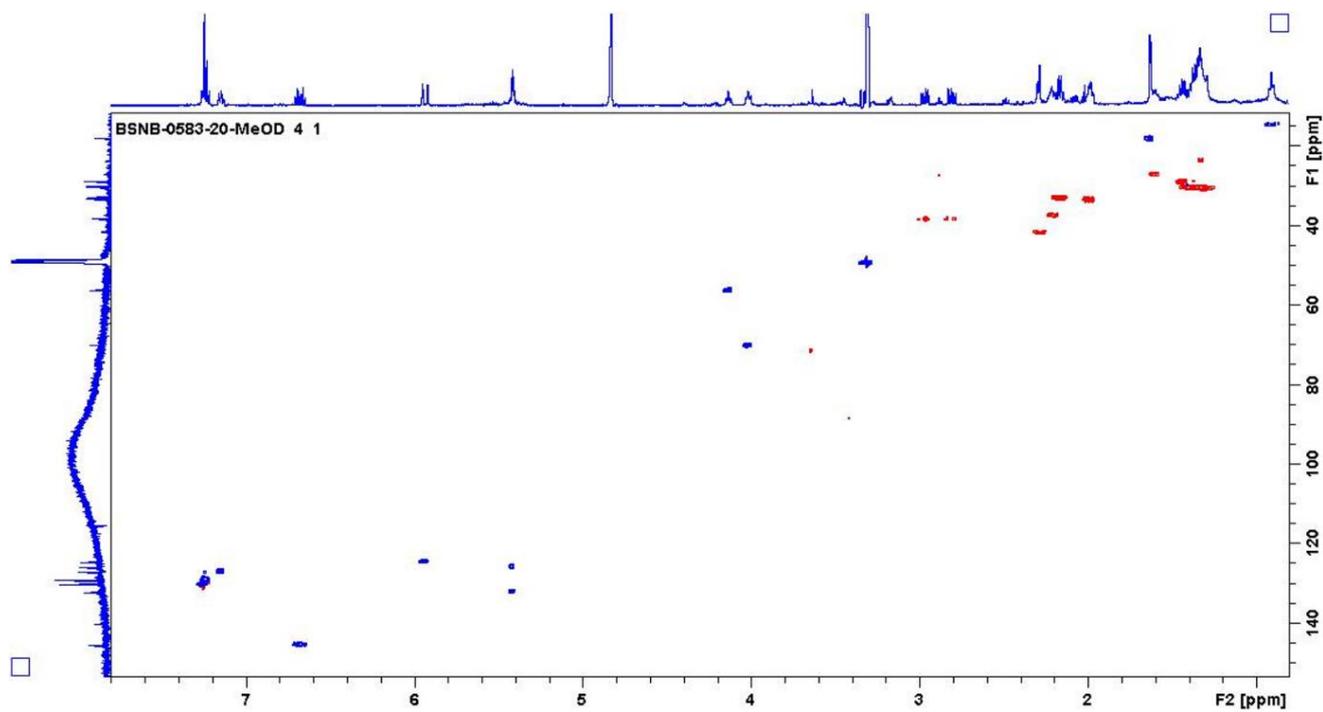
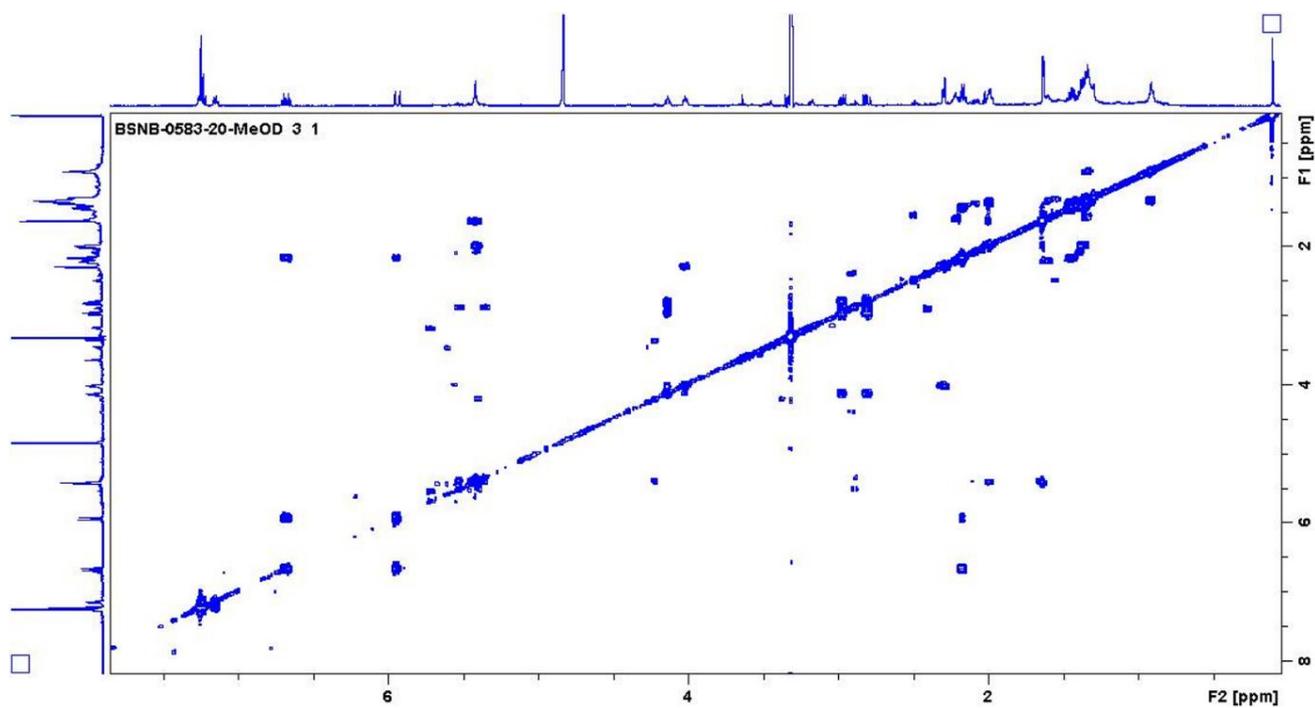
Annexe 60 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), spectre de masse en haute résolution et comparaison des déplacements RMN- $^{13}\text{C}$  prédits et expérimentaux de la colletamide D (**27**).

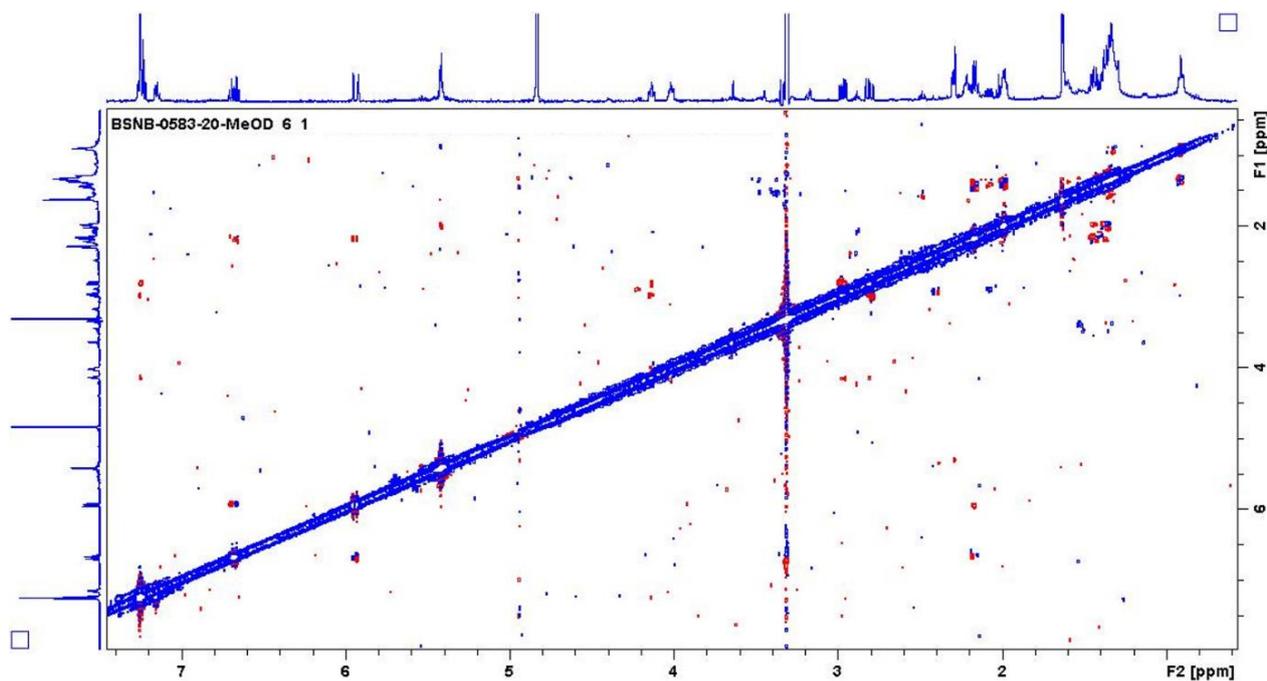
Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, $J$ (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	NOESY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )
1	-	168,6	-	-	-
2	5,94 (1H, d, $J = 15,4$ )	124,7	H-3 H-4	C-1 C-3	H-3'
3	6,68 (1H, dt, $J = 15,3, 7,0$ )	145,7	H-2 H-4	C-1 C-3 C-4	H-2' H-4'
4	2,16 (2H, m)	32,9	H-2 H-3 H-5	C-2 C-3 C-5	
5	1,44 (2H, m)	28,9	H-4 H-6	C-3 C-4 C-6	
6	1,34 (2H, m)	30,2	H-5 H-7	C-5 C-7	
7	1,99 (2H, m)	33,4	H-6 H-8	C-8 C-9	
8	5,42 (2H, m)	132,2	H-7 H-10	C-7 C-10	
9		126,0			
10	1,63 (3H, d, $J = 4,0$ )	18,1	H-9	C-8 C-9	
1'	-	179,7	-	-	-
2'	2,30 (2H, m)	41,6	H-3'	C-1'	
3'	4,02 (1H, m)	70,1	H-2' H-4'		
4'	4,14 (1H, m)	56,3	H-5' H-3'		H-5'
5'	2,97 (1H, dd, $J = 13,4, 6,4$ ) 2,81 (1H, dd, $J = 13,4, 8,4$ )	38,3	H-4' H-5'	C-3' C-4' C-6' C-7'	H-4' H-5'
6'	-	140,2	-	-	-
7'	7,25 (2H, m)	130,3		C-7' C-9'	
8'	7,23 (2H, m)	129,3	H-9'	C-6' C-8'	
9'	7,14 (1H, m)	127,2	H-8'	C-7'	

### RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )

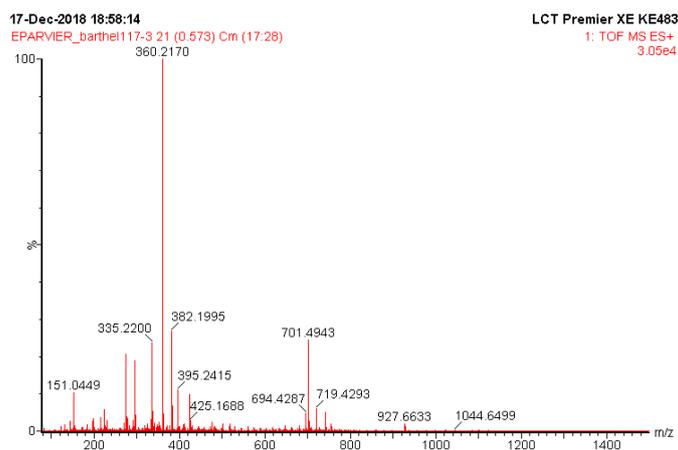
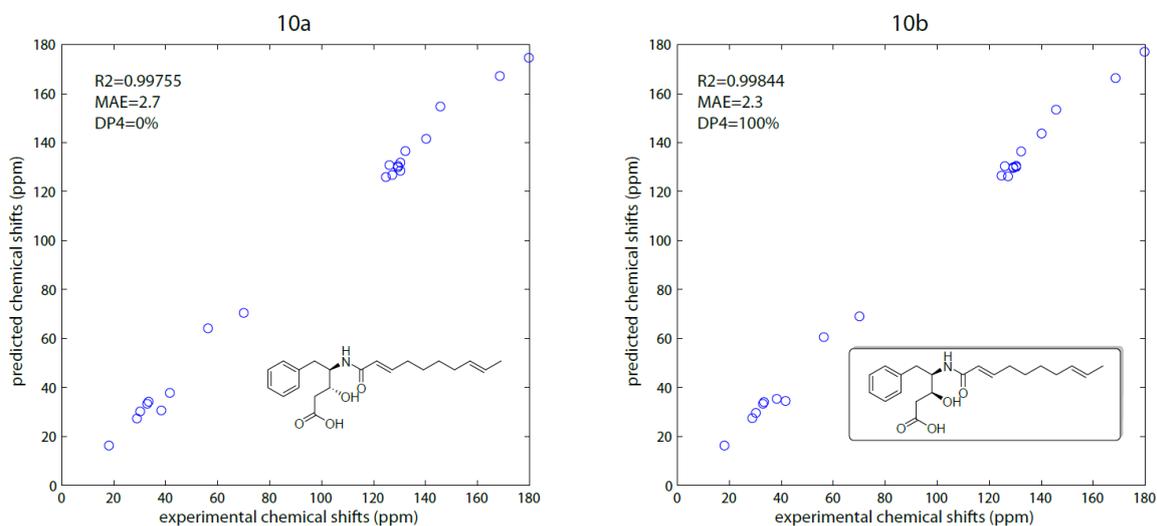


RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

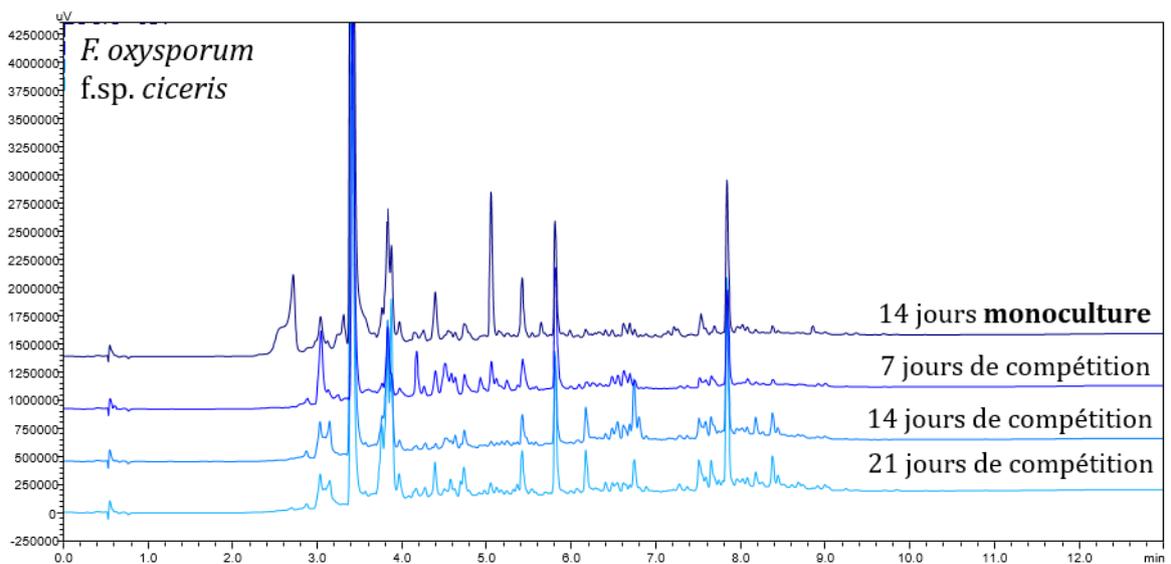
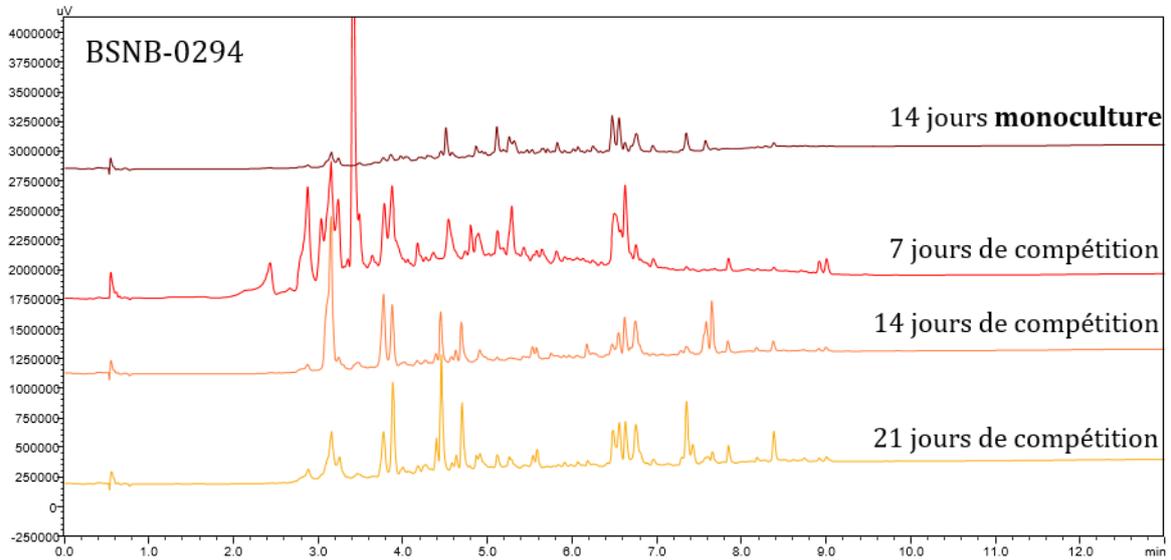
HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

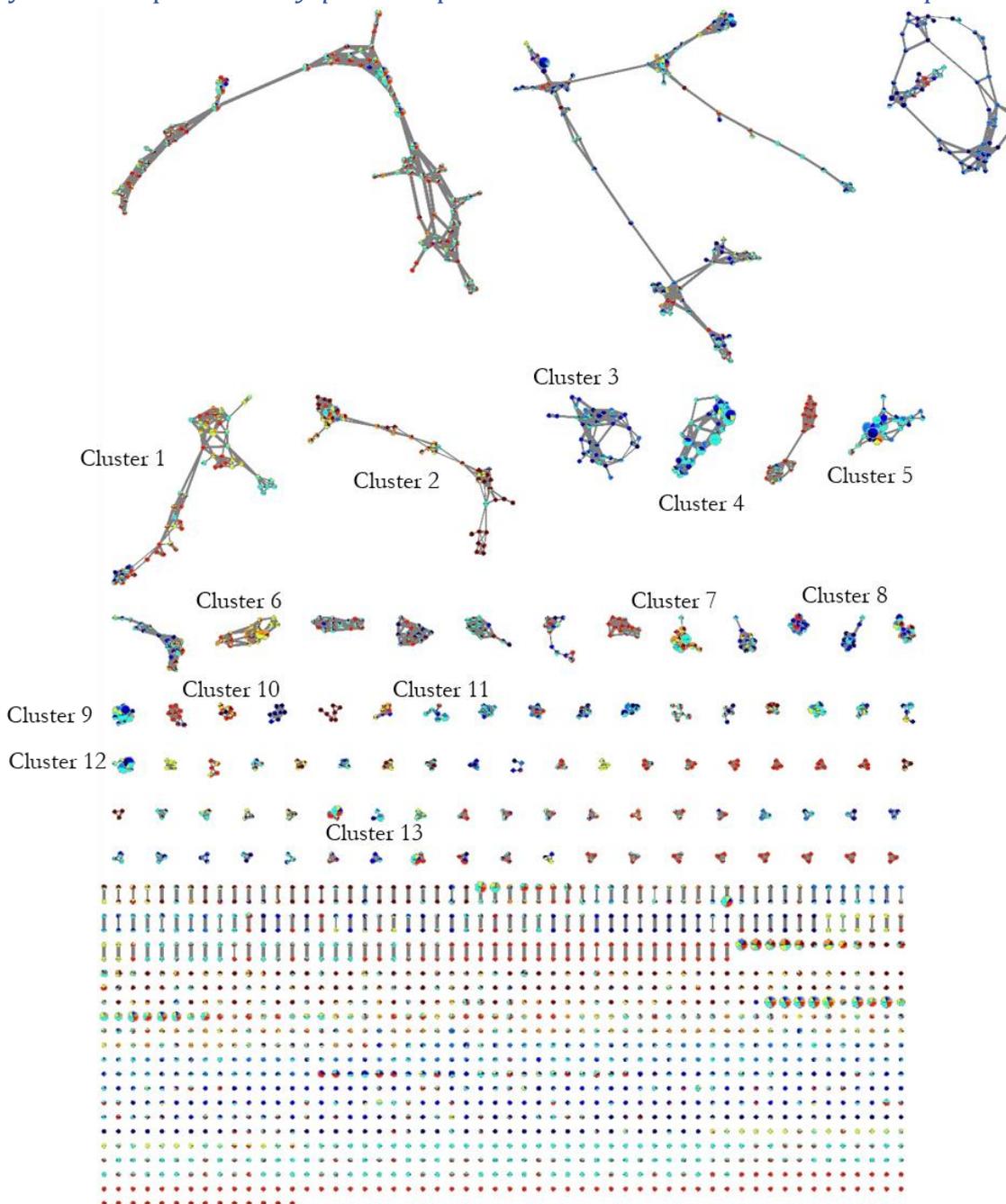
## Spectre de masse haute résolution

Comparaison des déplacements chimiques RMN- $^{13}\text{C}$  théoriques et expérimentaux

Annexe S61 : Profils UV à 254 nm des extraits des extraits de Xylariaceae sp. (BSNB-0294, en rouge) et de *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* (en bleu) en co-culture. Du haut vers le bas : extrait de la culture seule à deux semaines, extrait en compétition à une semaine, extrait en compétition à deux semaines et extrait en compétition à trois semaines.



Annexe S62 : Réseau moléculaire formé avec les données UHPLC-MS/MS des extraits de *Xylariaceae* sp. et de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* suivant les conditions et le temps de culture.



Répartition des nœuds retrouvés dans les extraits de:

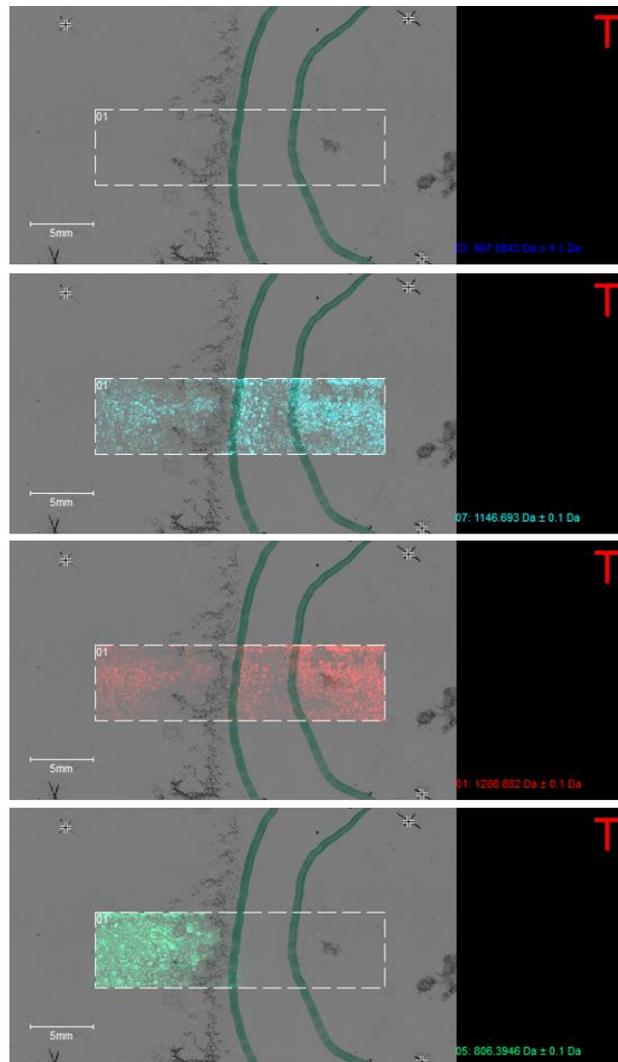
FOCIC

BSNB-0294C

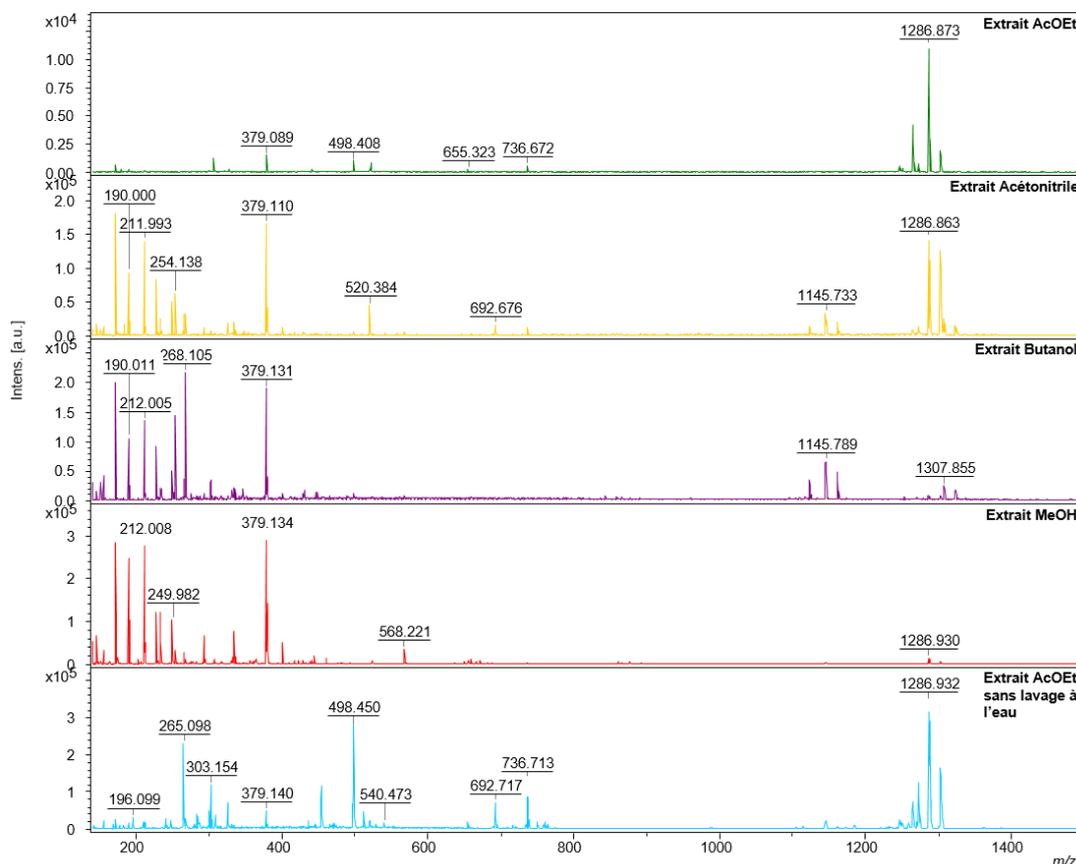
- Culture seule
- Co-culture 1 sem
- Co-culture 2 sem
- Co-culture 3 sem

- Culture seule
- Co-culture 1 sem
- Co-culture 2 sem
- Co-culture 3 sem

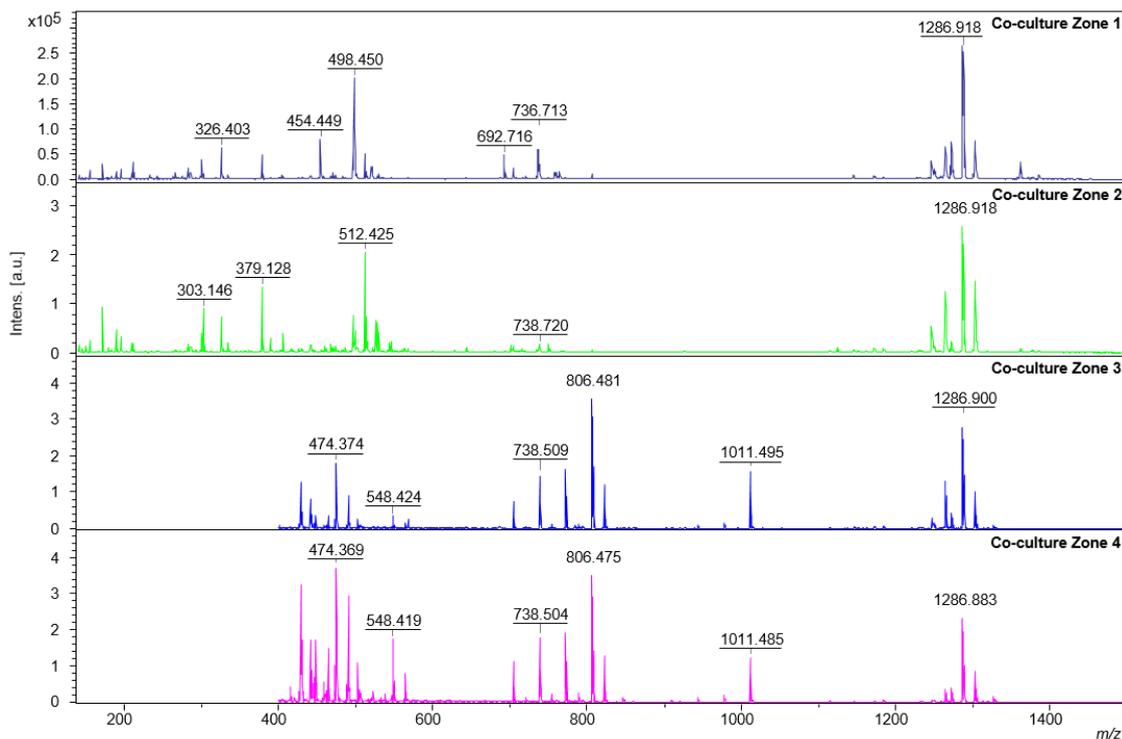
Annexe S63 : Image par MALDI-TOF MS de la compétition entre *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* et BSNB-0294 à 23 jours de co-culture. Les trois ions les plus intenses de la compétition sont relevés :  $m/z$  806,4, 1146,8 et 1286,9.



Annexe S64 : Spectres MALDI-TOF MS des extraits de Xylariaceae sp. BSNB-0294 avec différents solvants.



Annexe S65 : Spectres MALDI-TOF MS des extraits de Xylariaceae sp. BSNB-0294 selon les zones de la co-culture.



Annexe S66 : Halo d'inhibition de la pousse de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* après 2 semaines de culture par différents extraits ou fractions testés à 10 mg/mL (50 µL déposés). Le clotrinazole est utilisé comme témoin positif.



Extrait à l'AcOEt de la zone1 de la compétition



Extrait à l'AcOEt de la zone2 de la compétition



Extrait à l'AcOEt de la zone3 de la compétition



Extrait à l'AcOEt de la zone4 de la compétition



Clotrinazole



Extrait à l'AcOEt avec partition à l'eau



Extrait à l'AcOEt sans partition avec l'eau



Extrait au méthanol



Extrait à l'acétonitrile



Extrait au butanol



Extrait au cyclohexane



Extrait à l'eau



BSNB-0294 GE



BSNB-0294 F2



BSNB-0294 F3



BSNB-0294 F4



BSNB-0294 F5



BSNB-0294 F6



BSNB-0294 F6-1



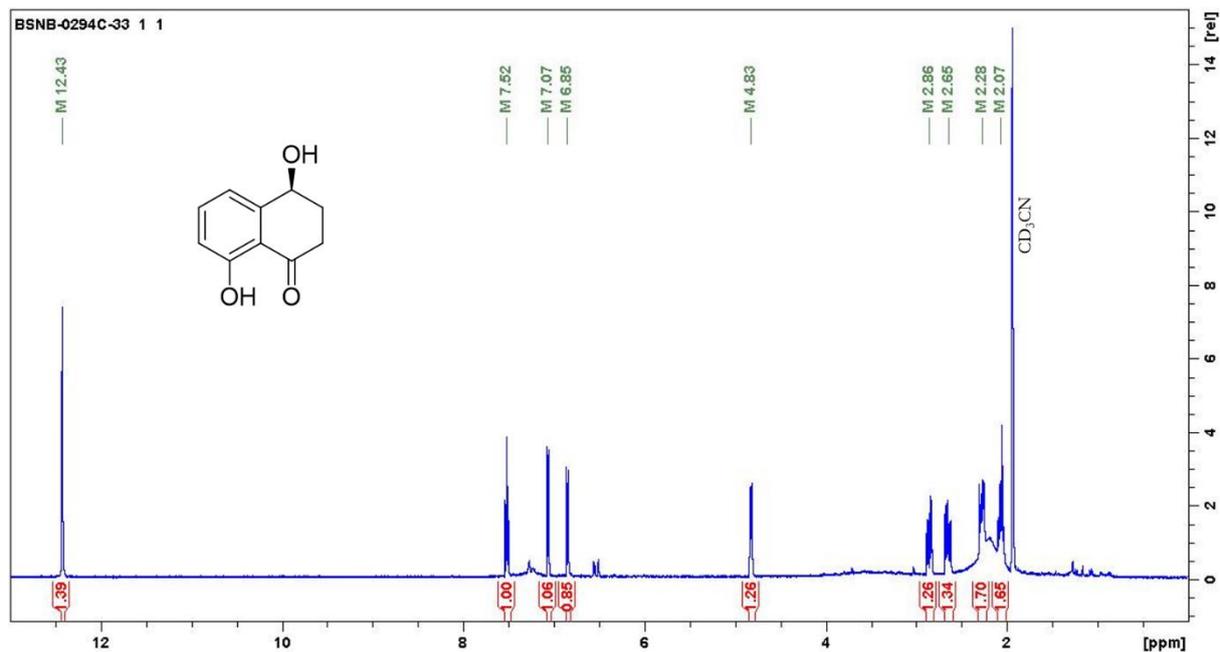
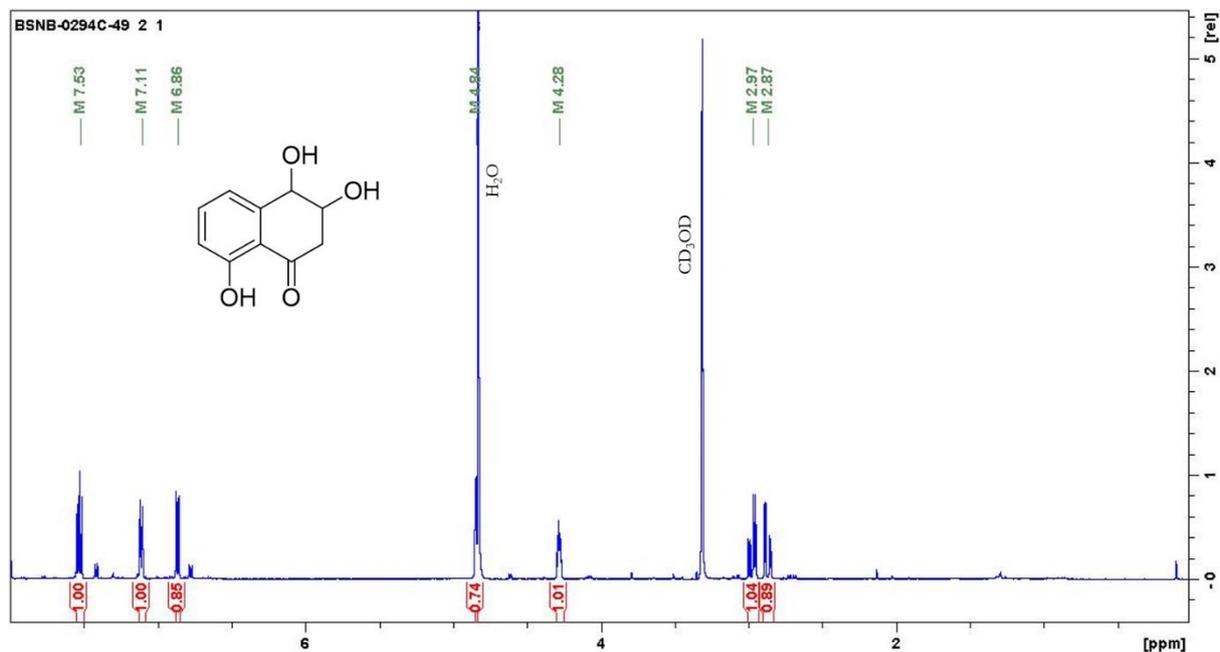
BSNB-0294 F7



BSNB-0294 F8



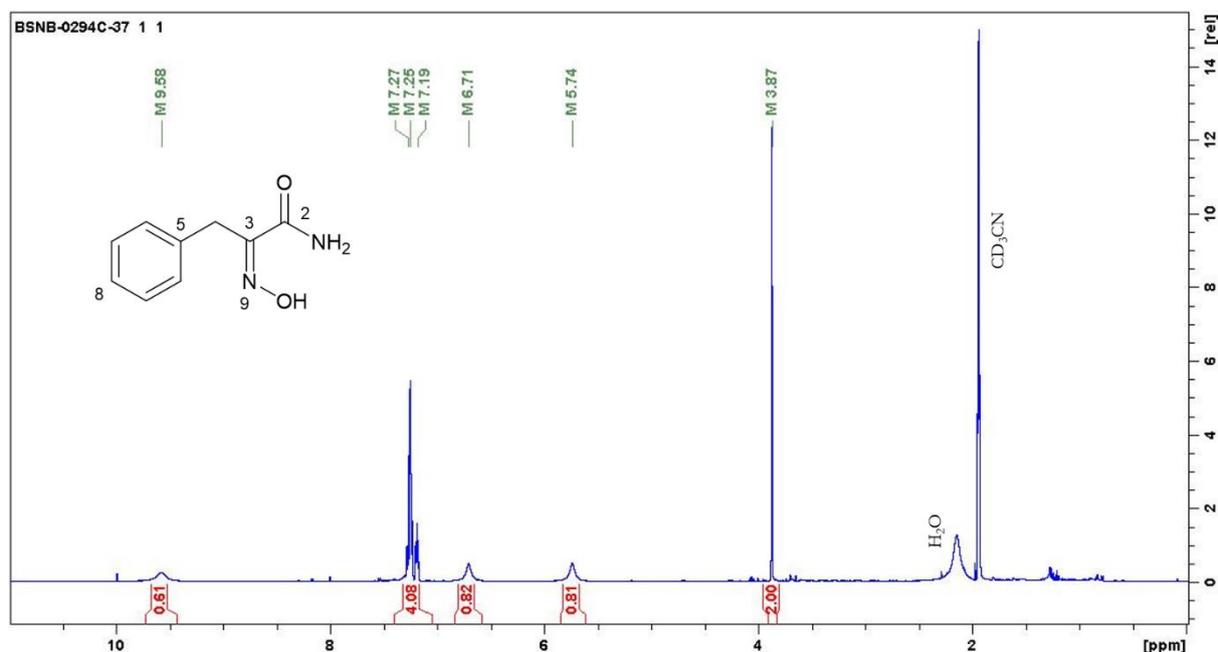
Fraction de rinçage au THF de la colonne chromatographique

Annexe 67 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la (+)-(4*S*)-4,8-dihydroxy- $\alpha$ -tétralone (**28**).Annexe 68 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de la 3,4,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphtalen-1(2*H*)-one (**29**).

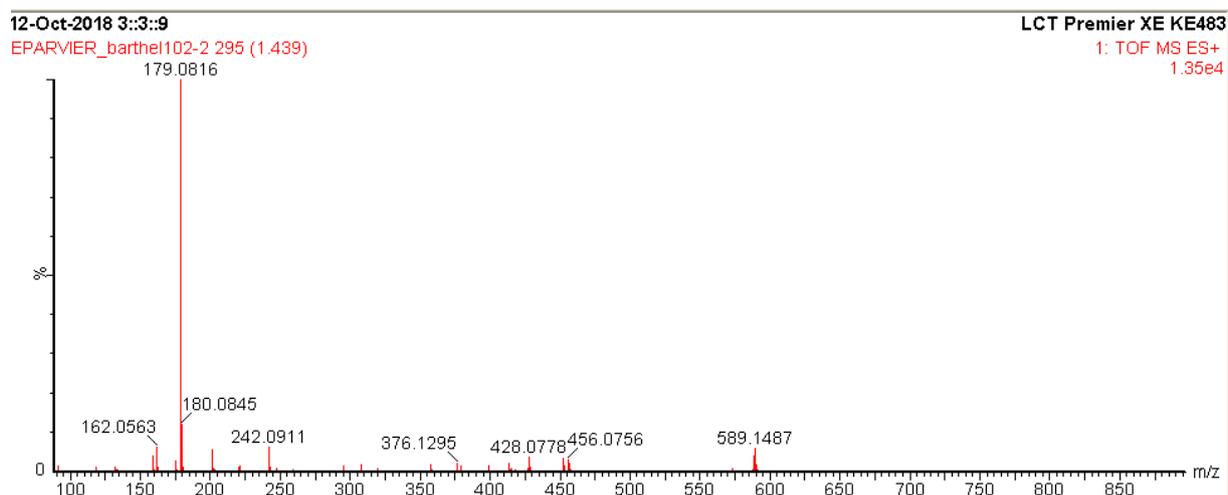
Annexe 69 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanamide (**30**).

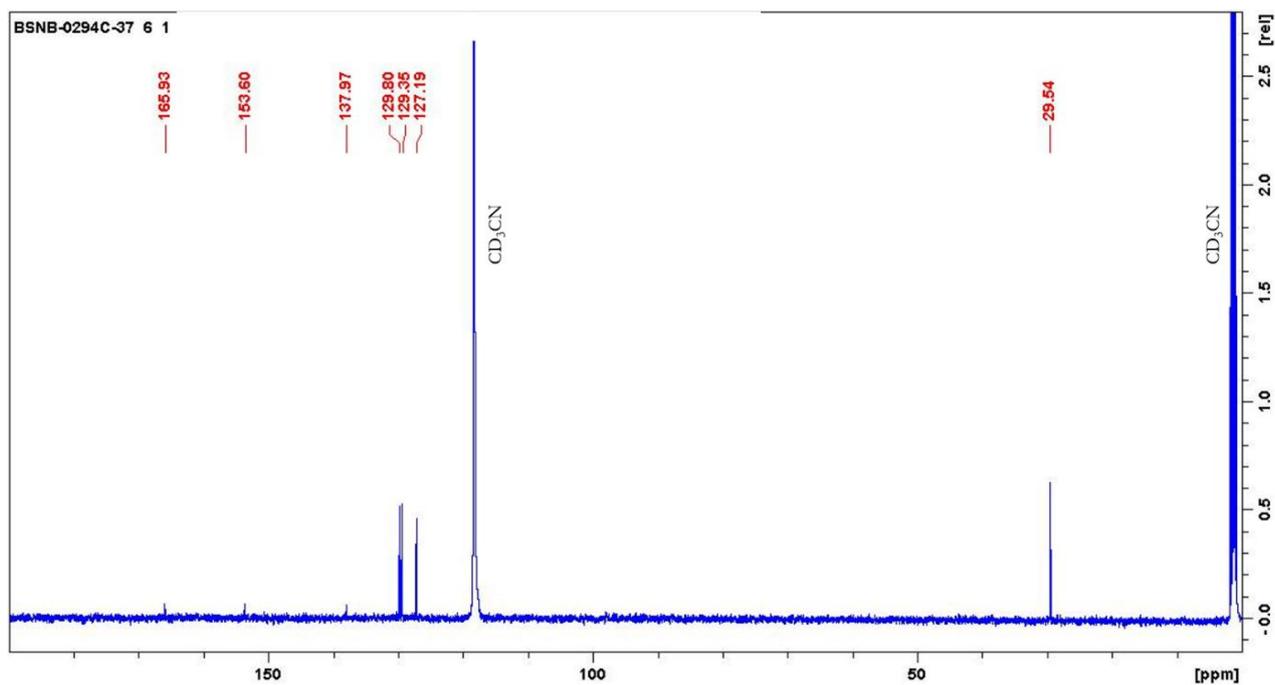
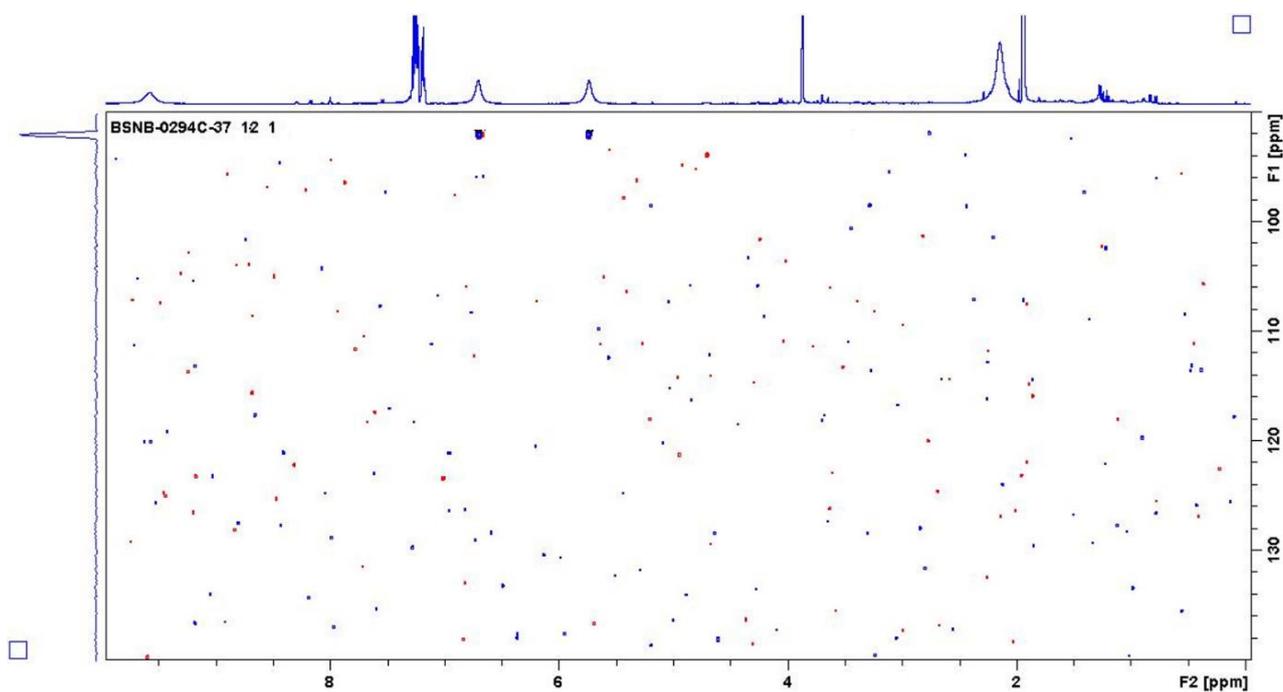
Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, J (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	$^{15}\text{N}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ )
1	6,71 (1H, br s) 5,74 (1H, br s)	-	92,0			
2	-	165,9	-			
3	-	153,6	-			
4	3,87 (2H, s)	29,5	-	H-6, H-10	C-2, C-3, C-5, C-6	N-9
5	-	138,0	-			
6	7,26 (2H, m)	129,8	-	H-4	C-4, C-6, C-8,	
7	7,26 (2H, m)	129,4	-		C-5, C-7	
8	7,20 (1H, m)	127,2	-		C-6	
9-OH	9,58 (1H, br s)	-	373,5			

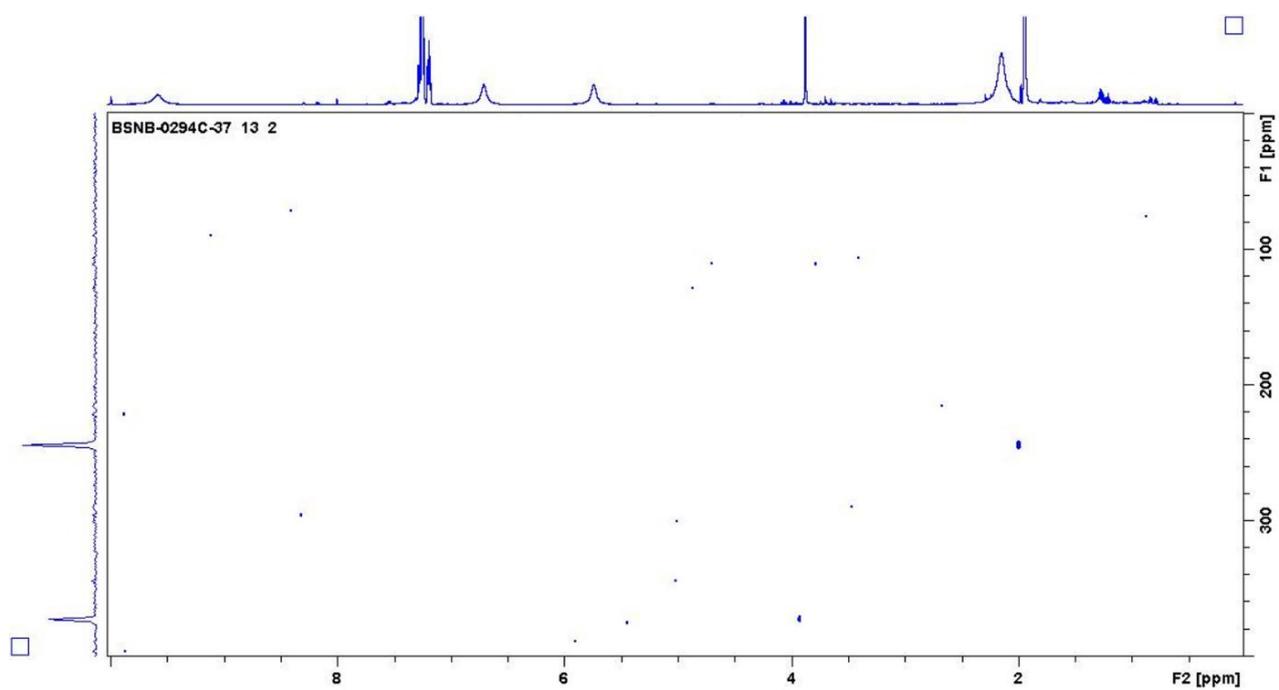
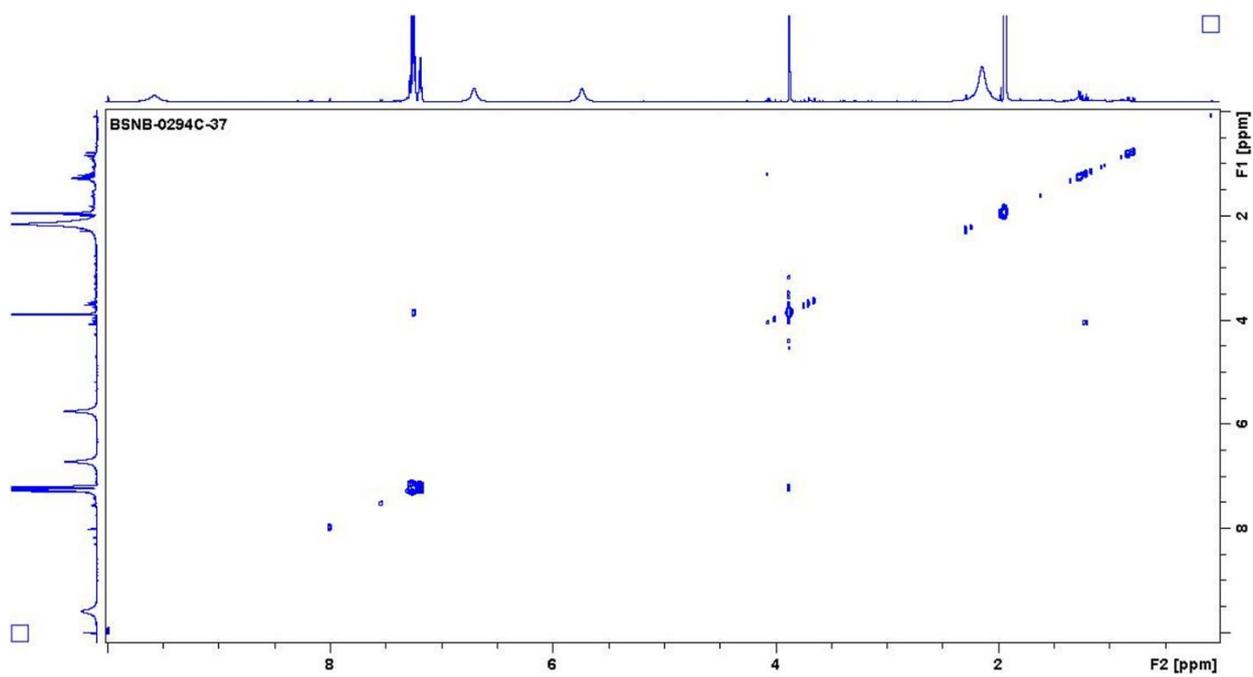
RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

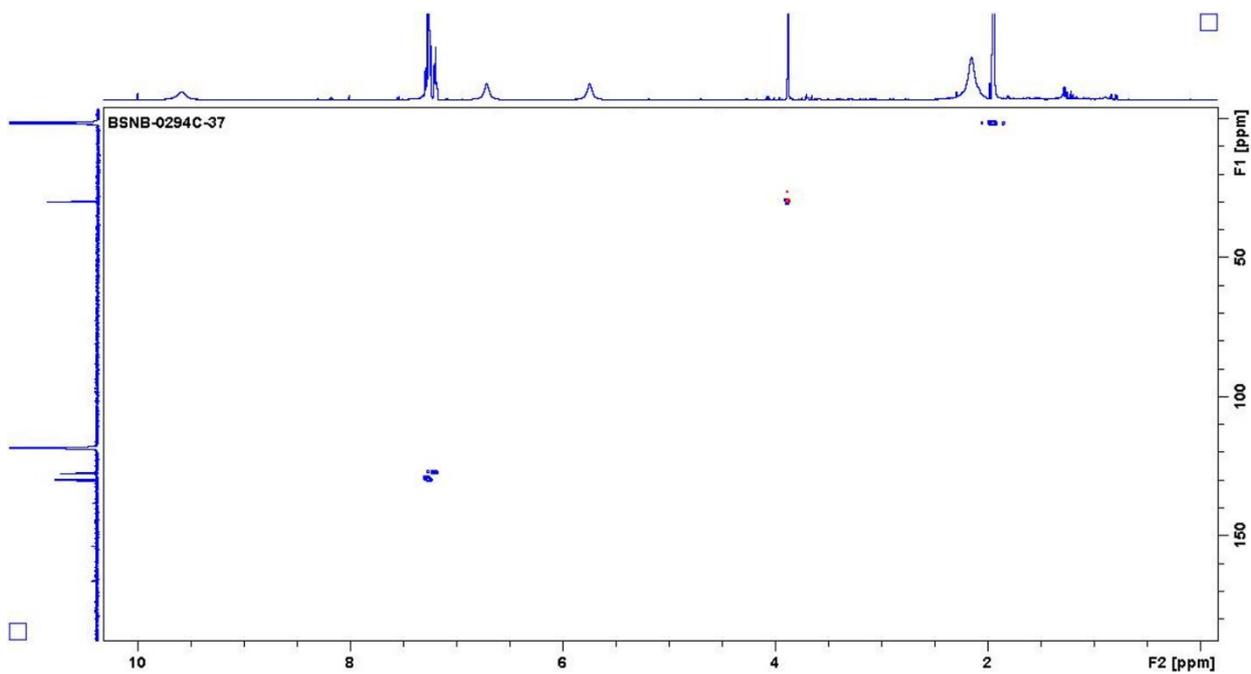
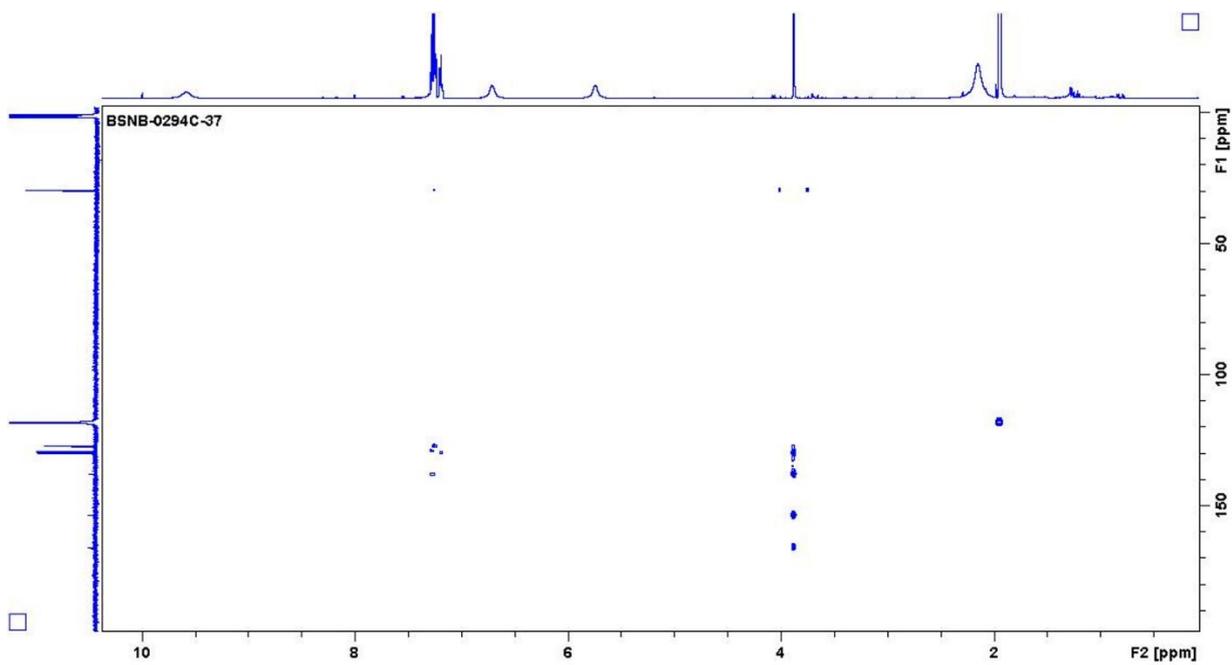


Spectre de masse haute résolution



RMN- $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

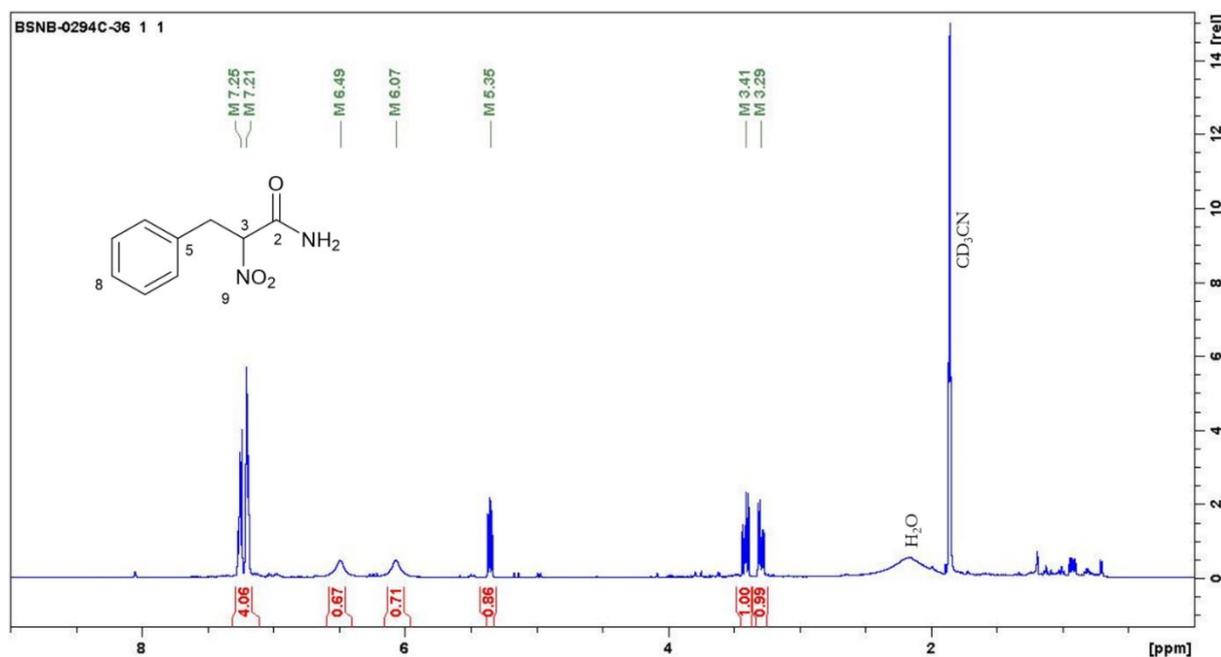
HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

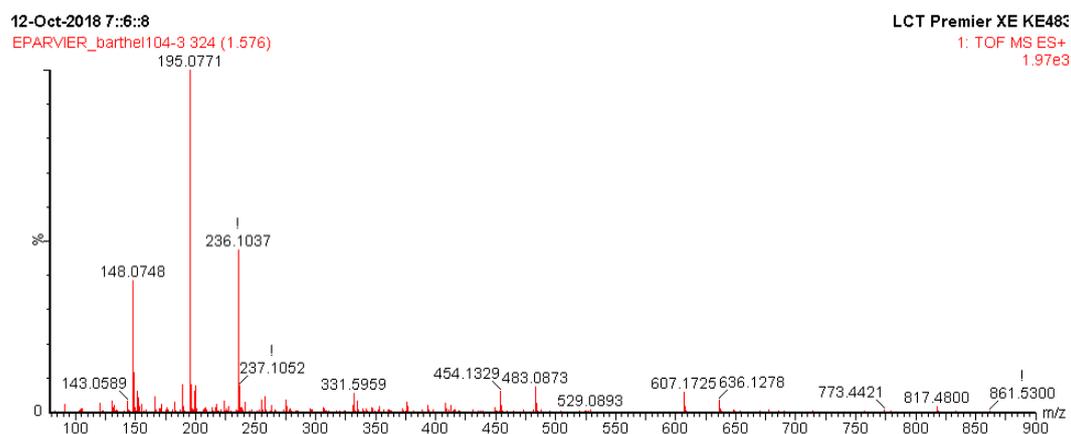
Annexe 70 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2-nitro-3-phénylpropanamide (**31**).

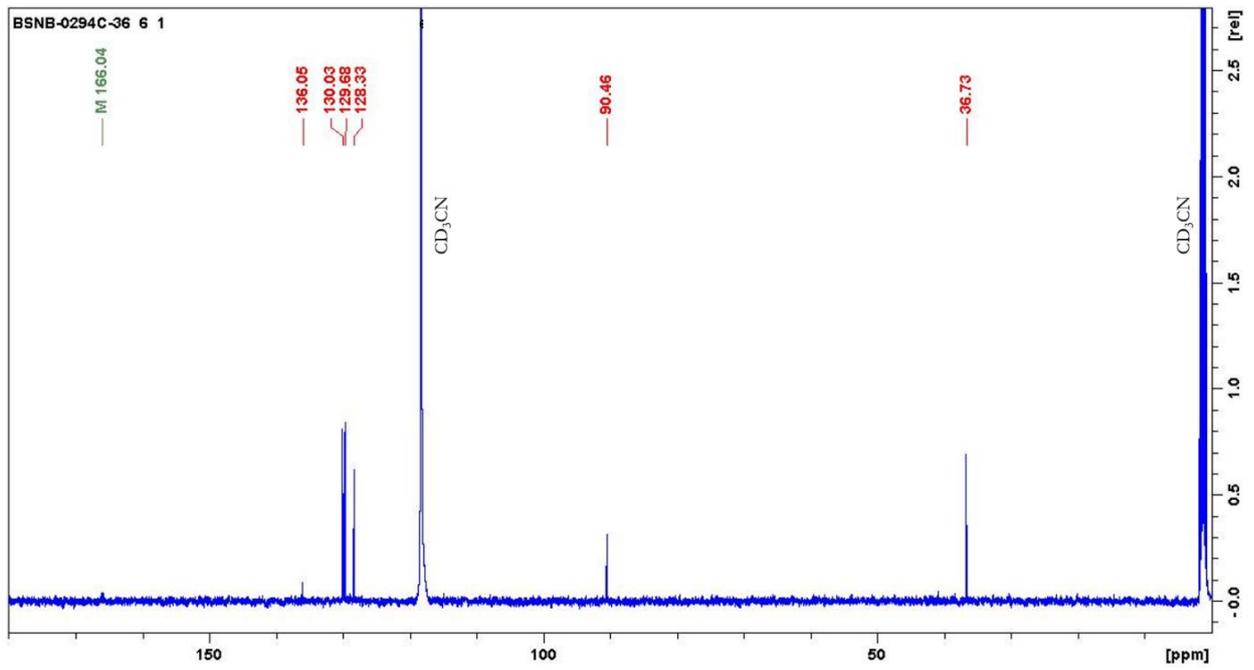
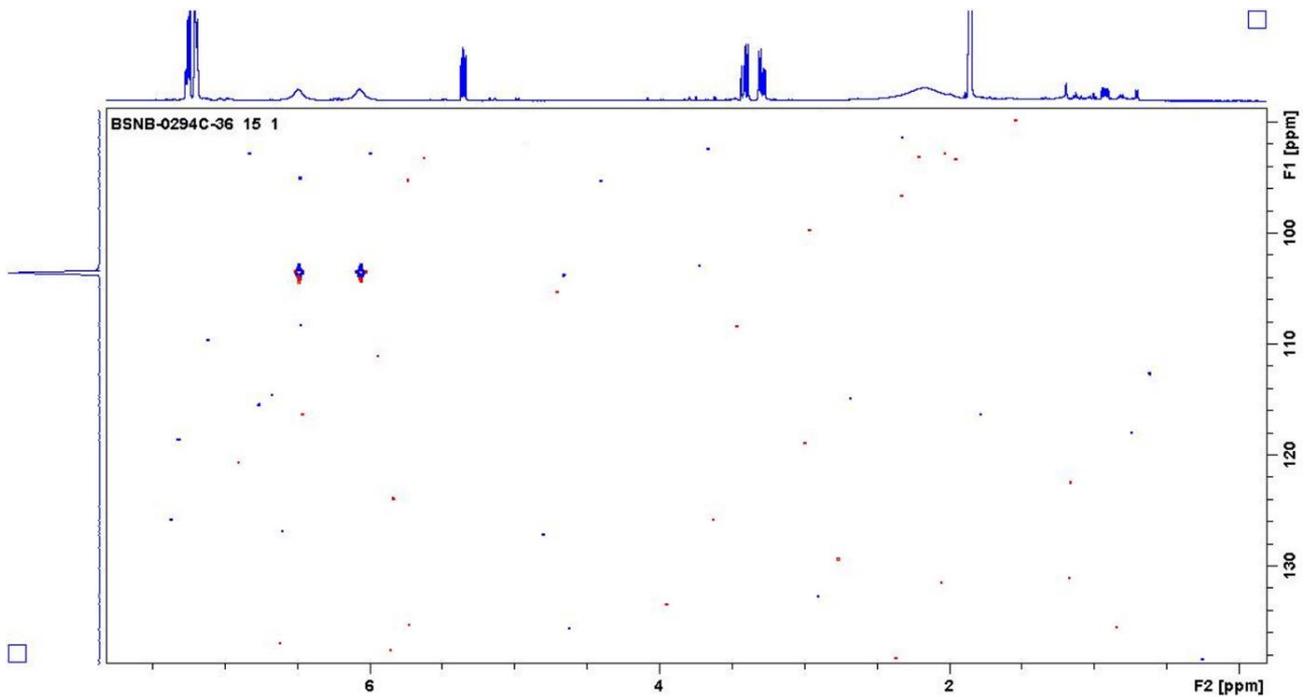
Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, $J$ (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	$^{15}\text{N}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ )
1	6,49 (1H, br s) 6,07 (1H, br s)	-	103,5			
2	-	166,0	-			
3	5,35 (1H, dd, $J = 8,5, 6,8$ )	90,5	-	H-4	C-2, C-4, C-5	N-9
4	3,41 (1H, dd, $J = 14,2, 8,7$ ) 3,29 (1H, dd, $J = 14,3, 6,6$ )	36,7	-	H-3	C-2, C-3, C-5, C-6	N-9
5	-	136,1	-			
6	7,21 (2H, m)	130,0	-		C-4, C-6	
7	7,25 (2H, m)	129,7	-		C-5, C-7	
8	7,21 (1H, m)	128,3	-		C-6	
9	9,58 (1H, br s)	-	79,8			

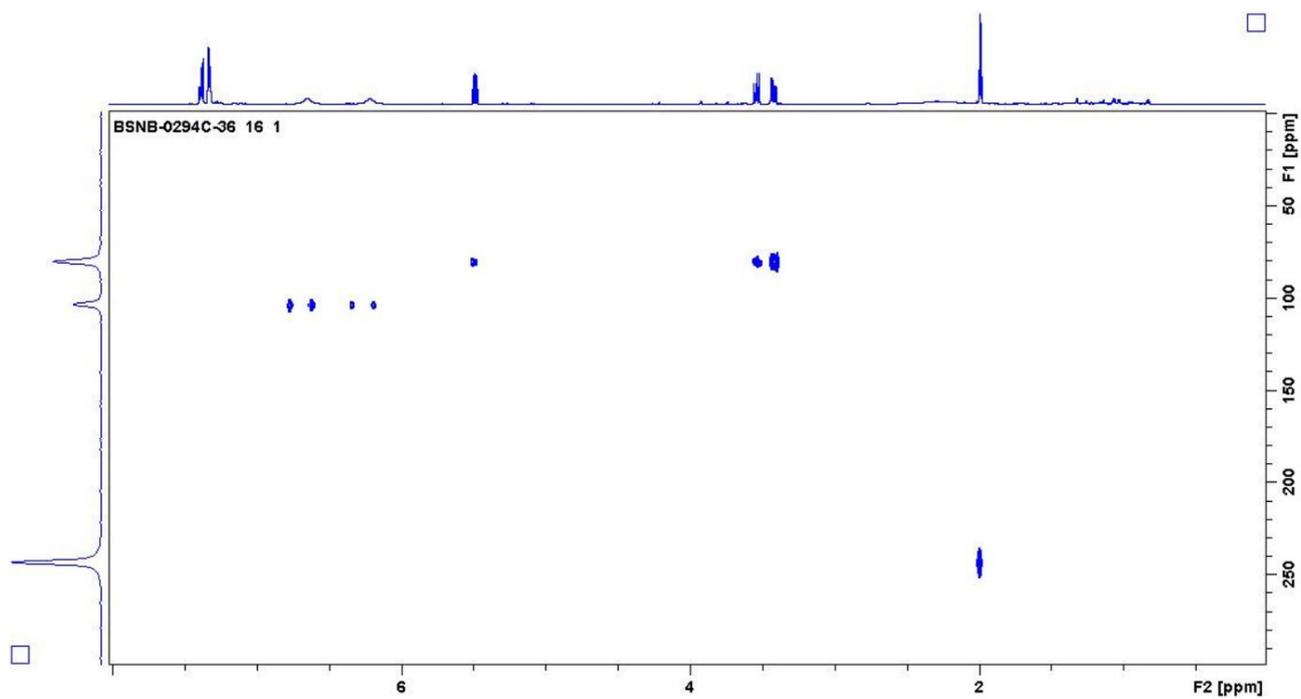
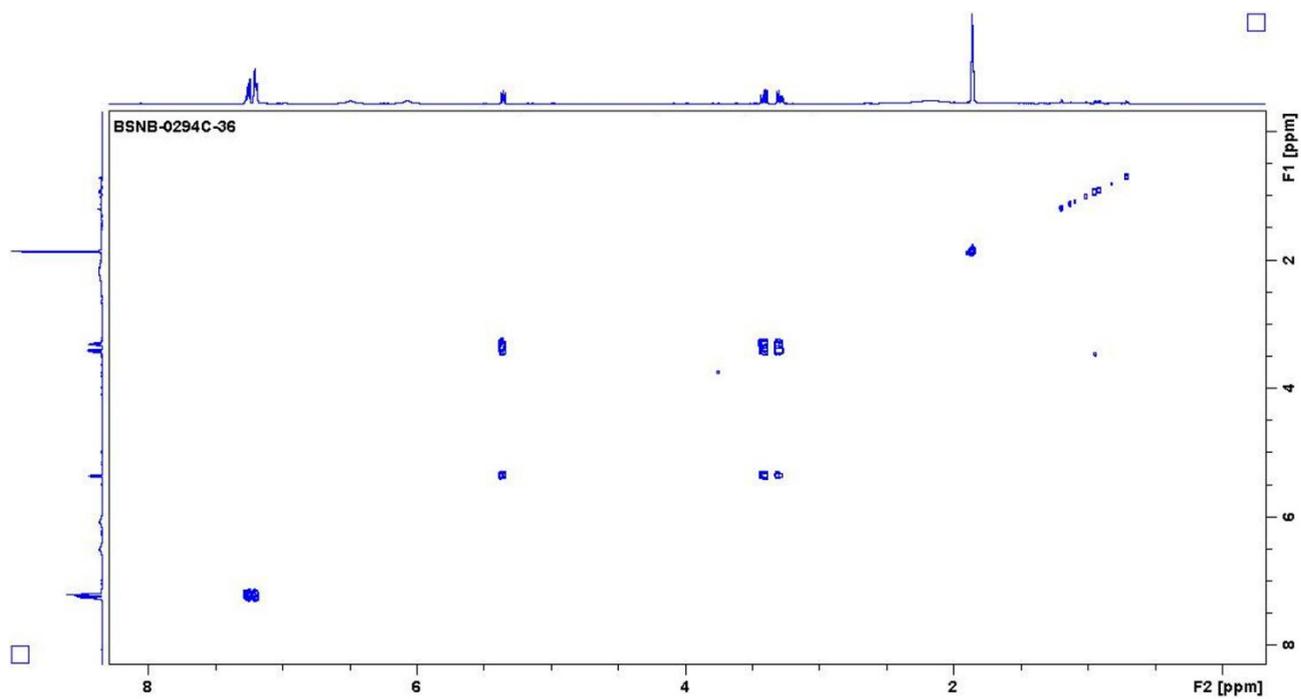
RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

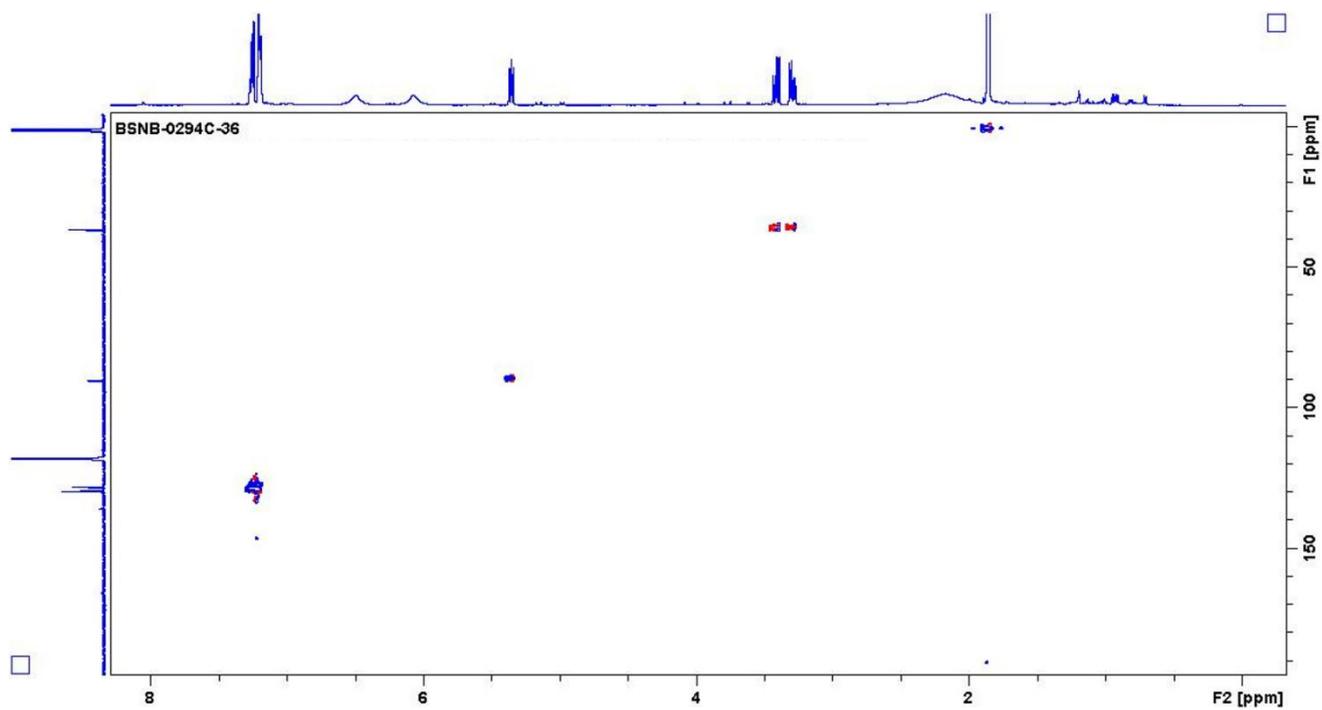
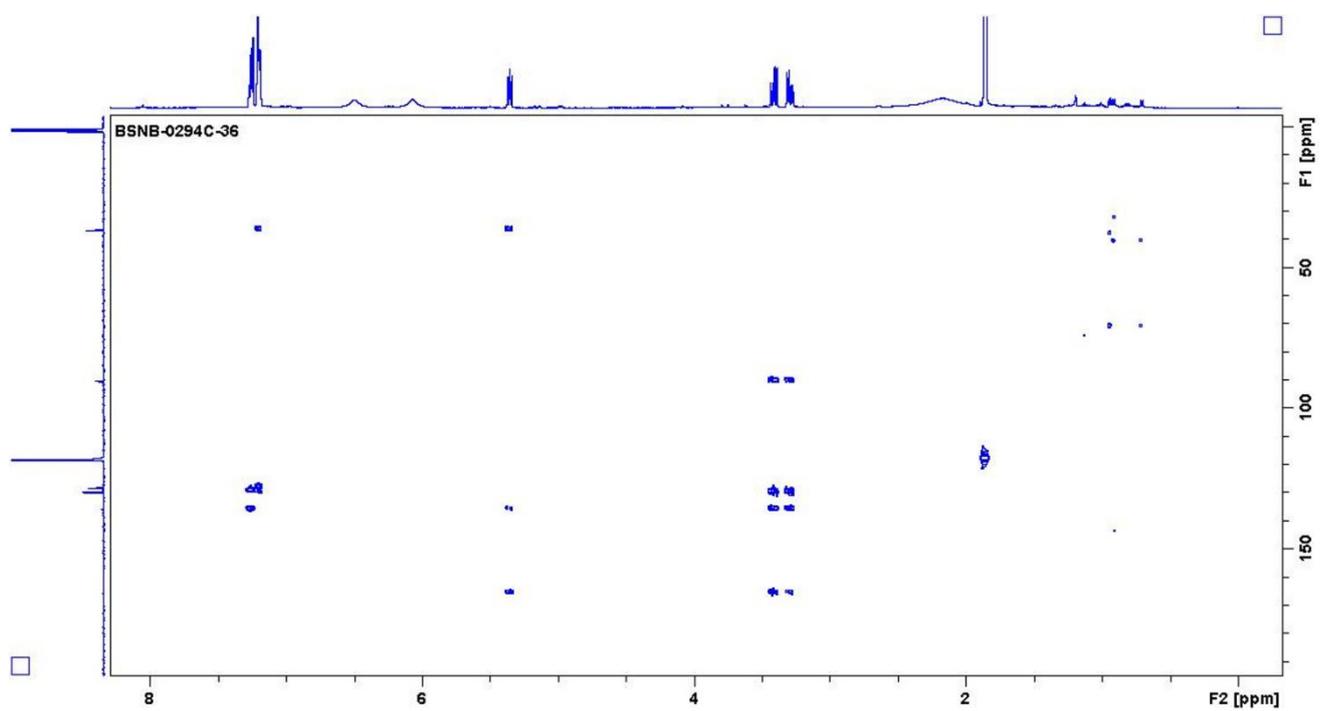


Spectre de masse haute résolution

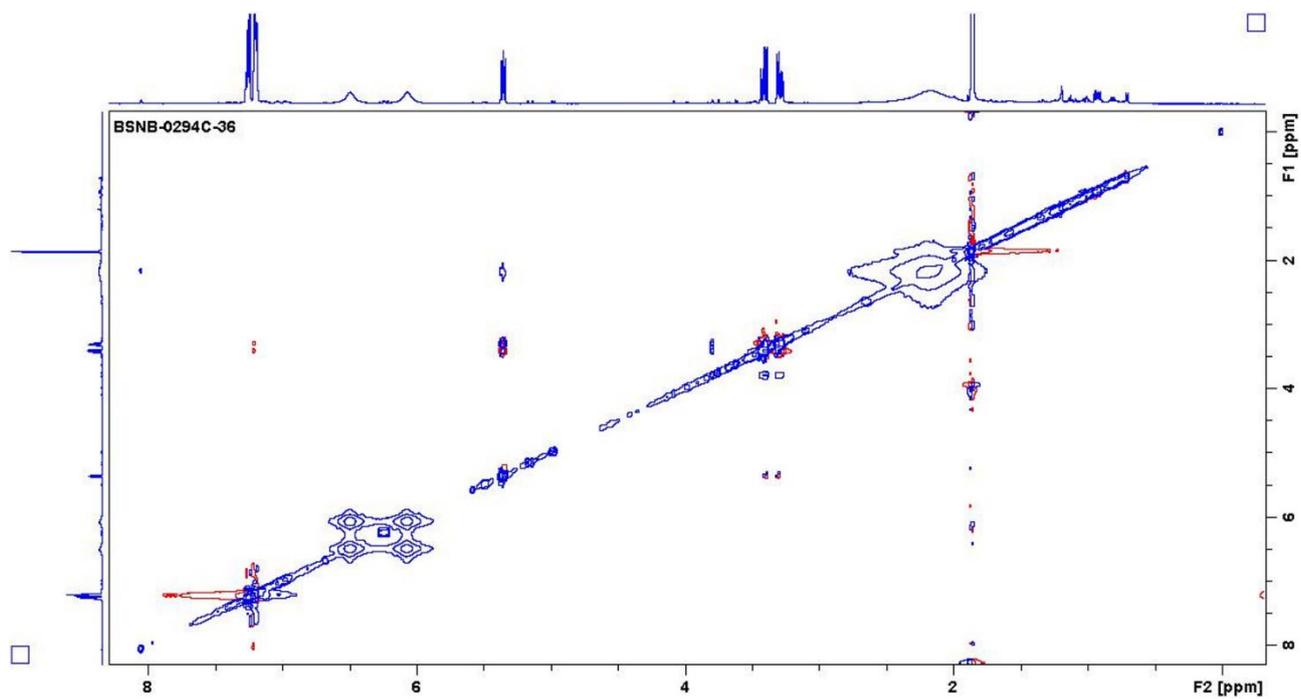


RMN- $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

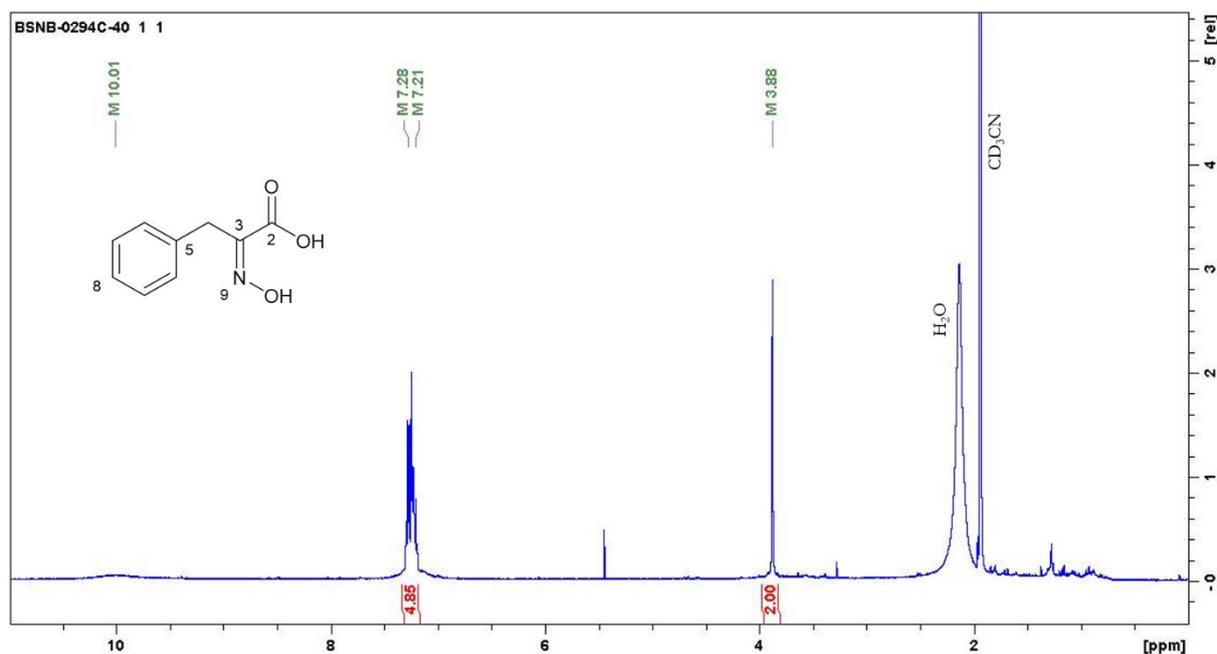
NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )



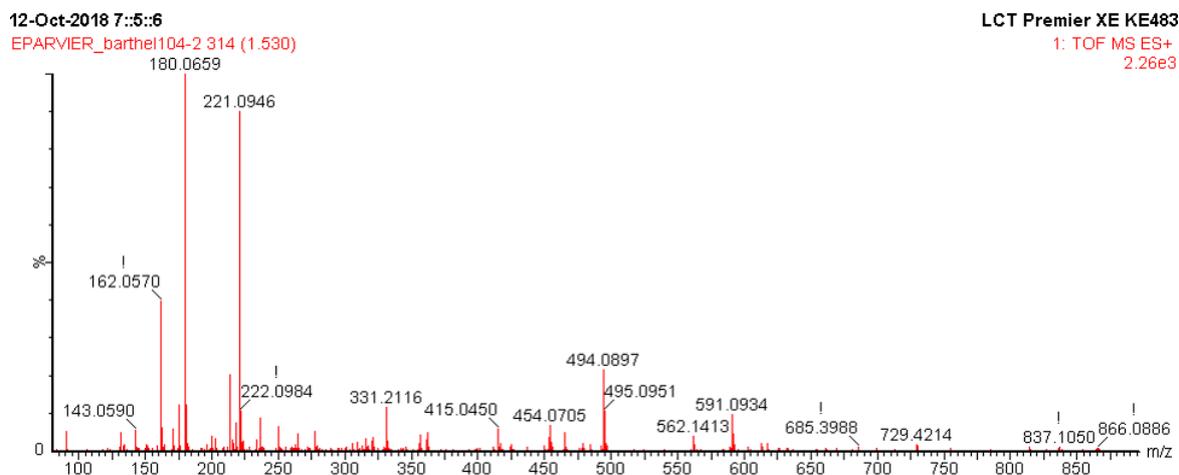
Annexe 71 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de l'acide 2-(hydroxyimino)-3-phénylpropanoïque (**32**).

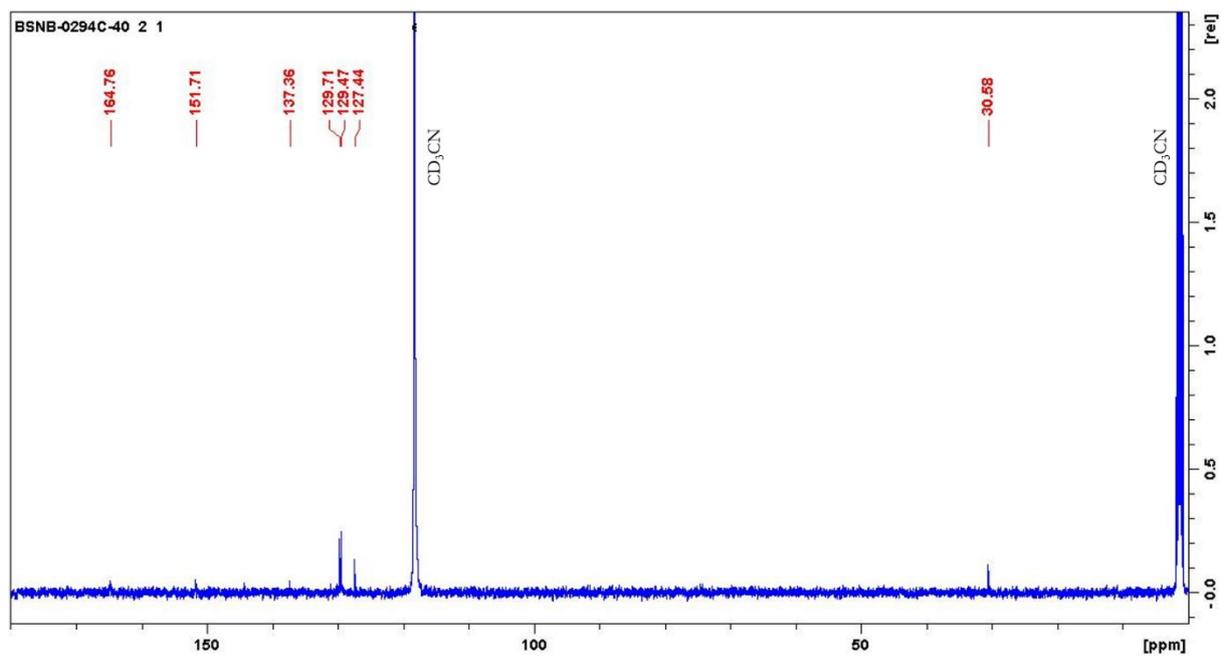
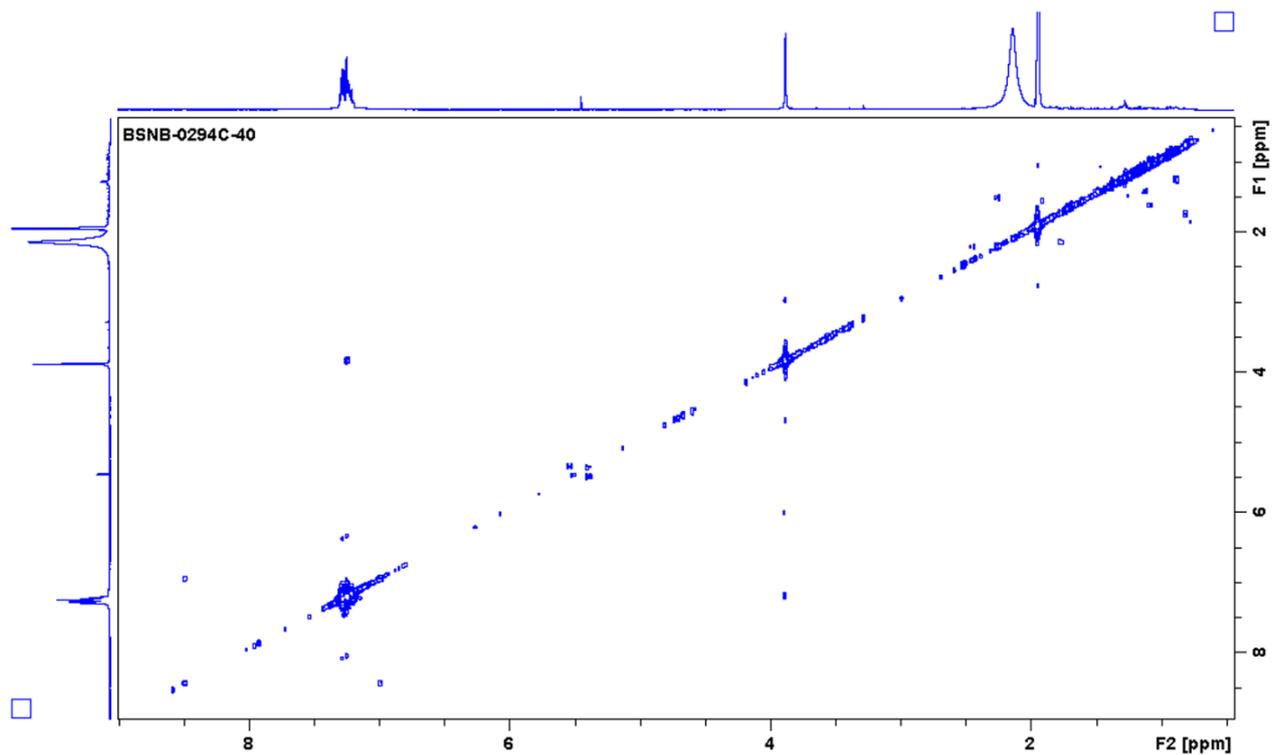
Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, J (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	$^{15}\text{N}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ )
1	-	-	-	-	-	-
2	-	164,8	-	-	-	-
3	-	151,7	-	-	-	-
4	3,88 (2H, s)	30,6	-	H-4	C-2, C-3, C-5, C-6	-
5	-	137,4	-	-	-	-
6	7,28 (2H, m)	129,7	-	H-7	C-4, C-6, C-8	-
7	7,29 (2H, m)	129,5	-	-	C-5, C-7	-
8	7,21 (1H, m)	127,4	-	-	C-6	-
9-OH	-	-	-	-	-	-

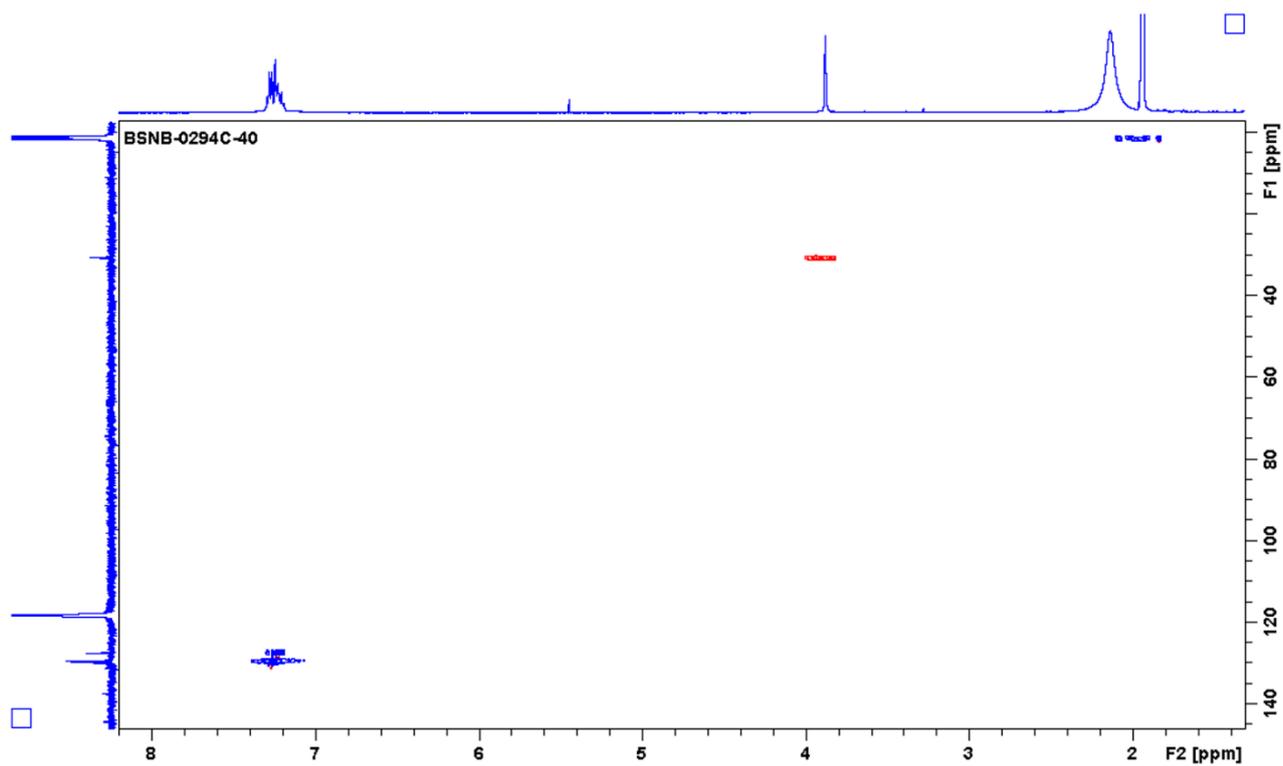
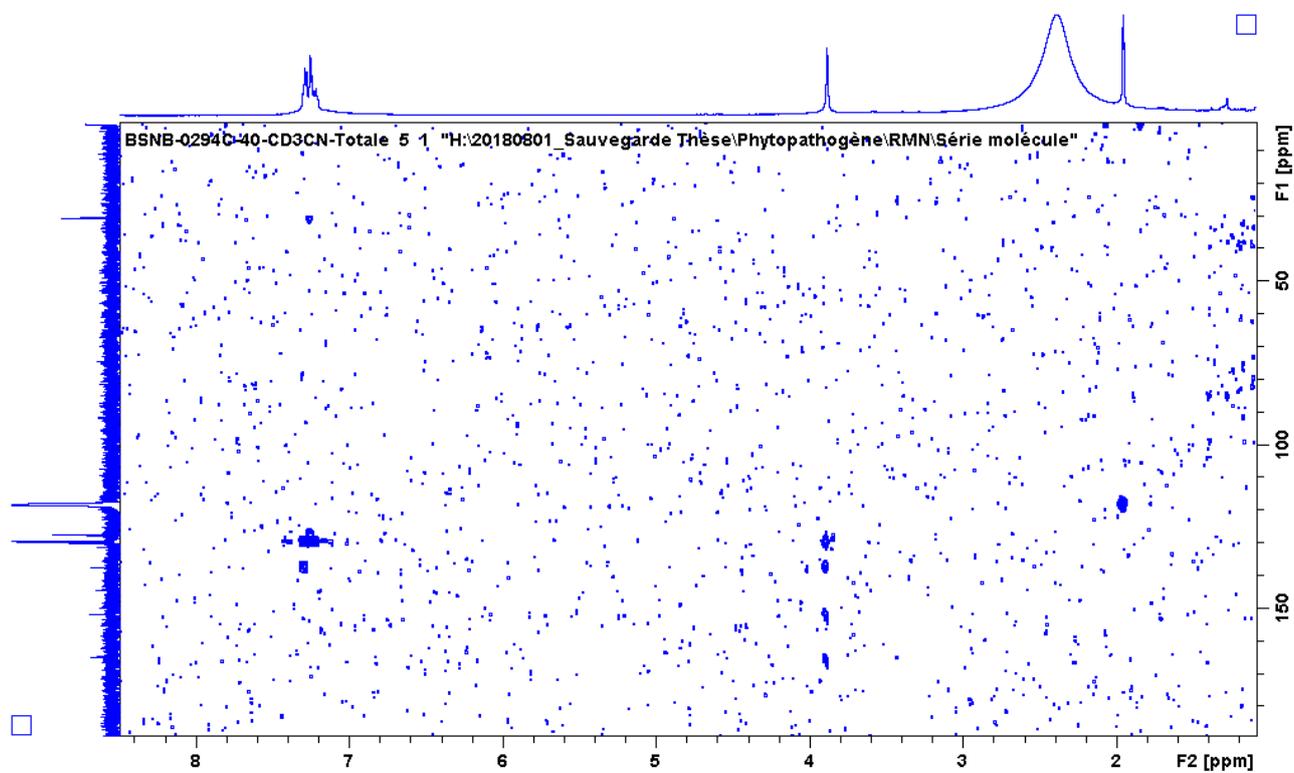
### RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ )



### Spectre de masse haute résolution



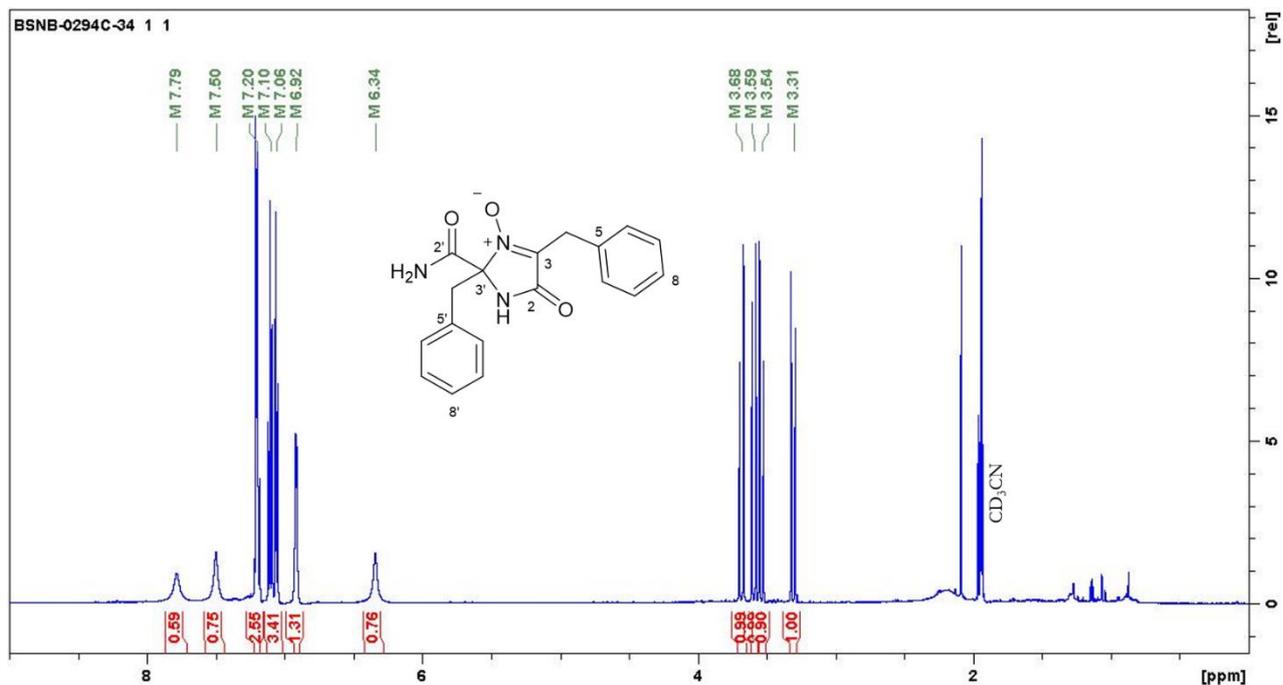
RMN- $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

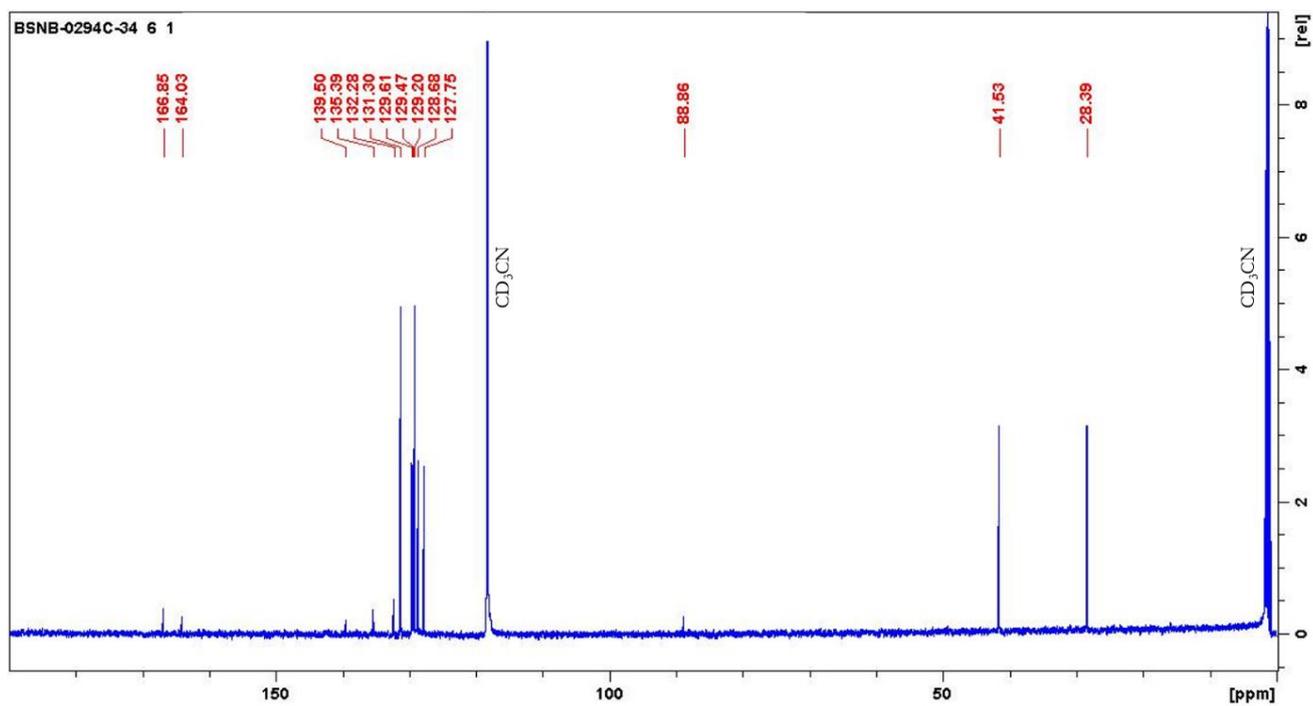
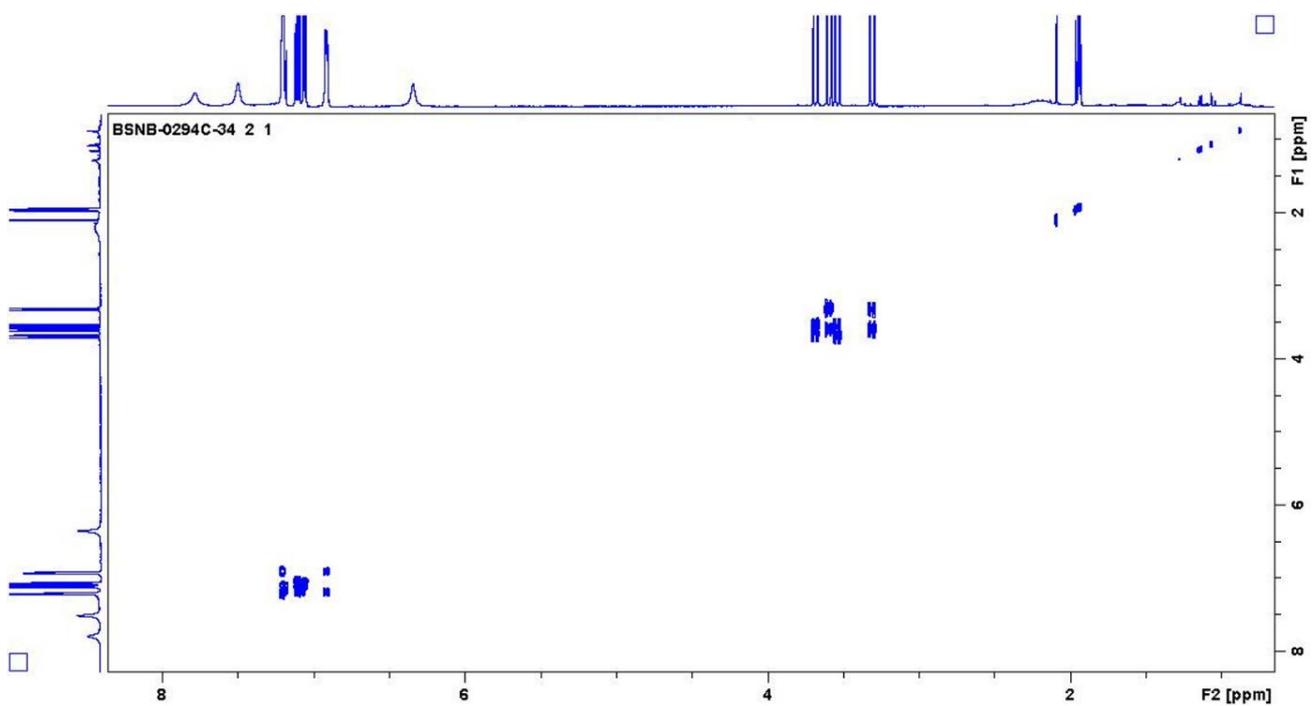
HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

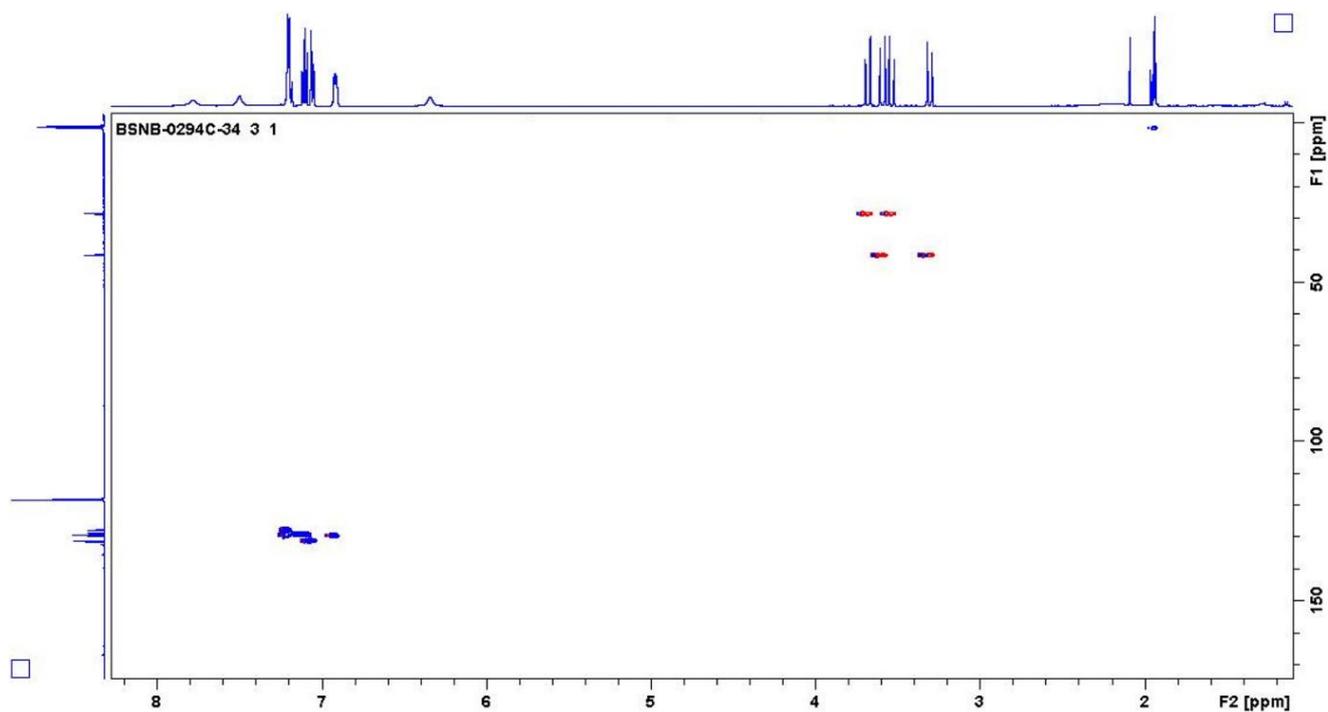
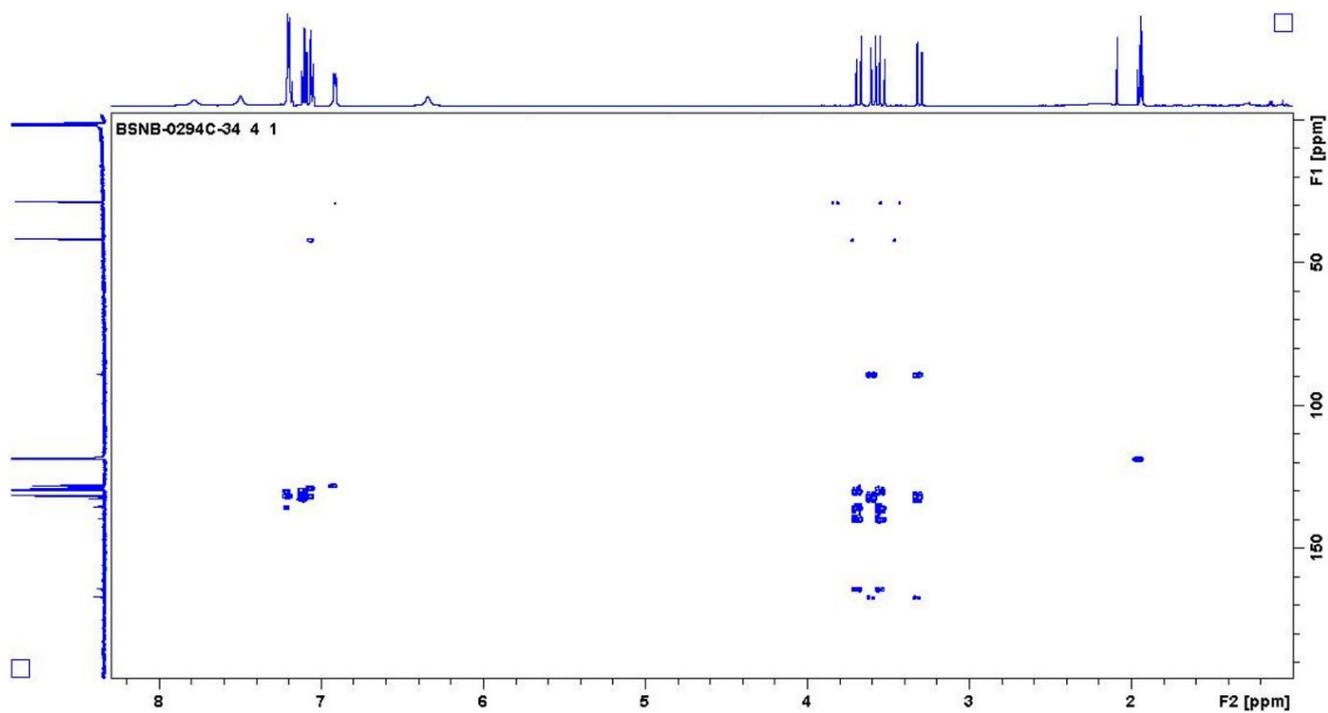
Annexe 72 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2,4-dibenzyl-2-carbamoyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole 3-oxide (**33**).

Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, <i>J</i> (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	$^{15}\text{N}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ )
1	7,79 (1H, br s)	-	113,9			
2	-	164,0				
3	-	139,5				
4	3,68 (1H, d, <i>J</i> = 14.6) 3,54 (1H, d, <i>J</i> = 14.8)	28,4		H-4	C-2, C-3, C-5, C-6, C-10	N-1, N-9
5	-	135,4				
6	6,92 (2H, m)	129,5		H-7	C-4, C-8	
7	7,20 (2H, m)	129,6			C-5, C-9	
8	7,20 (1H, m)	127,8				
9	-	-	304,7			
1'	7,50 (1H, br s) 6,34 (1H, br s)		96,7			N-1'
2'	-	166,8				
3'	-	88,9				
4'	3,59 (1H, d, <i>J</i> = 14.4) 3,31 (1H, d, <i>J</i> = 14.5)	41,5		H-4'	C-2', C-3', C-5', C-6'	N-9
5'	-	132,3				
6'	7,06 (2H, m)	131,3			C-4', C-6', C-8'	
7'	7,10 (2H, m)	129,2			C-5', C-7'	
8'	7,20 (1H, m)	128,7				

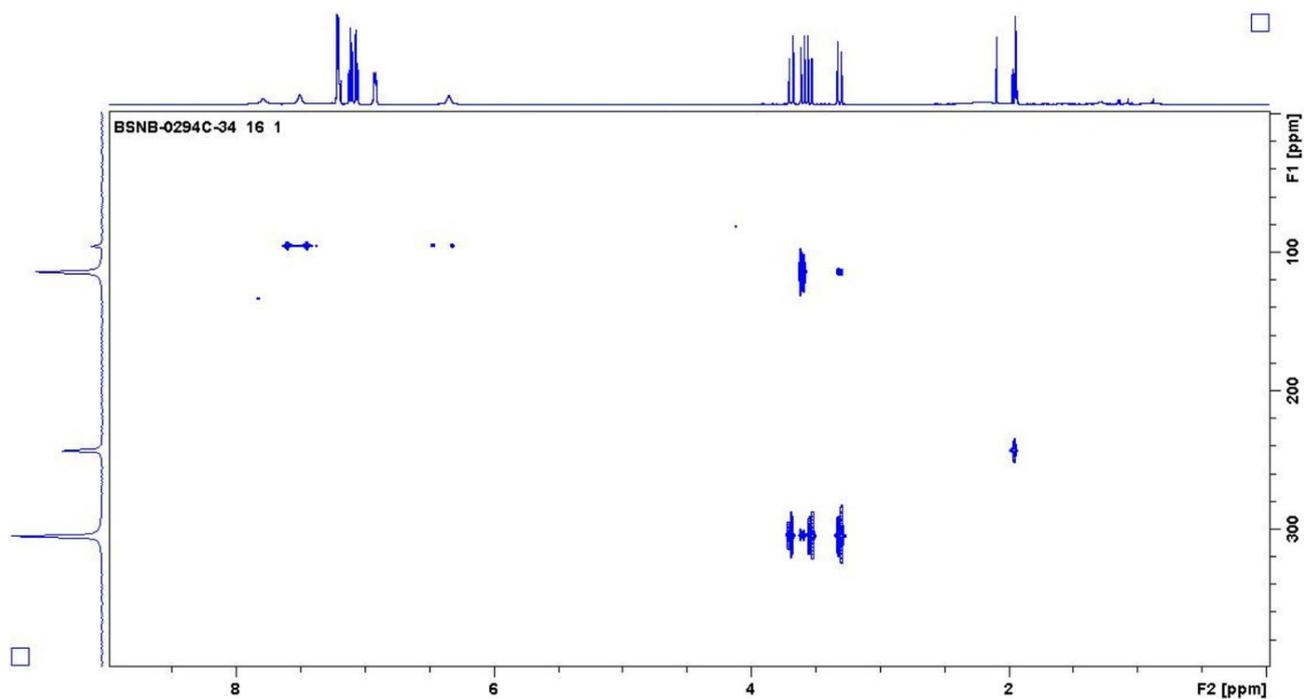
### RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ )



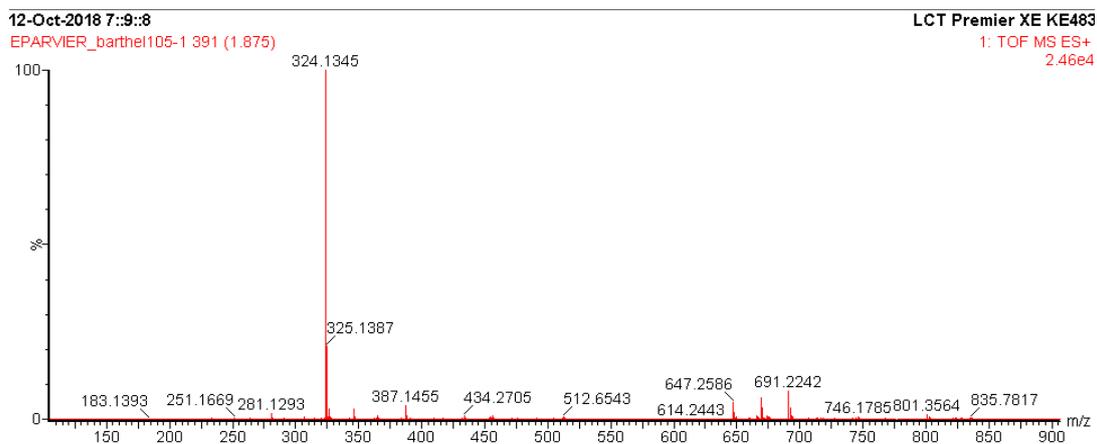
RMN- $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )



HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

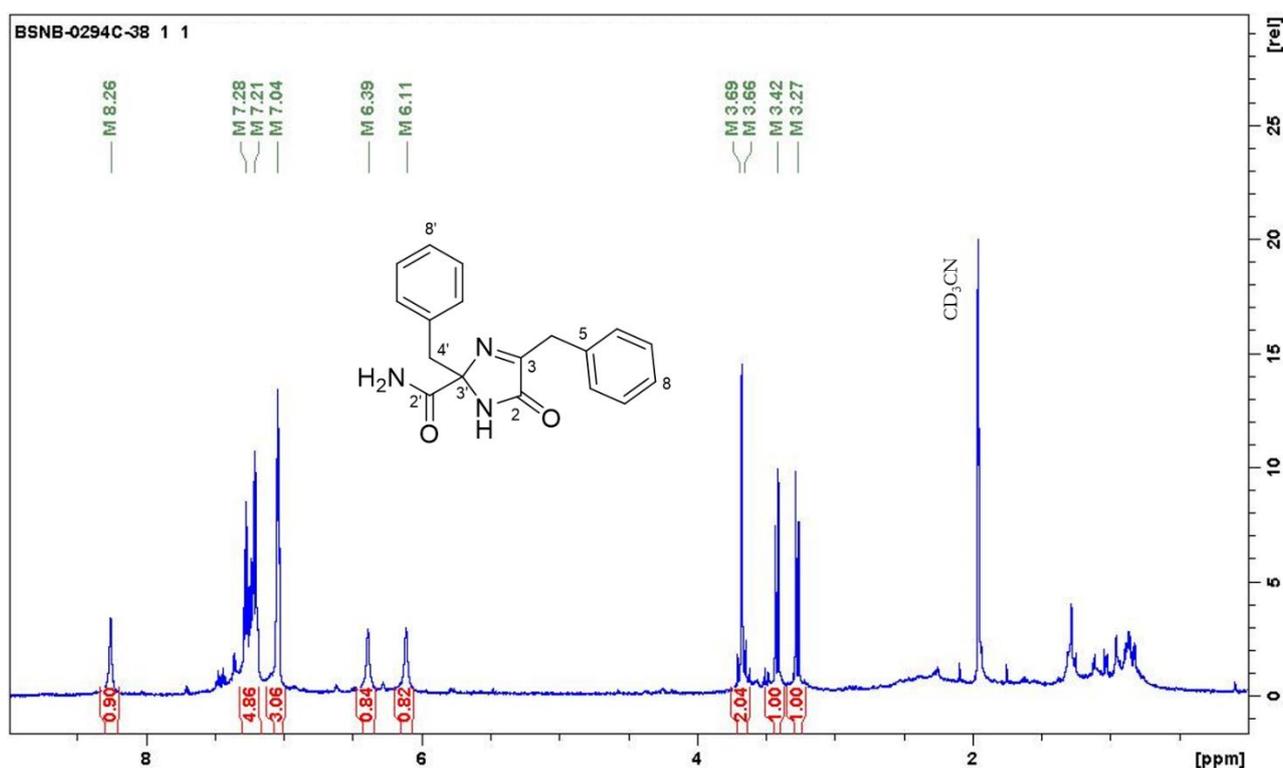
## Spectre de masse haute résolution

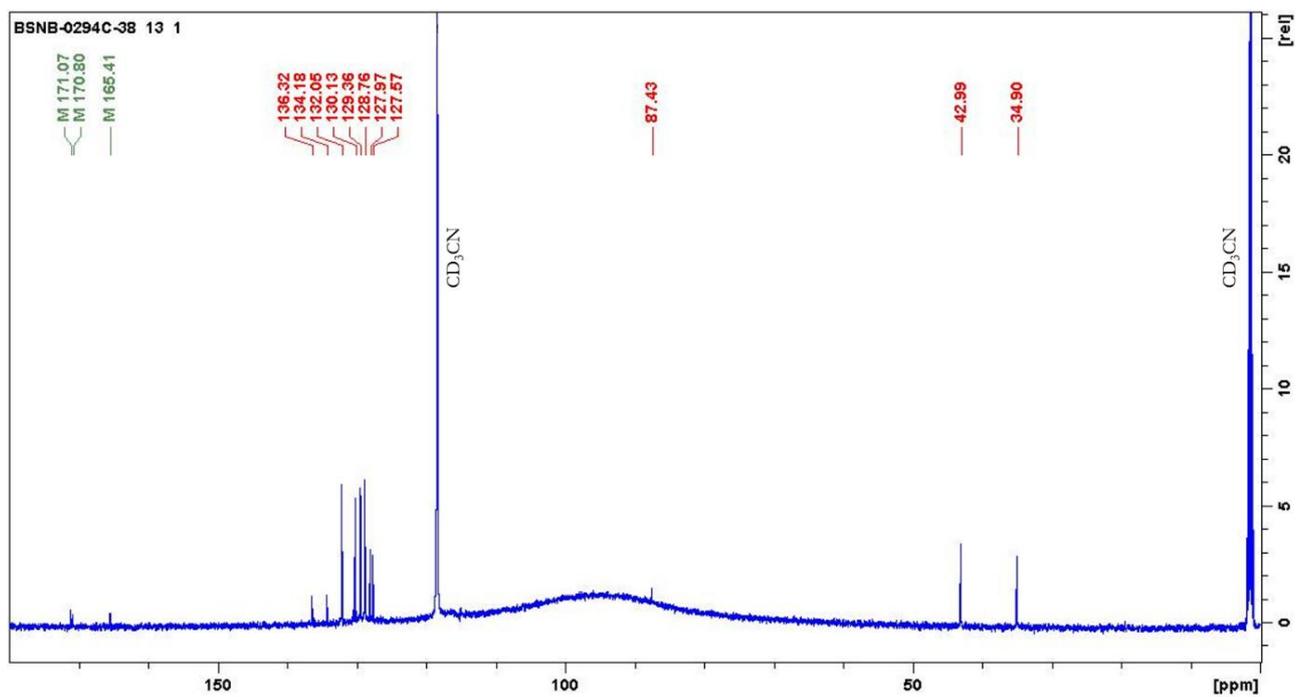
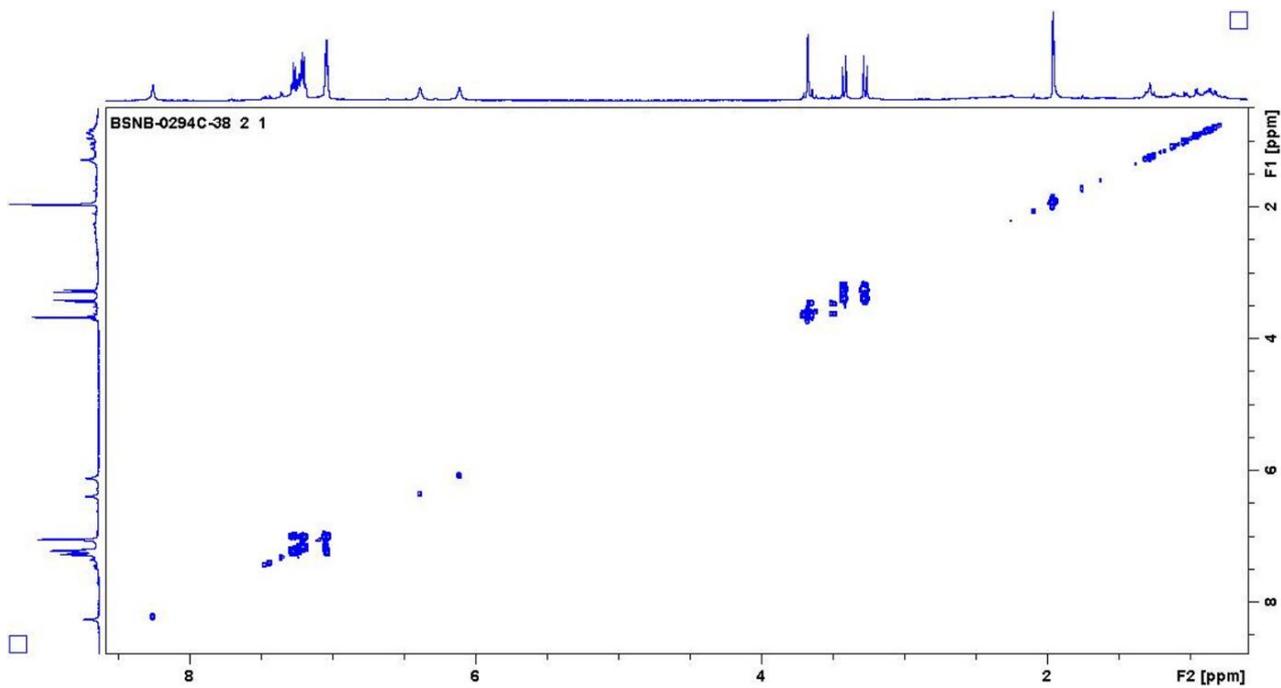


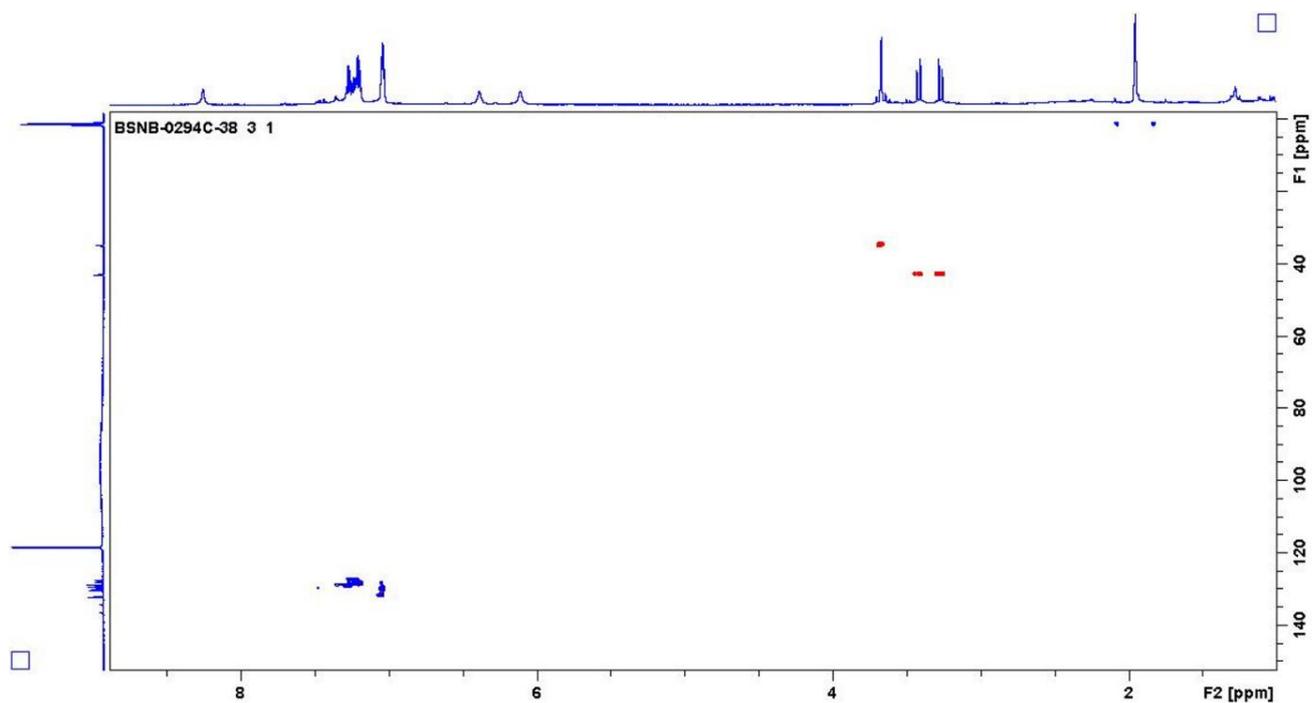
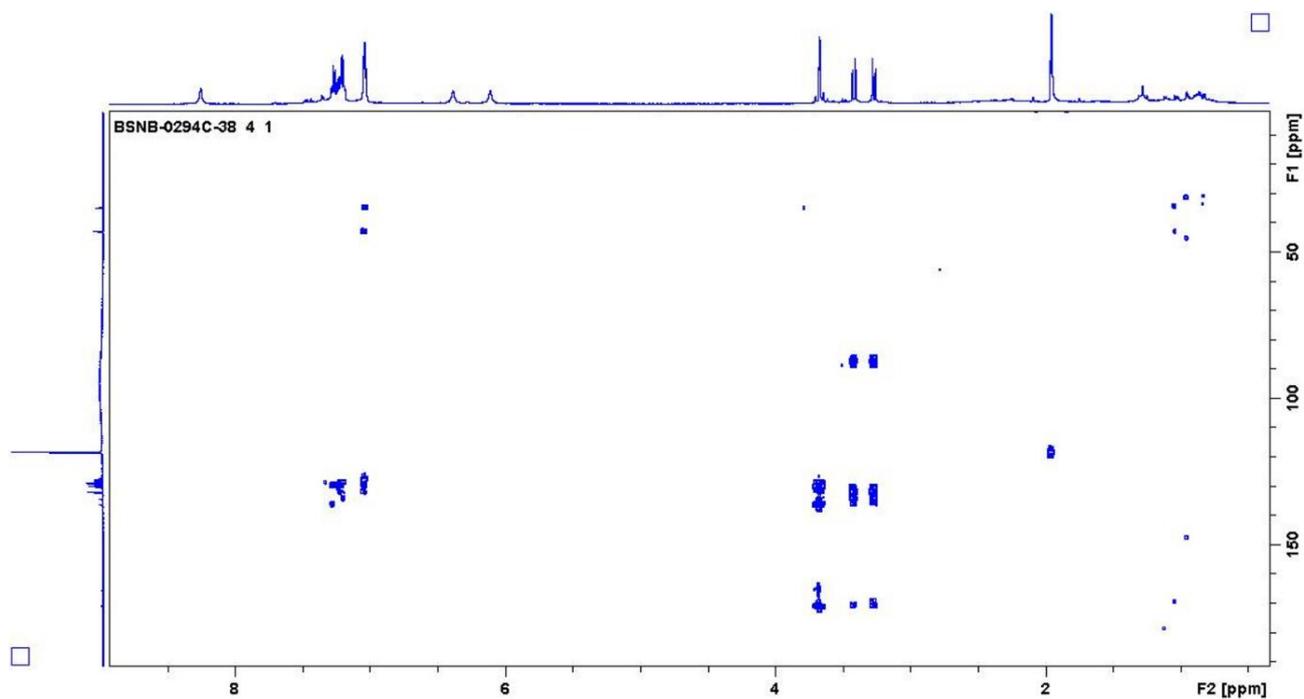
Annexe 73 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2,4-dibenzyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole-2-carboxamide (**34**).

Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, <i>J</i> (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	$^{15}\text{N}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}$ )	NOESY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )
1	8,26 (1H, br s)	-	136,0				
2	-	171,1					
3	-	165,4					
4	3,69 (1H, d, <i>J</i> = 15,7) 3,66 (1H, d, <i>J</i> = 15,9)	34,9		H-4	C-2, C-3, C-5, C-6	N-1, N-9	H-6, H-1
5		136,3					
6	7,04 (2H, m)	130,1		H-7	C-4, C-8, C-6		H-4
7	7,28 (2H, m)	129,4		H-6	C-5, C-7		
8	7,24 (2H, m)	127,6					
9	-	-	136,7				
1'	6,39 (1H, br s) 6,11 (1H, br s)		99,5			N-1'	
2'	-	170,8					
3'	-	87,4					
4'	3,42 (1H, d, <i>J</i> = 13,8) 3,27 (1H, d, <i>J</i> = 13,7)	43,0		H-4'	C-2', C-3', C-5', C-6'	N-11	H-6'
5'		134,2					
6'	7,05 (2H, m)	132,0		H-7'	C-4', C-8', C-6'		H-4'
7'	7,19 (2H, m)	128,8		H-6'	C-5', C-7'		
8'	7,22 (2H, m)	128,0					

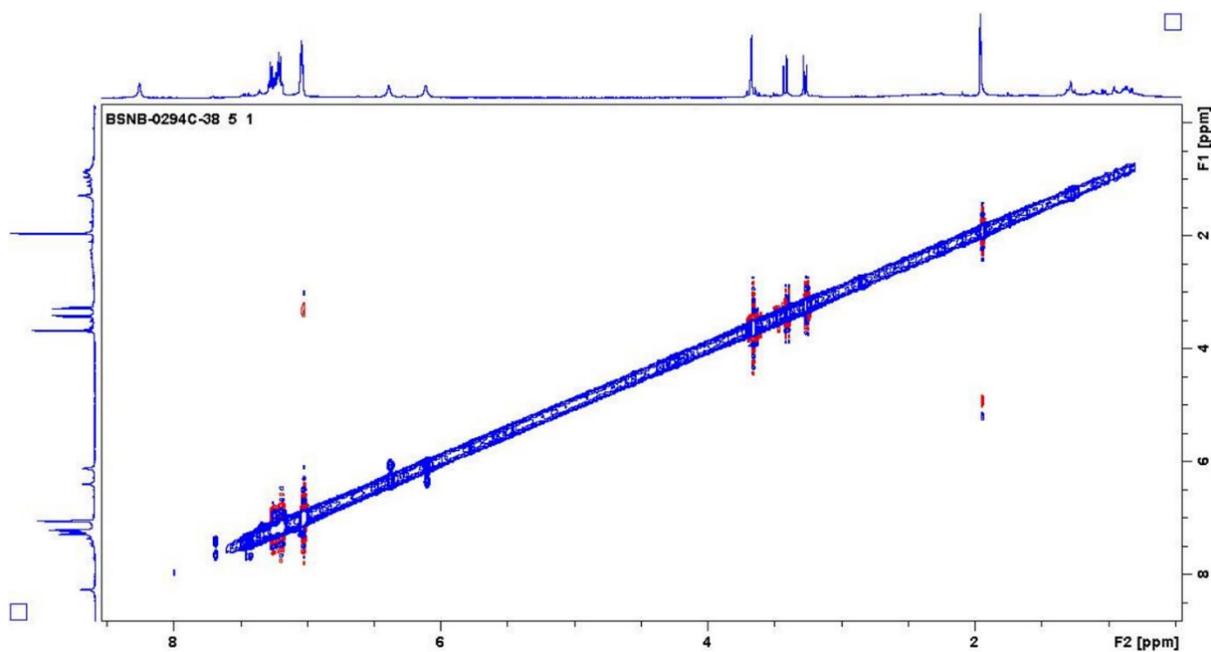
### RMN- $^1\text{H}$ (600 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ )



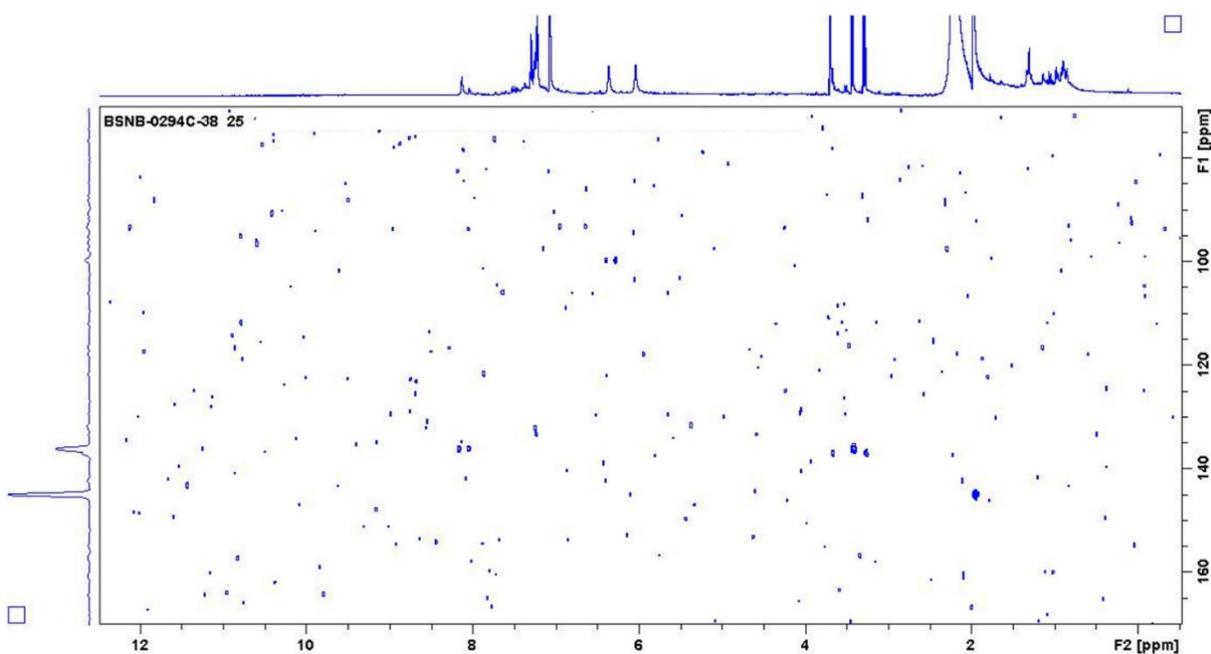
RMN-<sup>13</sup>C (600 MHz, CD<sub>3</sub>CN)COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (600 MHz, CD<sub>3</sub>CN)

HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

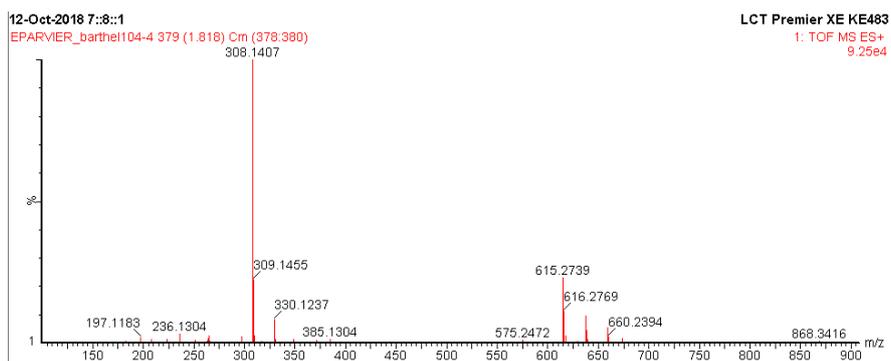
NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )



HMBC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )



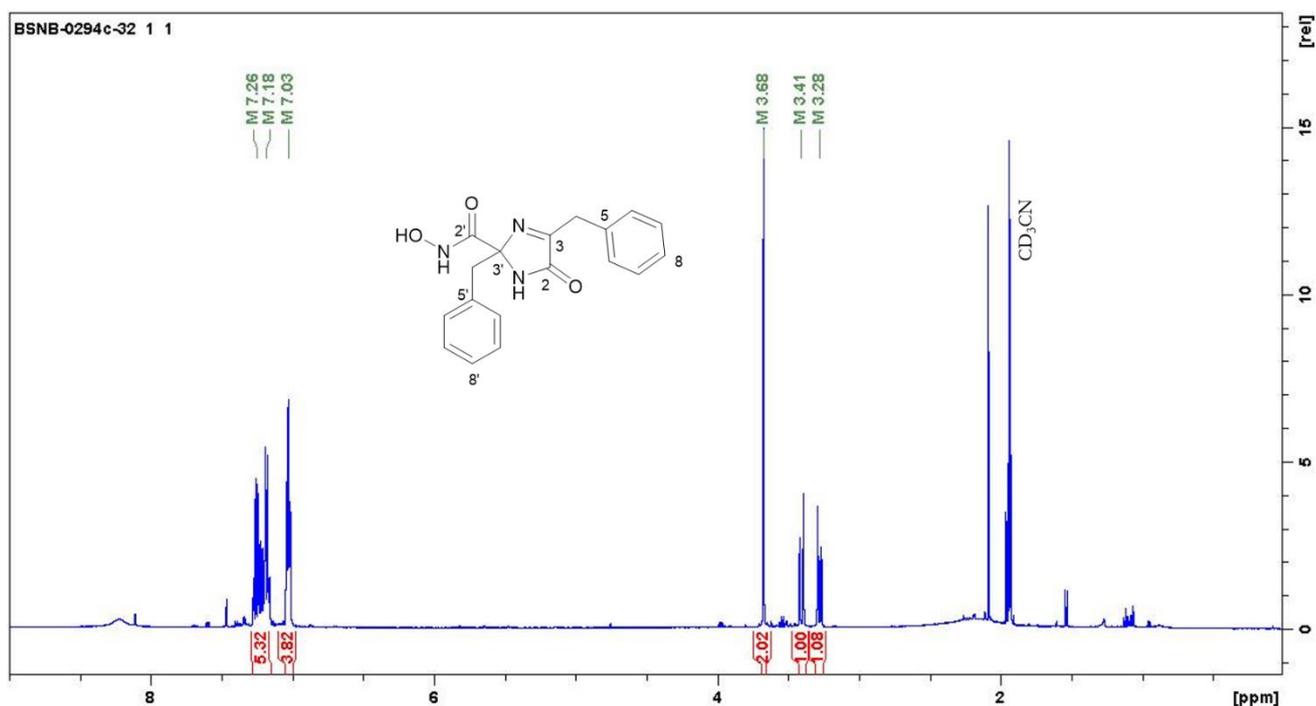
Spectre de masse haute résolution

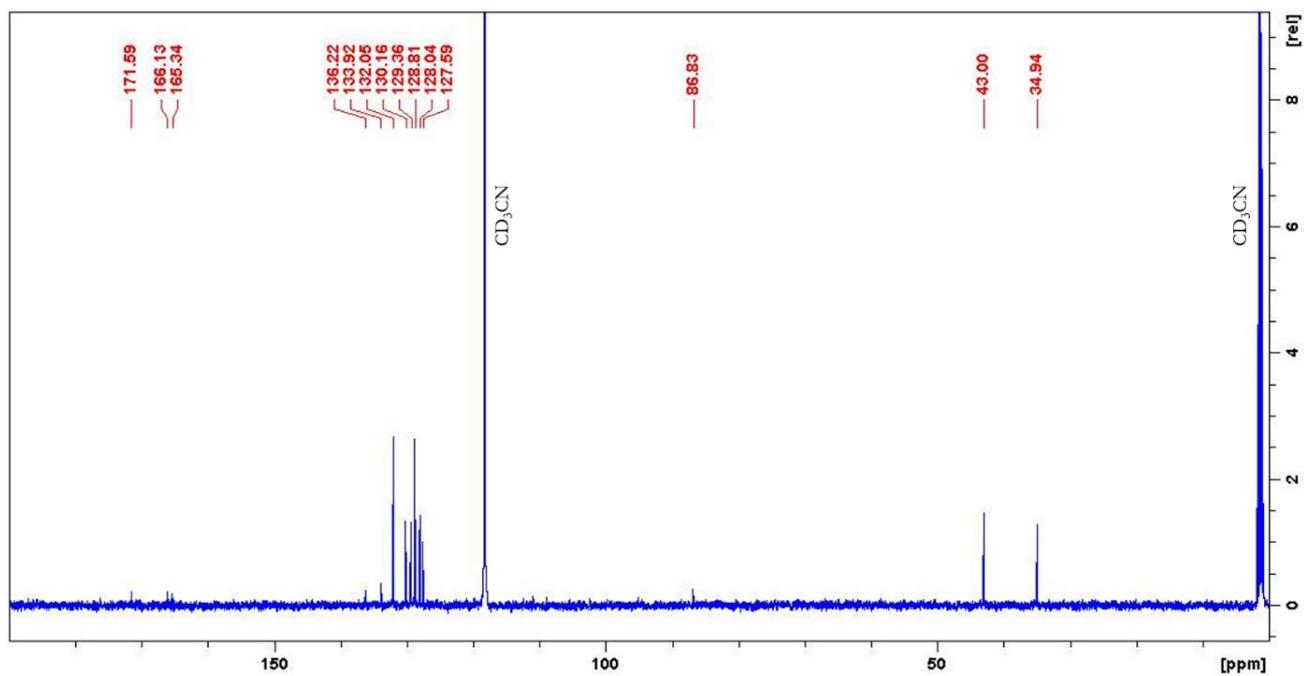
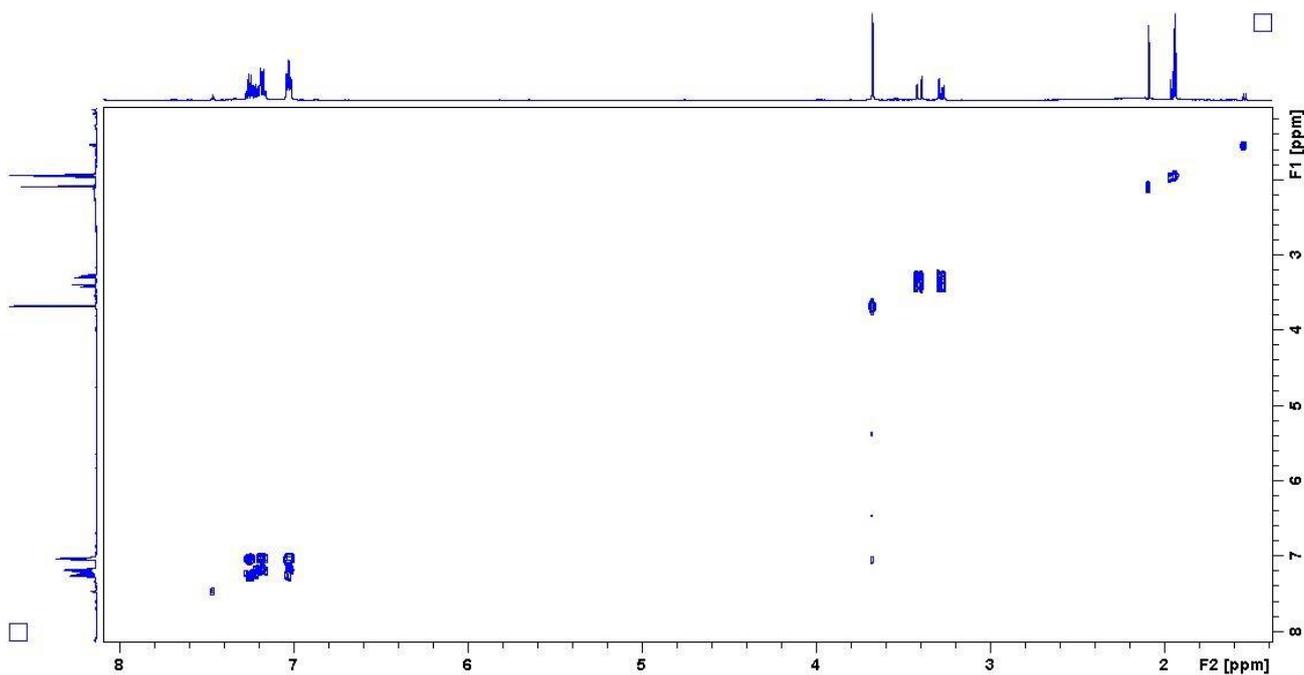


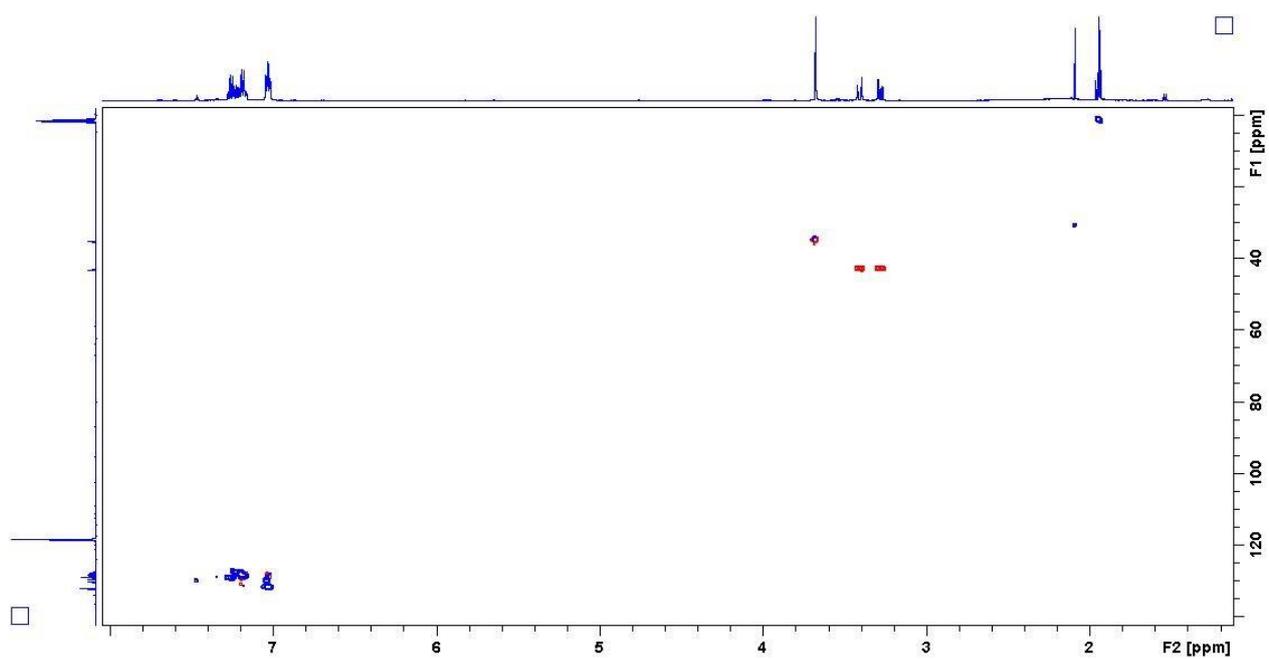
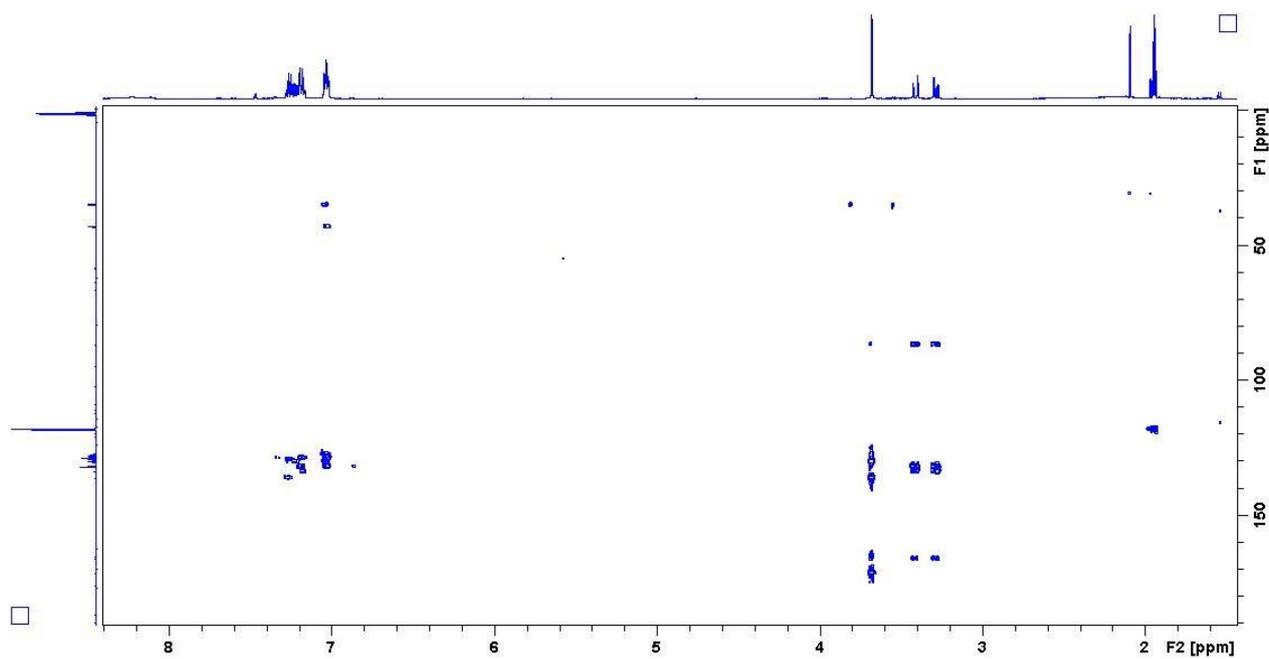
Annexe 74 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC) et spectre de masse en haute résolution de la 2,4-dibenzyl-*N*-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-imidazole-2-carboxamide (**35**).

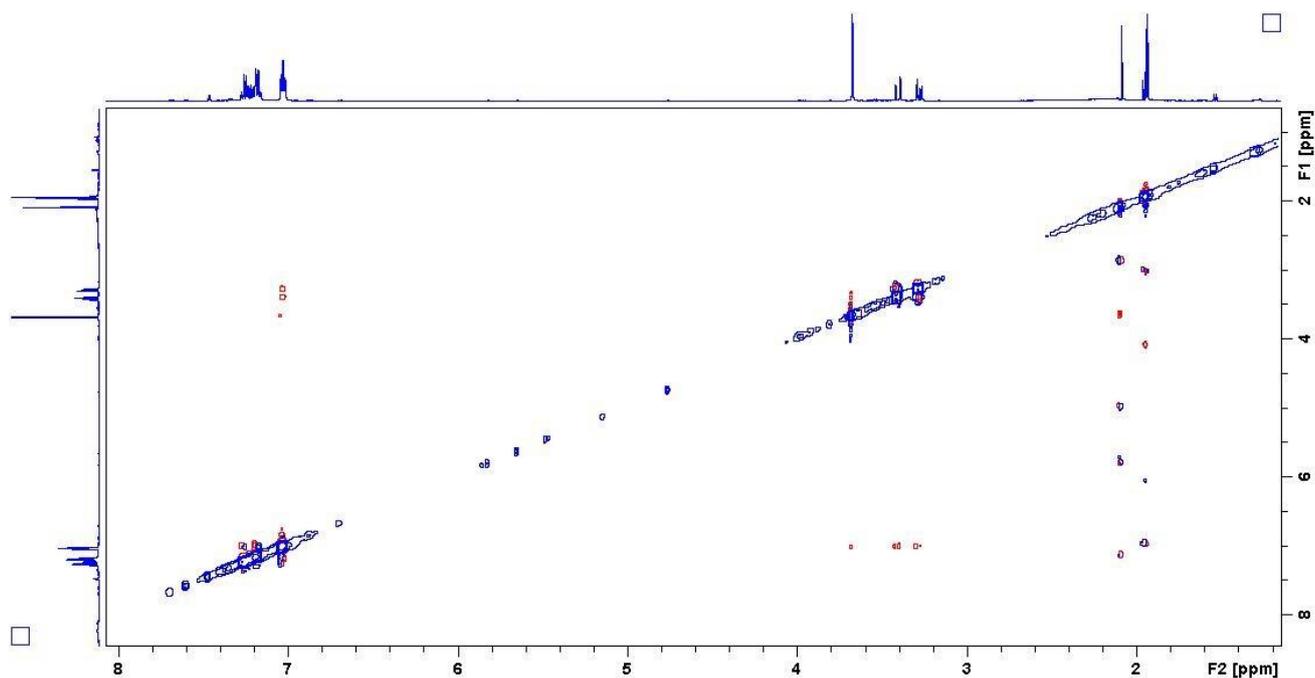
Position	$^1\text{H}$ : $\delta$ (ppm) (multiplicité, $J$ (Hz))	$^{13}\text{C}$ : $\delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	NOESY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )
1					
2		171,6			
3		165,3			
4	3,68 (2H, s)	34,9		C-2, C-3, C-5, C-6	H-6
5		136,2			
6	7,04 (2H, m)	130,2	H-7	C-4, C-8, C-6	H-4
7	7,26 (2H, m)	129,4	H-6	C-7	
8	7h23 (2H, m)	127,6		C-6	
9					
1'-OH					
1'					
2'		166,1			
3'		86,8			
4'	3,41 (1H, d, $J = 13,4$ ) 3,28 (1H, d, $J = 13,5$ )	43,0	H-4'	C-2', C-3', C-5', C-6'	H-6'
5'		133,9			
6'	7,03 (2H, m)	132,0	H-7'	C-4', C-8', C-6'	H-4'
7'	7,18 (2H, m)	128,8	H-6'	C-7'	
8'	7,21 (2H, m)	128,0			

### RMN- $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{CN}$ )



RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)

HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )

## Spectre de masse haute résolution

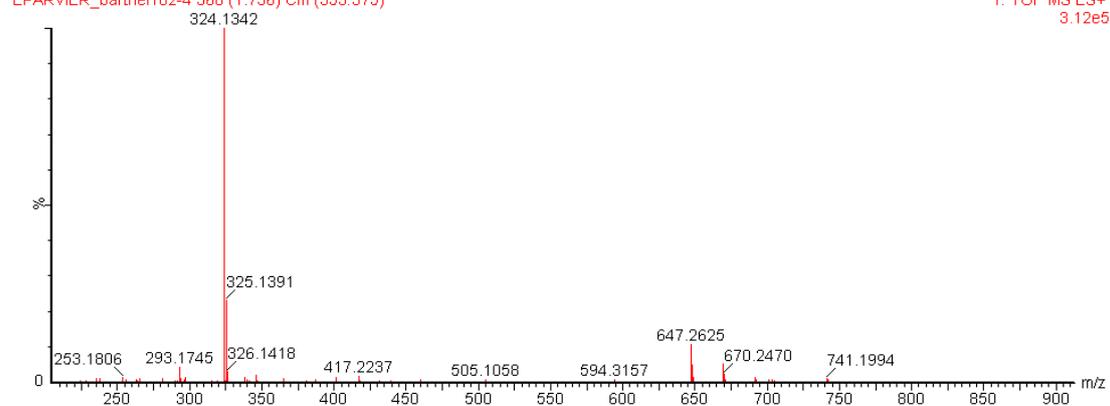
12-Oct-2018 3::5::4

EPARVIER\_barthe102-4 360 (1.736) Cm (353:375)

LCT Premier XE KE483

1: TOF MS ES+

3.12e5

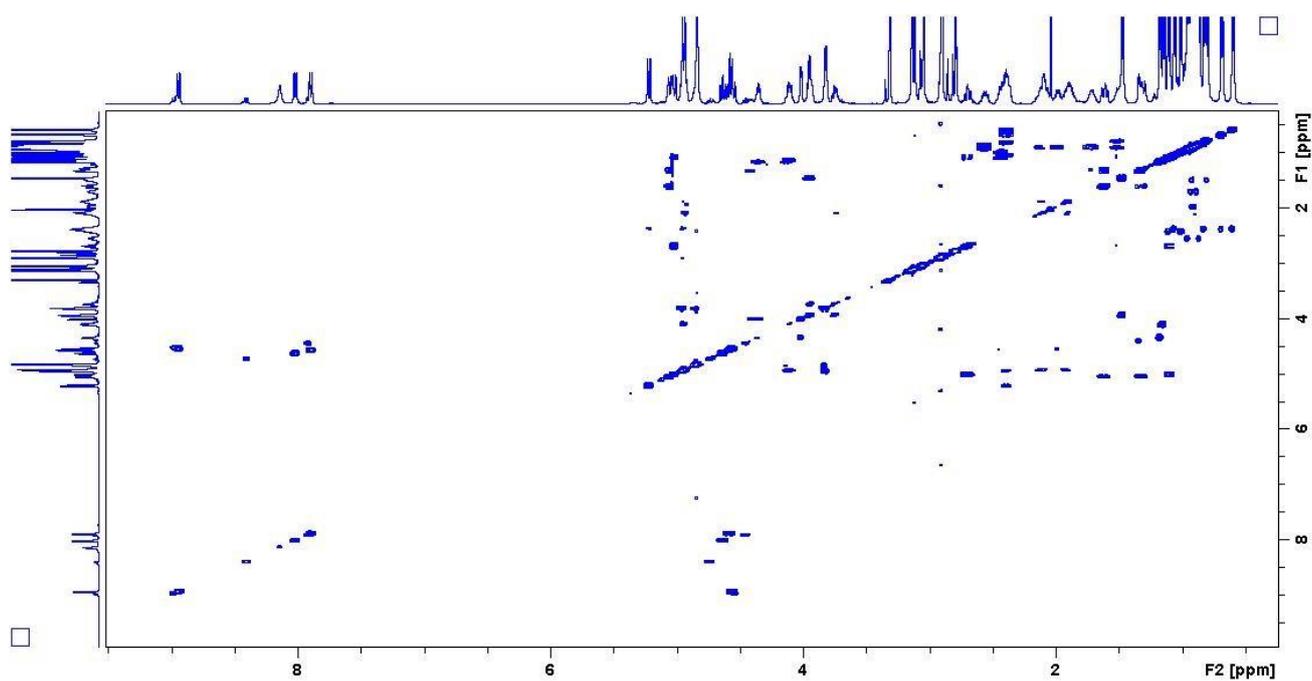
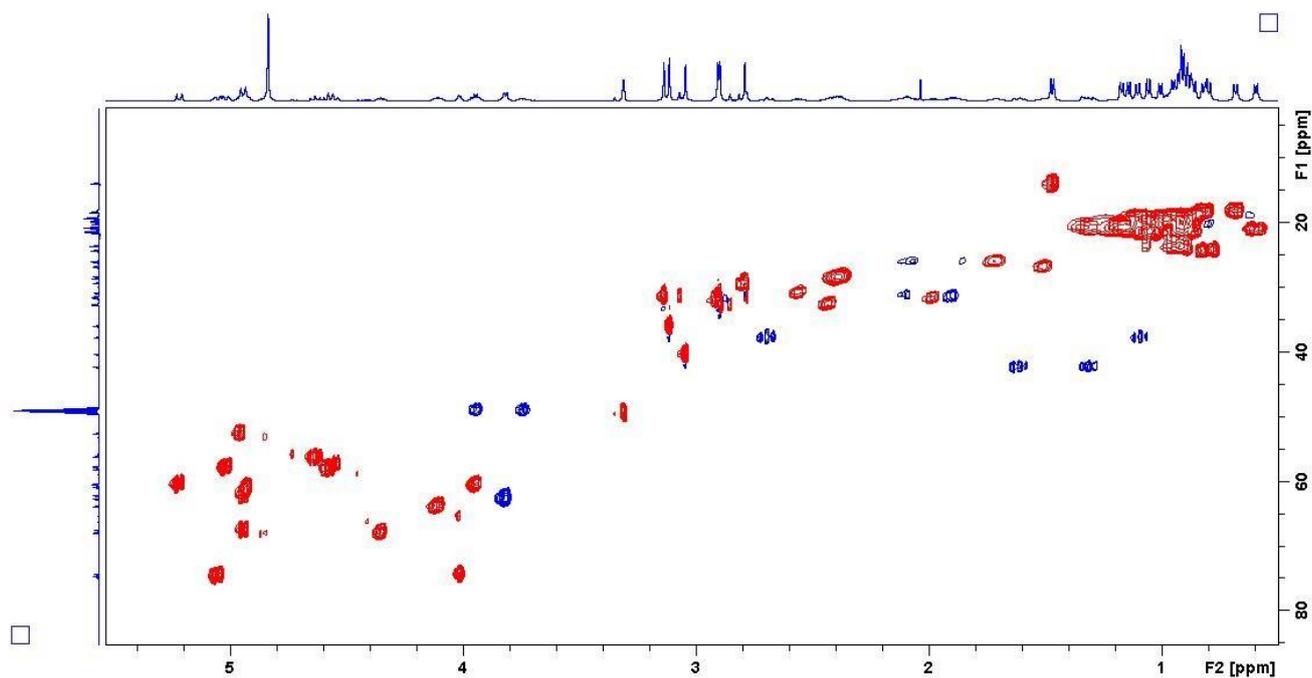


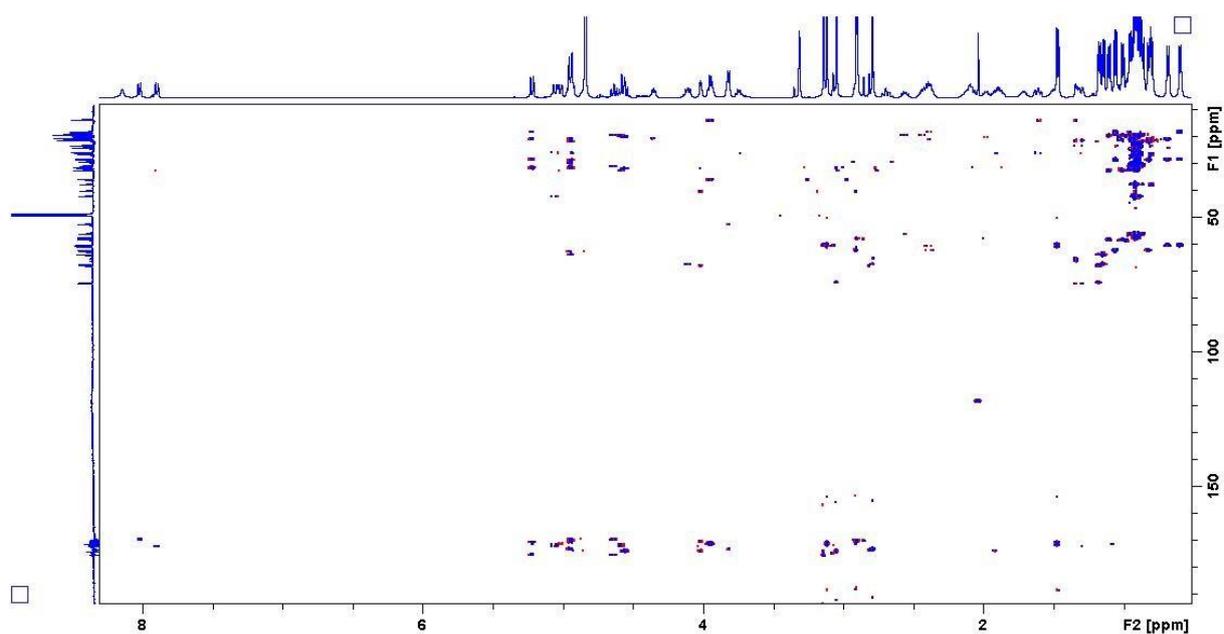
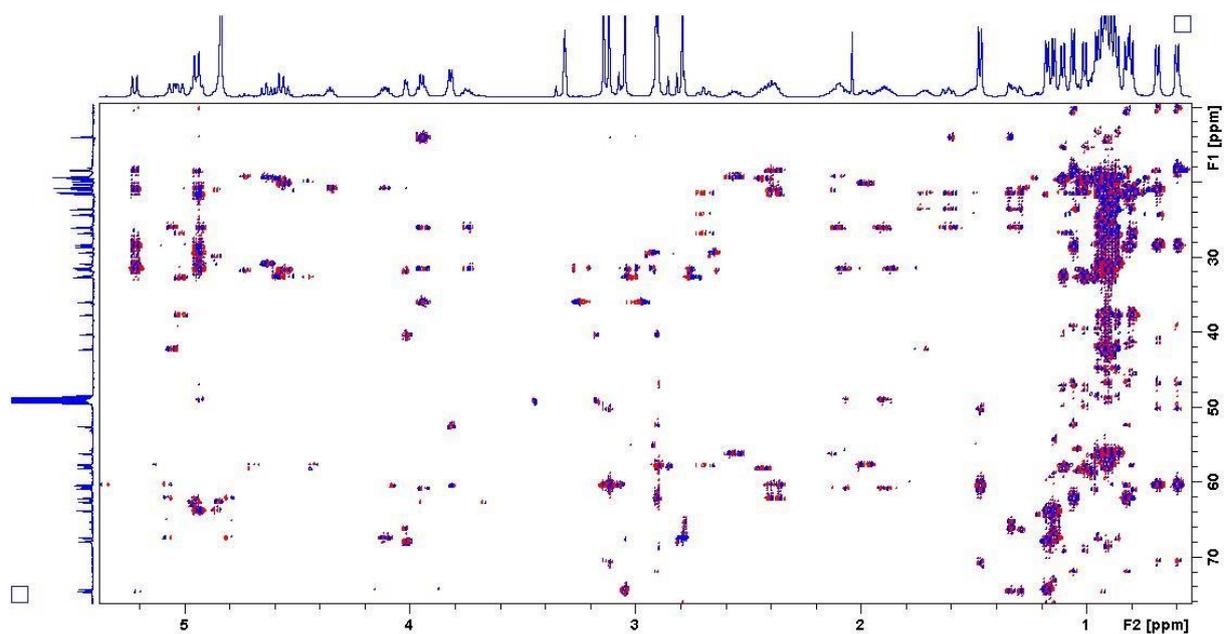
Annexe 75 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC), spectre de masse en haute résolution et spectre de fragmentation de la xylériacéine A (36).

Position	$^1\text{H} : \delta$ (ppm) (multiplicité, $J$ (Hz))	$^{13}\text{C} : \delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	NOESY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )
<i>Acide leucique</i>					
1	-	172,2	-	-	-
2	5,05 (1H, dd, $J = 11,5, 2,1$ )	74,6	H-3	C-1, C-1 (NMe)A	H-3, H-4, H-6
3	1,61 (1H, m) 1,32 (1H, m)	42,3	H-5, H-3, H-4 H-2, H-3	C-1, C-2, C-4, C-5, C-6	H-2, H-3 H-3
4	1,71 (1H, m)	26,1	H-3, H-5, H-6	C-2, C-3, C-5, C-6	H-2, H-3
5	0,92 (3H, m)	23,6	H-4	C-3, C-4, C-6	H-3, H-4
6	0,88 (3H, d, $J = 6,9$ )	21,6	H-4	C-3, C-4, C-5	H-3, H-4
<i>N-Méthylalanine</i>					
1	-	171,3	-	-	-
2	3,95 (1H, q, $J = 6,7$ )	60,5	H-3	C-1, C-3, N-CH <sub>3</sub>	H-3, N-CH <sub>3</sub>
3	1,47 (3H, d, $J = 6,7$ )	14,0	H-2	C-1, C-2	H-3, N-CH <sub>3</sub>
N-CH <sub>3</sub>	3,11 (3H, s)	36,0	-	C-1, C-2	H-2, H-3, H-2 (NMe)L
<i>N-Méthylleucine</i>					
1	-	171,3	-	-	-
2	5,01 (1H, dd, $J = 11,4, 2,0$ )	57,7	H-3	C-1, C-3, C-4, N-CH <sub>3</sub> , C-1 (NMe)V1	H-3, H-4, N-CH <sub>3</sub> (NMe)A
3	2,69 (1H, td, $J = 12,3, 2,4$ ) 1,09 (1H, m)	37,7	H-3 H-3, H-4	C-2, C-4, C-5, C-6	H-2, H-3, H-4, H-6
4	1,50 (1H, m)	26,8	H-3, H-5, H-6	C-3, C-5, C-6	H-2, H-3
5	0,80 (3H, d, $J = 6,6$ )	24,4	H-4	C-3, C-4, C-6	H-3, H-4
6	0,92 (3H, m)	21,4	H-4	C-3, C-4, C-5	
N-CH <sub>3</sub>	2,90 (3H, s)	32,7	-	C-2, C-1 (NMe)V1	
<i>N-Méthylvaline 1</i>					
1	-	170,2	-	-	-
2	4,94 (1H, m)	62,1	H-3	C-3, C-4, C-5	H-4, N-CH <sub>3</sub>
3	2,38 (1H, m)	28,6	H-2, H-4, H-5	C-1, C-2, C-4, C-5	H-2, N-CH <sub>3</sub>
4	1,06 (3H, d, $J = 6,6$ )	21,6	H-3	C-2, C-3, C-5	H-3
5	0,82 (3H, d, $J = 6,9$ )	18,5	H-3	C-2, C-3, C-4	H-3, H-4
N-CH <sub>3</sub>	2,91 (3H, s)	31,6	-	C-2, C-1 (NMe)V2	
<i>N-Méthylvaline 2</i>					
1	-	170,8	-	-	-
2	5,22 (1H, d, $J = 10,8$ )	60,3	H-3	C-1, C-3, C-4, C-5, N-CH <sub>3</sub> , C-1 V1	
3	2,38 (1H, m)	28,3	H-2, H-4, H-5	C-1, C-2, C-4, C-5	H-2, H-4, H-5, N-CH <sub>3</sub>
4	0,68 (3H, d, $J = 7,0$ )	18,4	H-3	C-2, C-3, C-5	H-3
5	0,60 (3H, d, $J = 6,5$ )	21,0	H-3	C-2, C-3, C-4	H-3
N-CH <sub>3</sub>	3,14 (3H, s)	31,5	-	C-2, C-1 V1	
<i>Valine 1</i>					
1	-	175,5	-	-	-
2	4,63 (1H, t, $J = 10,1$ )	56,2	H-3	C-1, C-3, C-4, C-5, C-1 (NMe)T1	H-4, H-5, N-CH <sub>3</sub> (NMe)V2
3	2,56 (1H, dq, $J = 17,0, 6,7$ )	30,9	H-2, H-4, H-5	C-1, C-2, C-4, C-5	H-4
4	0,95 (3H, d, $J = 6,7$ )	19,4	H-3	C-2, C-3, C-5	H-2, H-3
5	0,86 (3H, d, $J = 6,7$ )	19,4	H-3	C-2, C-3, C-4	H-2, H-3

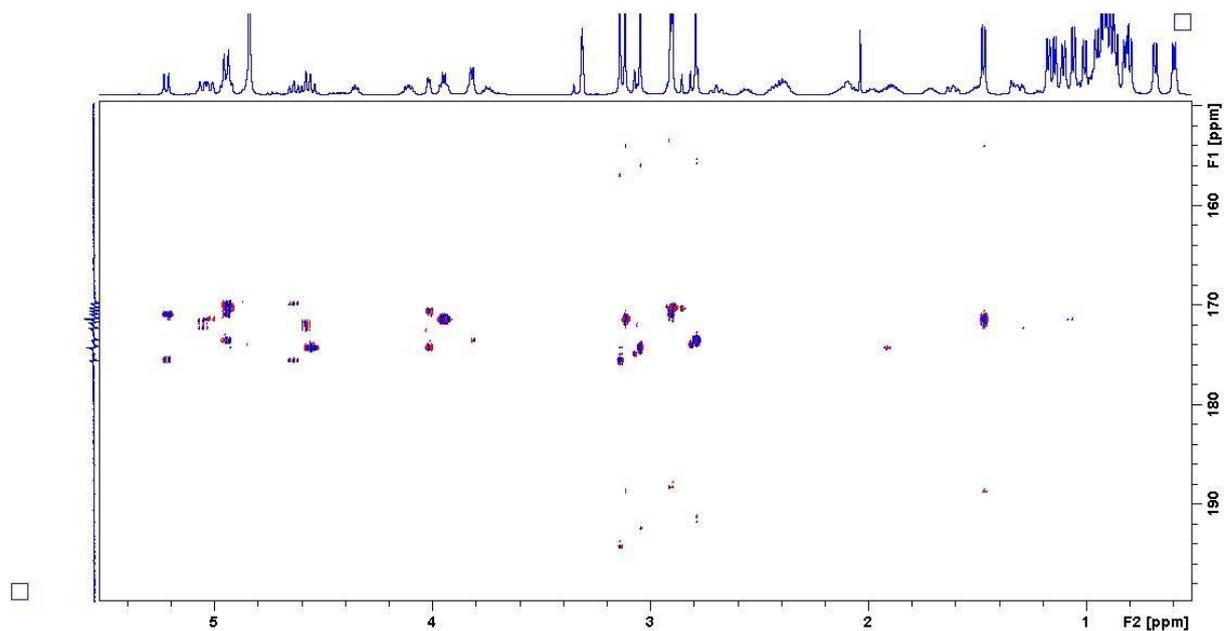
NH	8,02 (1H, d, $J = 9,3$ )	-	H-2	C-1 (NMe)T1	
<i>N</i> -Méthylthréonine 1					
1	-	169,8	-	-	-
2	4,94 (1H, m)	67,4	H-3	C-3, C-4, N-CH <sub>3</sub>	
3	4,11 (1H, qd, $J = 10,1, 5,9$ )	63,8	H-2, H-4	H-2, H-4	H-2, N-CH <sub>3</sub>
4	1,14 (3H, d, $J = 5,9$ )	20,8	H-3	H-2, H-3	
N-CH <sub>3</sub>	2,79 (3H, s)	29,4	-	C-2	
Serine					
1	-	173,4	-	-	-
2	4,96 (1H, m)	52,6	H-3	C-3	H-3
3	3,82 (2H, d, $J = 5,9$ )	62,7	H-2	C-1, C-2	H-2
NH	8,14 (1H, s)	-	-	-	-
<i>N</i> -Méthylthréonine 2					
1	-	170,5	-	-	-
2	4,01 (1H, d, $J = 4,7$ )	74,3	H-3	C-1, C-2, N-CH <sub>3</sub> , C-1 V2	
3	4,35 (1H, q, $J = 5,9$ )	67,9	H-2, H-4	C-4	
4	1,17 (3H, d, $J = 6,4$ )	20,8	H-3	C-2, C-3	
N-CH <sub>3</sub>	3,04 (3H, s)	40,4	-	C-2, C-1 V1	
Valine 2					
1	-	174,2	-	-	-
2	4,55 (1H, d, $J = 10,1$ )	57,6	H-3	C-1, C-3, C-4, C-5	H-3, H-4, H-5
3	1,98 (1H, m)	31,7	H-2, H-4, H-5	C-2, C-4, C-5	H-4, H-5
4	0,91 (3H, m)	20,2	H-3	C-2, C-3, C-5	H-3
5	0,91 (3H, m)	20,2	H-3	C-2, C-3, C-4	H-3
NH	8,94 (1H, d, $J = 10,2$ )	-	H-2	-	
Proline					
1	-	174,2	-	-	-
2	4,93 (1H, m)	60,8	H-3	C-1, C-3, C-4, C-5	H-3
3	2,10 (1H, m) 1,90 (1H, m)	31,4	H-2, H-4	C-2, C-4, C-5	
4	2,08 (1H, m) 1,87 (1H, m)	26,0	H-3, H-5	C-3	H-5
5	3,95 (1H, m) 3,74 (1H, t, $J = 6,8$ )	49,0	H-4	C-2, C-3, C-4	
Valine 3					
1	-	171,6	-	-	-
2	4,59 (1H, d, $J = 9,3$ )	58,1	H-3	C-1, C-3, C-4, C-5, C-1 HICA	H-4, H-5
3	2,43 (1H, m)	32,6	H-2, H-4, H-5	C-2, C-4, C-5	H-2, H-4
4	1,10 (3H, d, $J = 6,7$ )	19,6	H-3	C-2, C-3, C-5	H-2, H-3
5	1,00 (3H, d, $J = 6,4$ )	19,6	H-3	C-2, C-3, C-4	H-2, H-3
NH	7,89 (1H, d, $J = 9,0$ )	-	H-2	C-1 HICA	



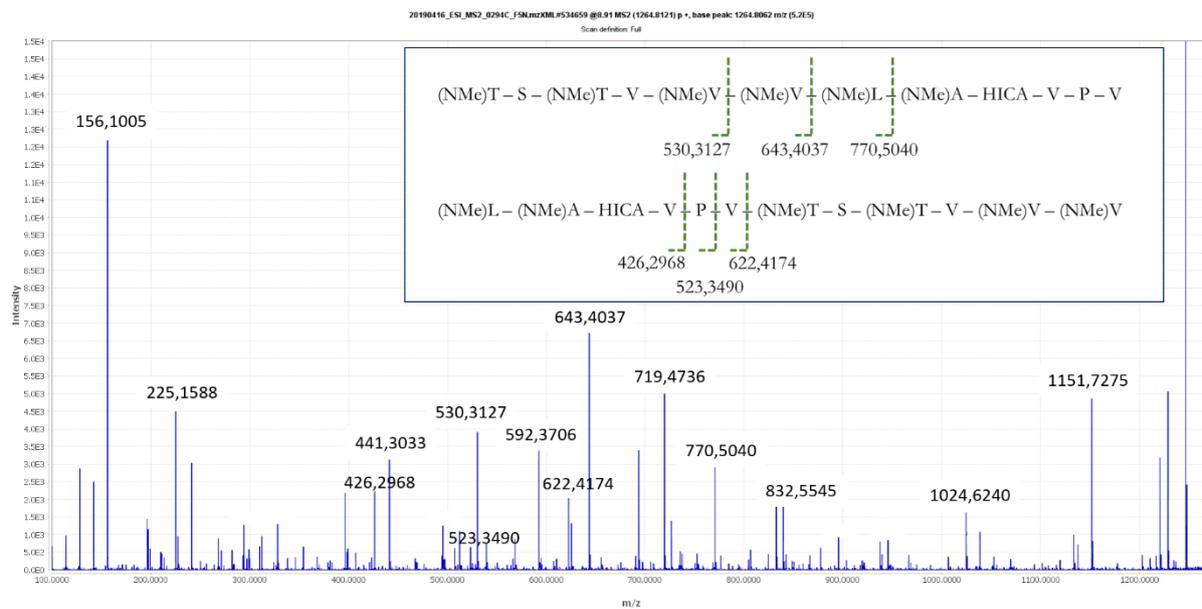
COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )Zoom sur HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Zoom sur HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

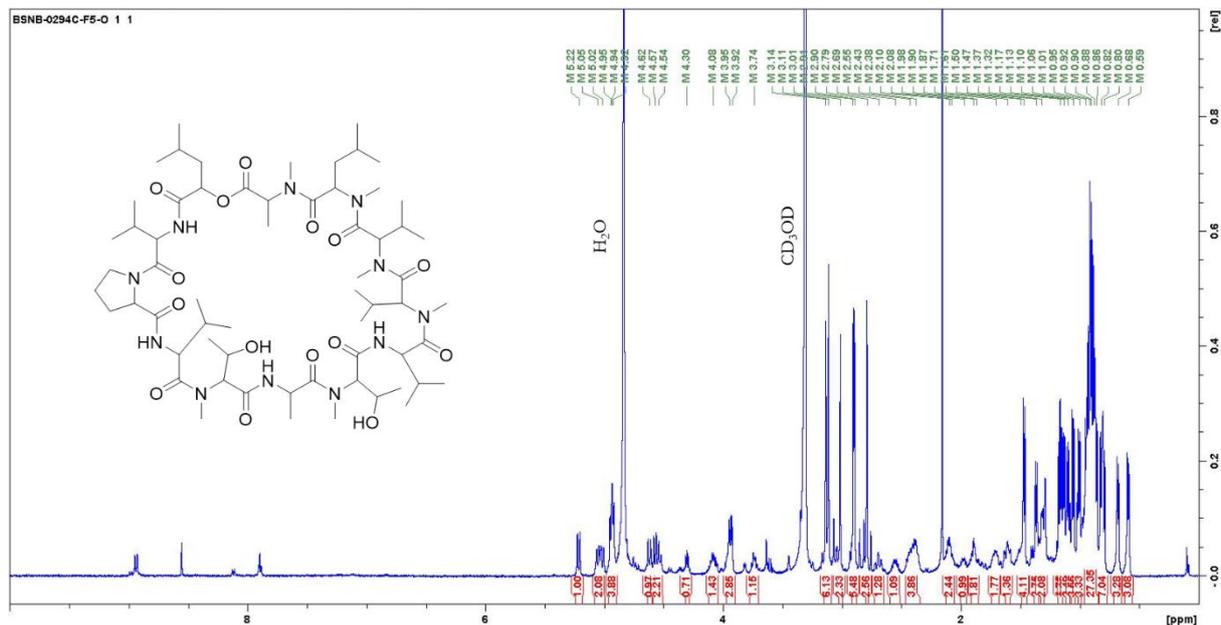


Spectre de fragmentation

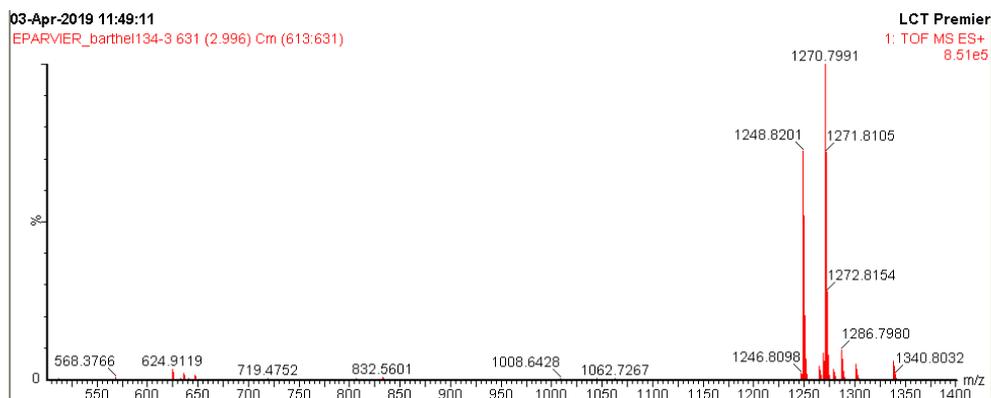


Annexe 76 : Spectre RMN-1H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) et spectre de fragmentation de la xylériacéine B (37).

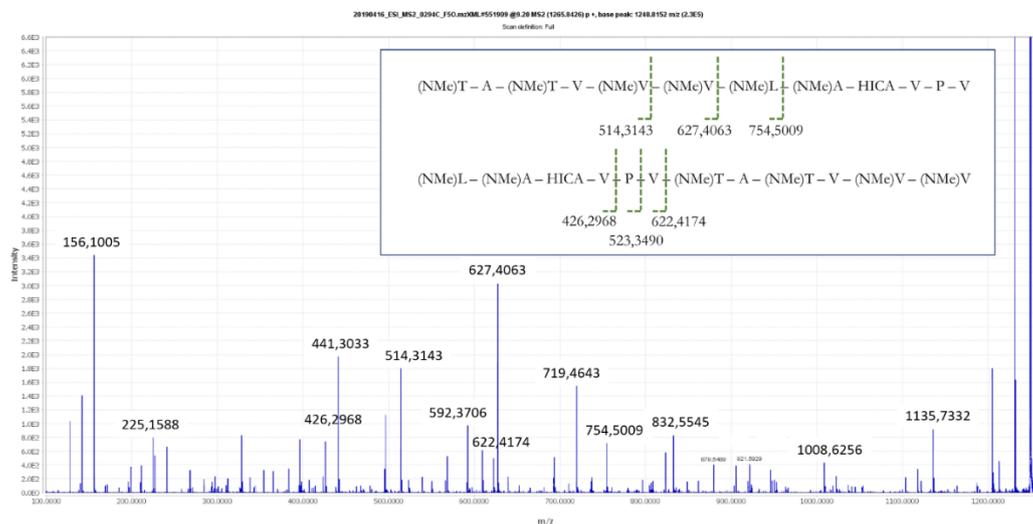
RMN-1H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

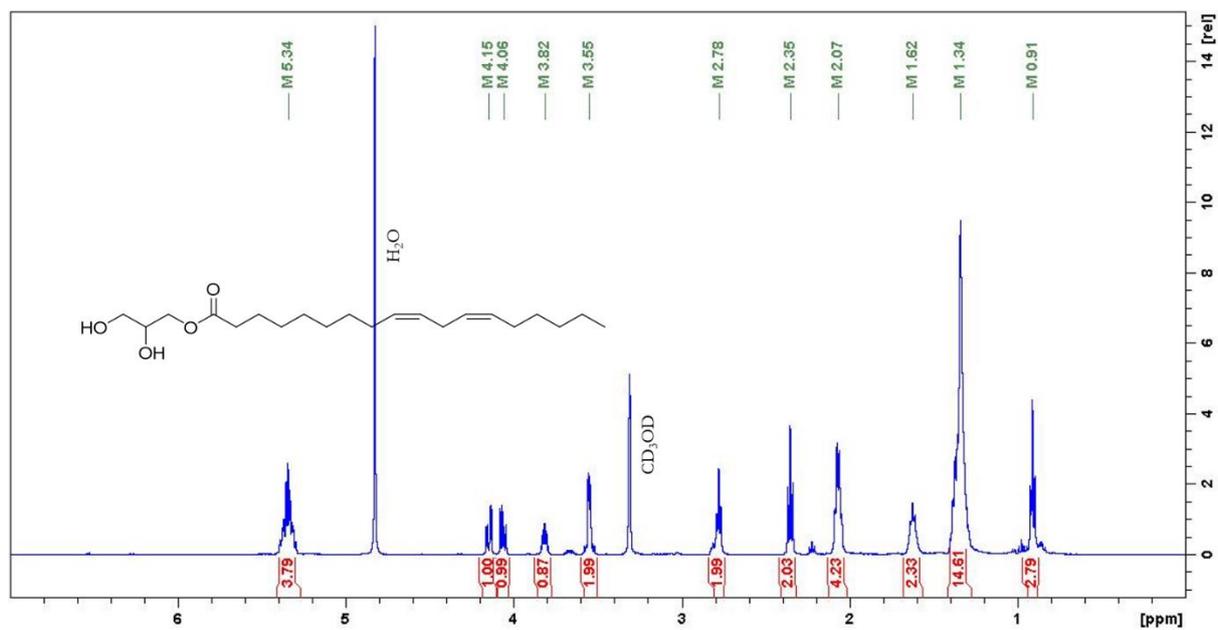
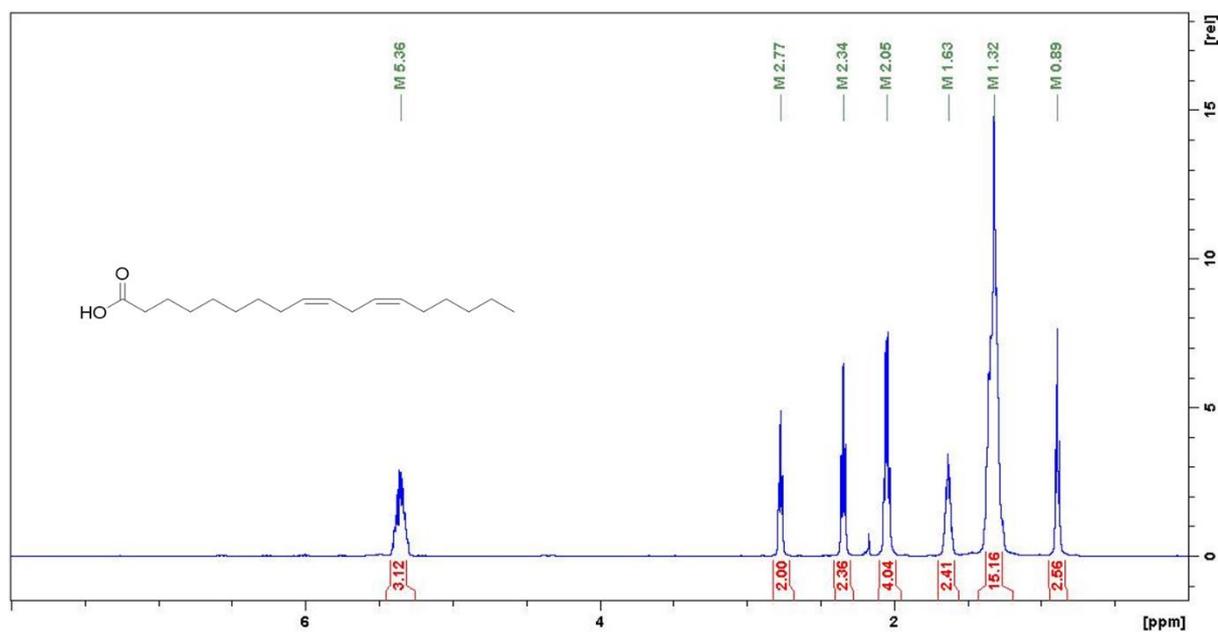


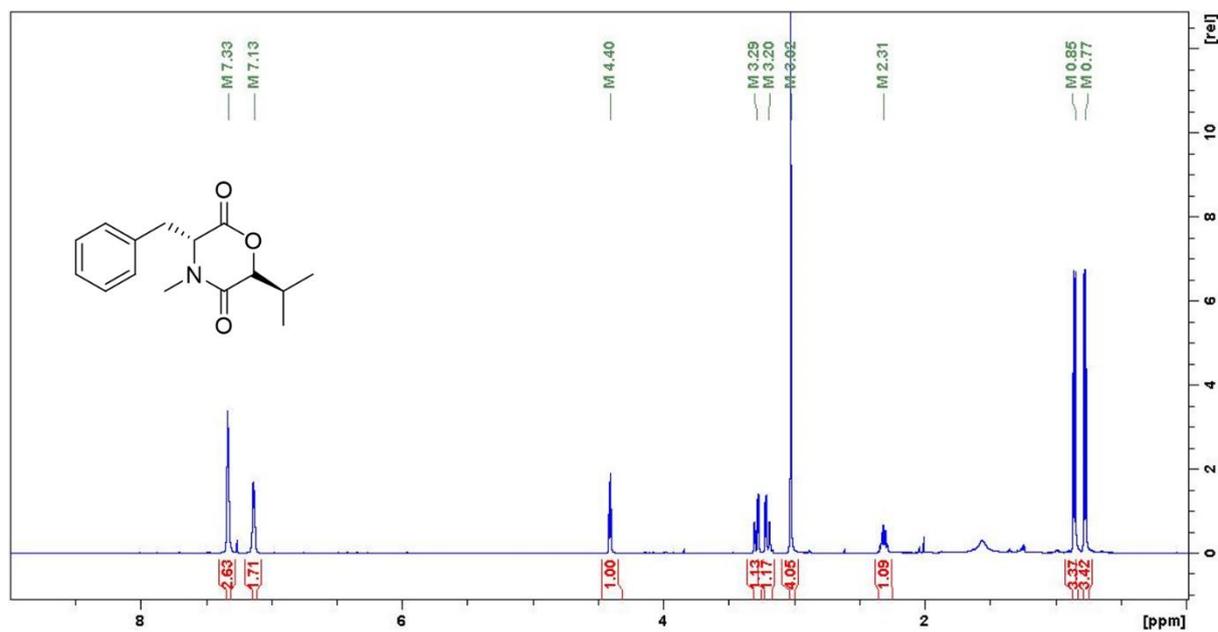
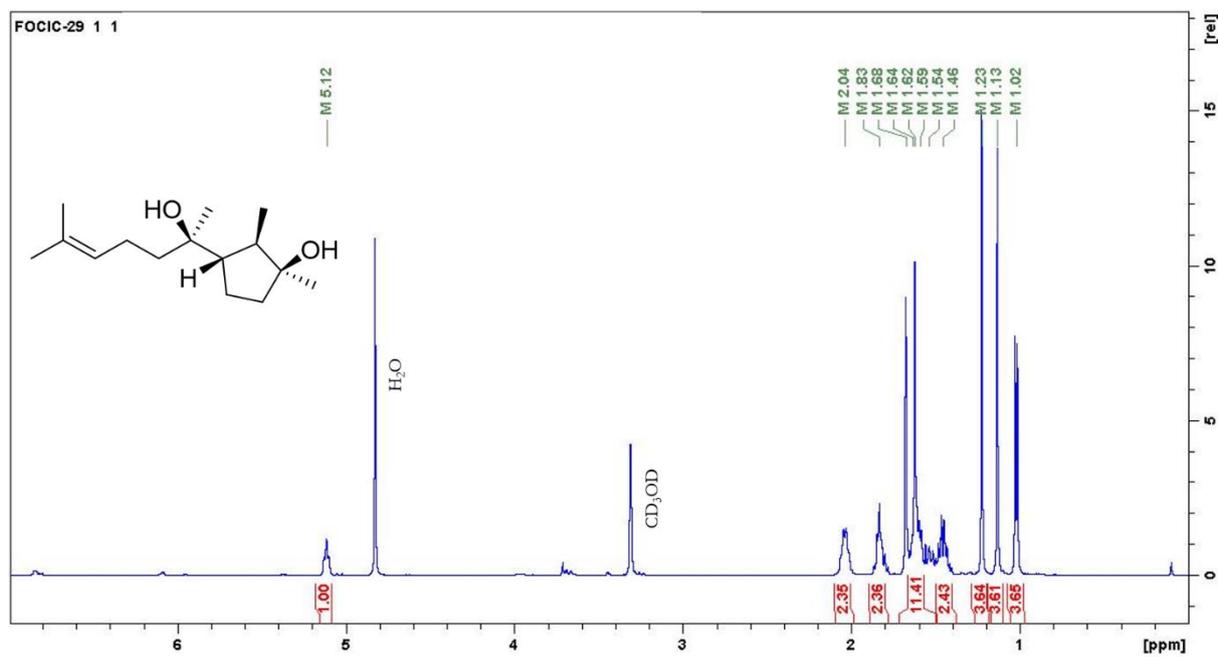
Spectre de masse haute résolution



Spectre de fragmentation

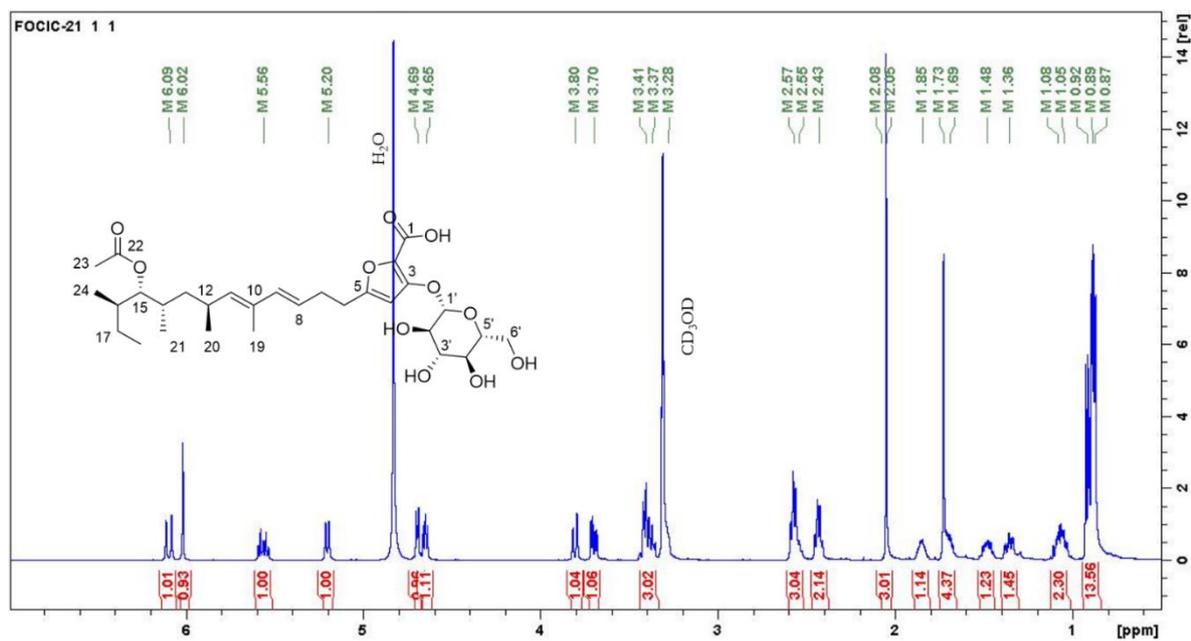
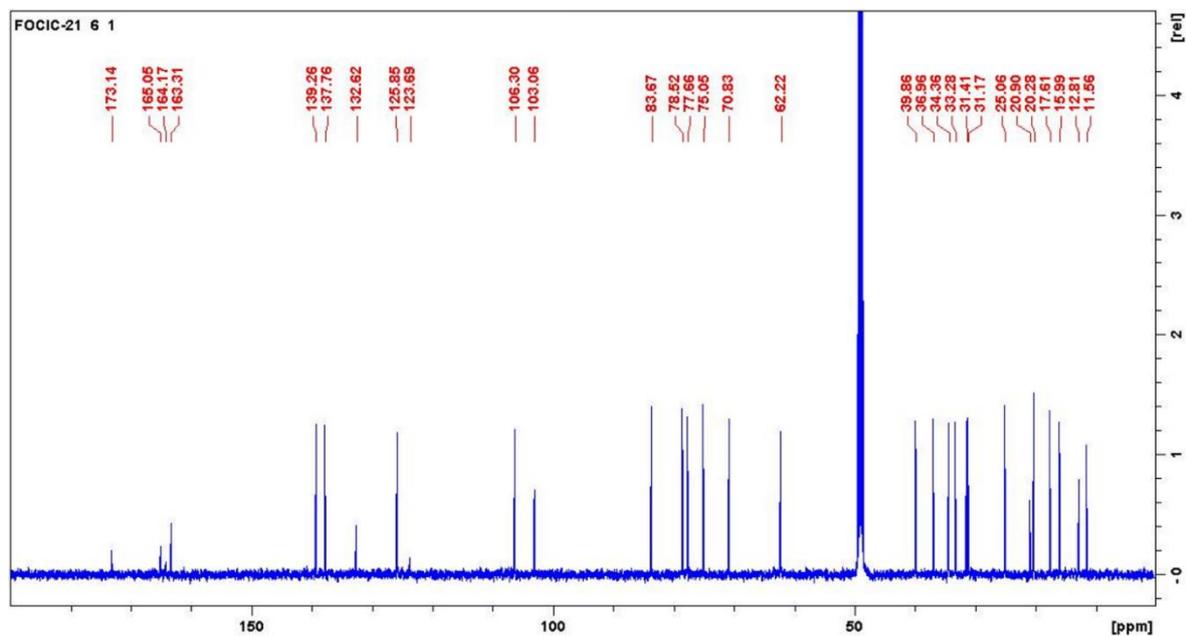


Annexe 77 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du 1-lineoyl glycérol (**38**).Annexe 78 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de l'acide linoléique (**39**).

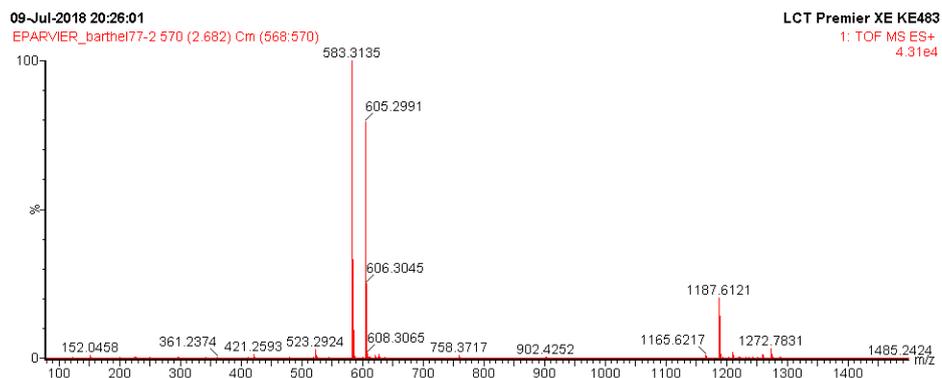
Annexe 79 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la bassiatine (**40**).Annexe 80 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) du (-)-cyclonérodol (**41**).

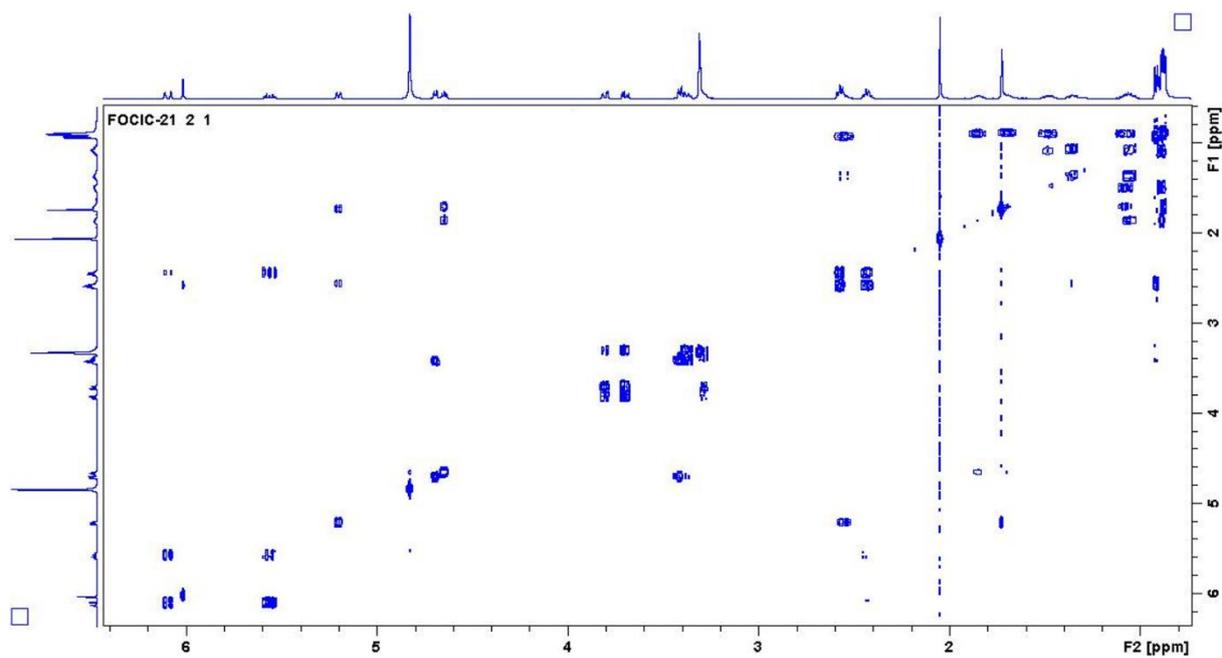
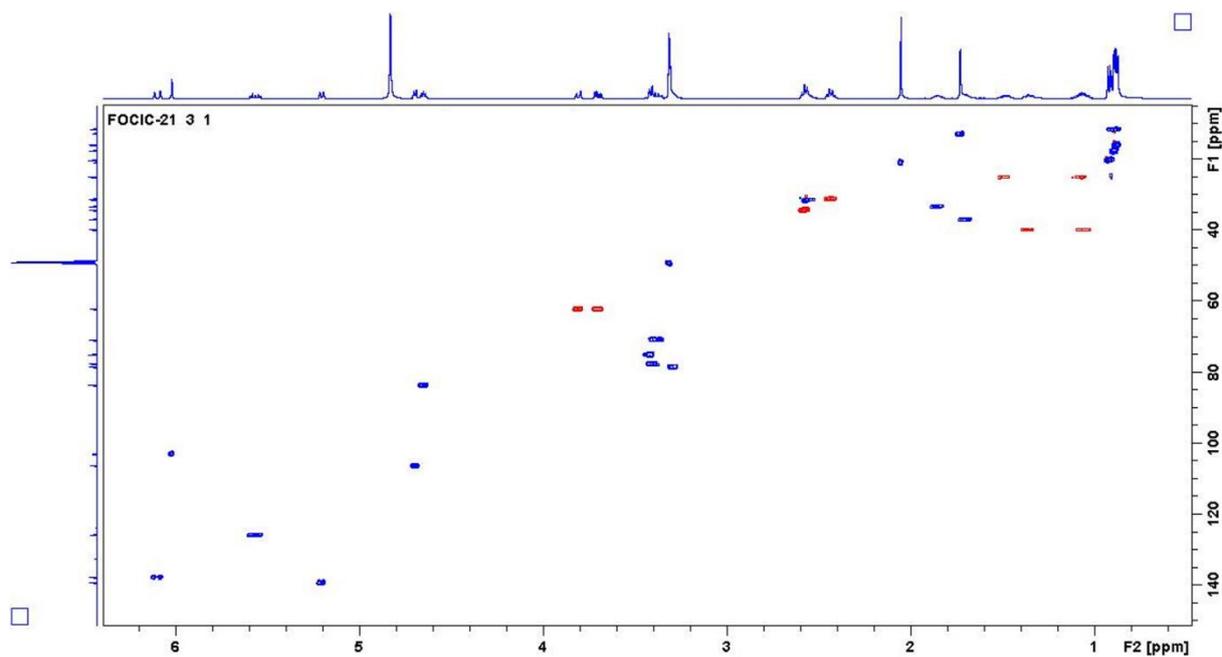
Annexe 81 : Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et 2D (COSY, HSQC, HMBC), spectre de masse en haute résolution et configuration de la flocine (**42**).

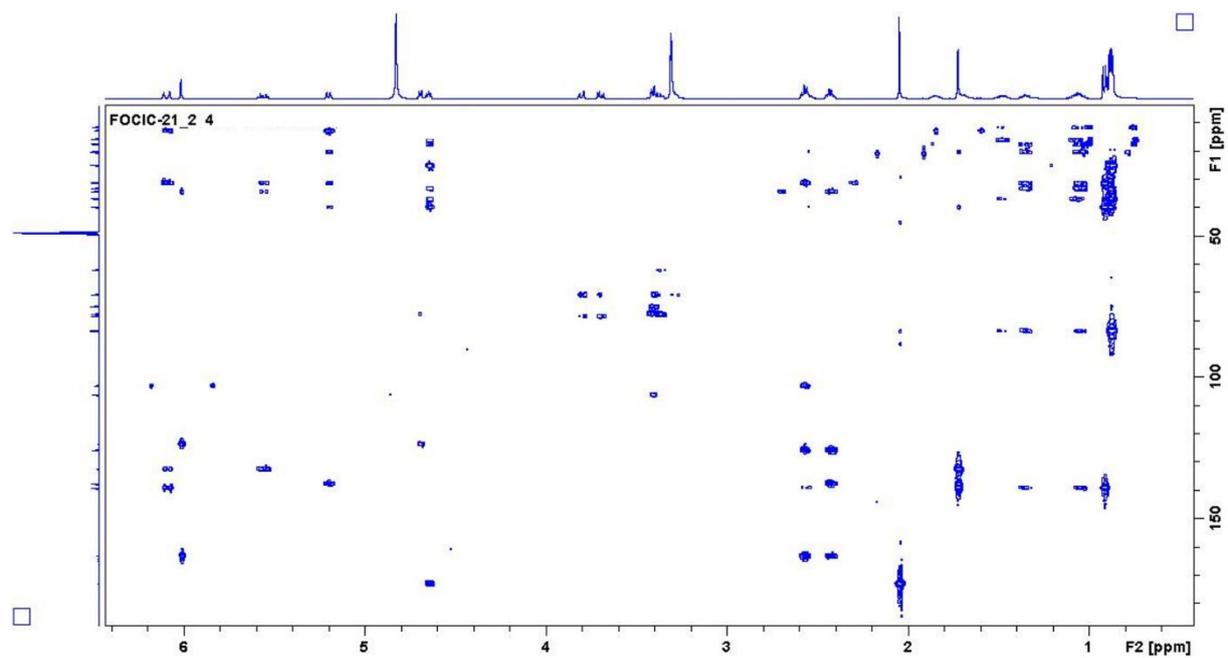
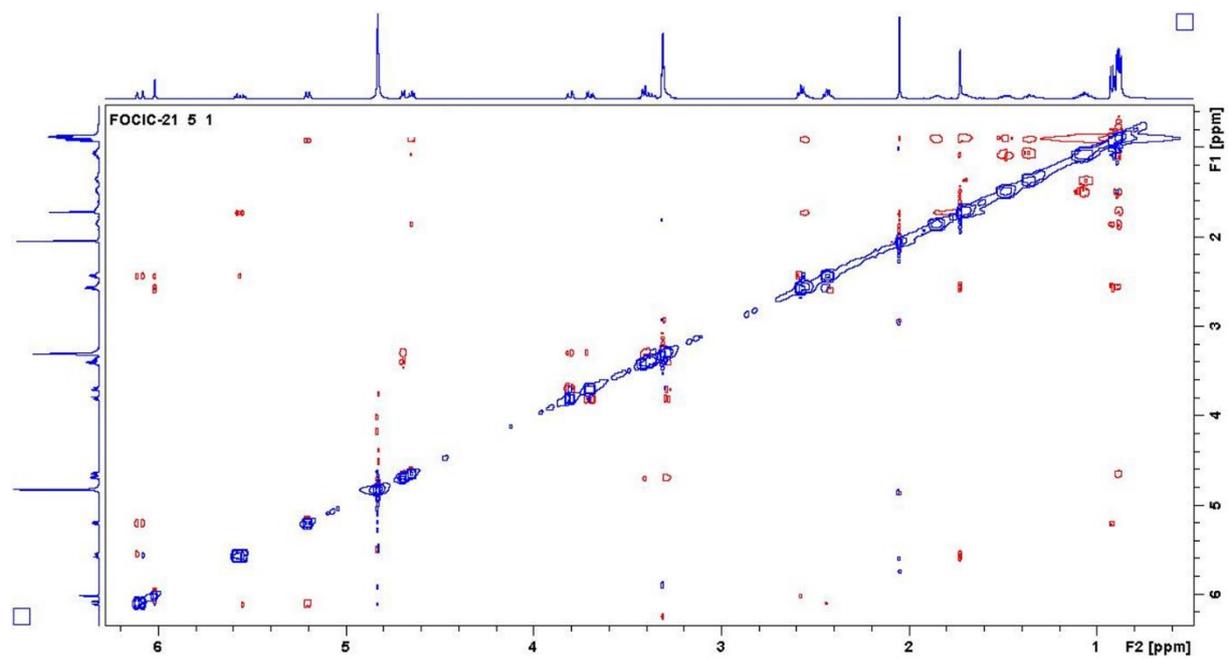
Position	$^1\text{H} : \delta$ (ppm) (multiplicité, $J$ (Hz))	$^{13}\text{C} : \delta$ (ppm)	COSY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )	HMBC ( $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ )	NOESY ( $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ )
1	-		-	-	-
2	-		-	-	-
3	-	123,7	-	-	-
4	6,01 (1H, s)	103,1	-	C-3, C-5, C-6	H-5, H-6
5	-	163,3	-	-	-
6	2,59-2,55 (2H, m)	34,4	H-7	C-4, C-5, C-7, C-8	H-4, H-8
7	2,43 (2H, td, $J = 10,7, 7,1$ )	31,2	H-6, H-8, H-9	C-5, C-6, C-8, C-9	H-8, H-9
8	5,56 (1H, dt, $J = 15,3, 6,9$ )	125,9	H-7, H-9	C-6, C-7, C-10	H-6, H-7, H-9, H-19
9	6,09 (1H, d, $J = 15,5$ )	137,8	H-7, H-8	C-7, C-10, C-11, C-19	H-8, H-11
10	-	132,6	-	-	-
11	5,20 (1H, d, $J = 5,0$ )	139,3	H-12, H-19	C-9, C-12, C-13, C-19, C-20	H-9, H-13, H-20
12	2,53 (1H, m)	31,4	H-11, H-13a, H-20	C-11, C-13	
13	1,36 (1H, m) 1,11-1,06 (1H, m)	39,9	H-12, H-13b H-12, H-13a, H-14	C-11, C-12, C-14, C-15, C-20, C-21	
14	1,85 (1H, m)	33,3	H-13b, H-15		H-15
15	4,65 (1H, dd, $J = 7,0, 5,7$ Hz)	83,7	H-14, H-16	C-13, C-14, C-16, C-17, C-21, C-22, C-24	H-14, H-16, H-24
16	1,69 (1H, m)	37,0	H-15, H-17b, H-24		H-15
17	1,48 (1H, m) 1,05 (1H, m)	25,1	H-17b, H-18 H-16, H-17a, H-18	C-15, C-16, C-18, C-24	
18	0,89 (3H, m)	11,6	H-17	C-17	
19	1,73 (3H, s)	12,8	-	C-9, C-10, C-11	H-8, H-12
20	0,92 (3H, d, $J = 6,5$ )	20,3	H-12	C-11, C-12, C-13	H-11
21	0,88 (3H, m)	17,6	H-14		
22	-	173,1	-	-	-
23	2,05 (3H, s)	20,9	-	C-22	
24	0,87 (3H, m)	16,0	H-16		H-15
1'	4,69 (1H, m)	106,3	H-2'	C-3, C-2', C-3'	
2'	3,41 (1H, m)	75,1		C-1', C-3'	
3'	3,39 (1H, m)	77,7		C-2', C-4'	
4'	3,36 (1H, m)	70,8		C-3', C-6'	
5'	3,28 (1H, m)	78,5	H4', H6'	C-4'	H-1', H-6'
6'	3,80 (1H, dd, $J = 12,0, 2,2$ ) 3,70 (1H, dd, $J = 12,0, 5,0$ )	62,2	H5', H6'b H5', H6'a	C-4', C-5'	H-4', H-5'

RMN-1H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)RMN-13C (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

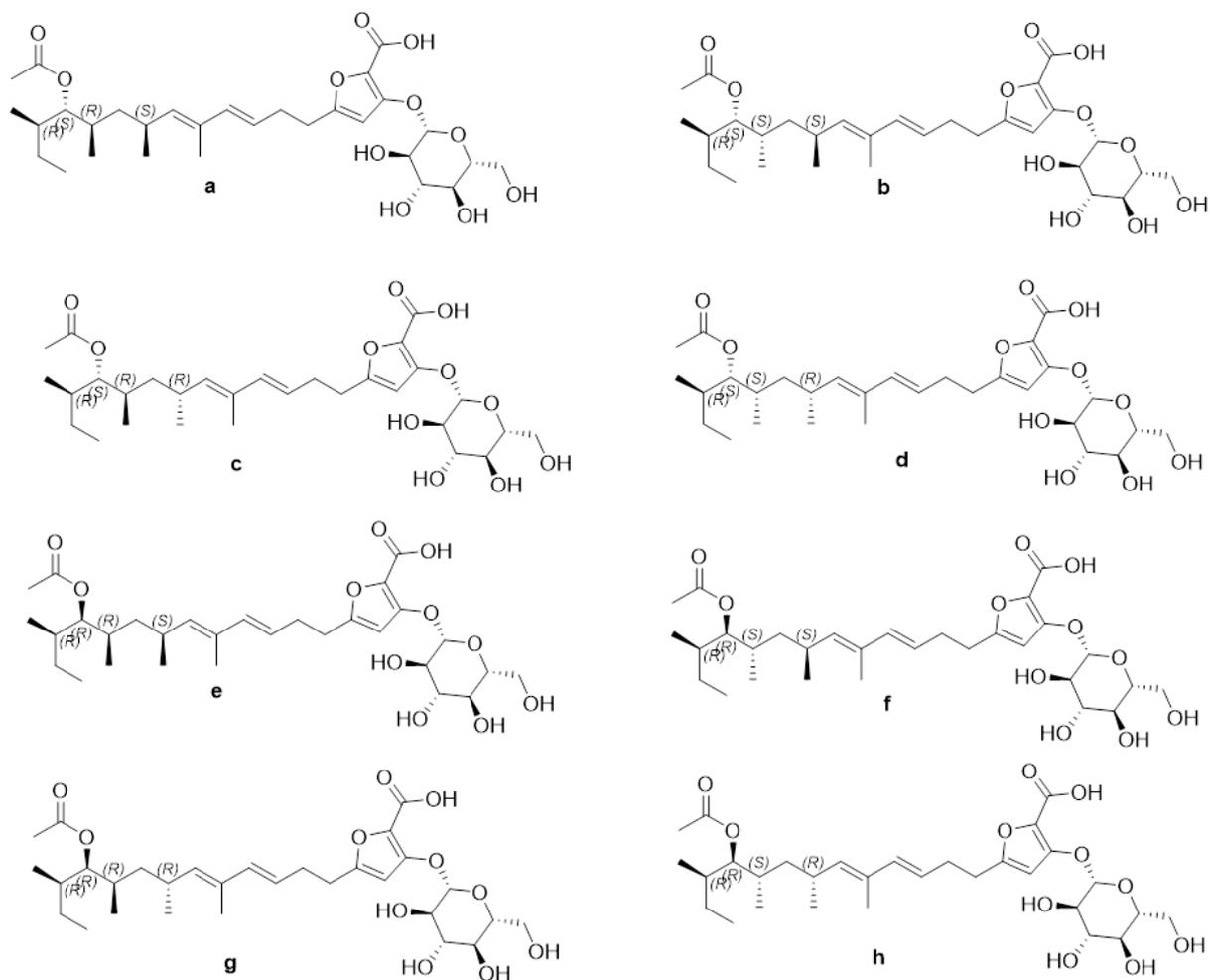
## Spectre de masse haute résolution



COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Pourcentage de probabilité retenu pour les différents isomères de la focicine (**42**), d'après la comparaison des déplacements chimiques RMN-<sup>13</sup>C théoriques et expérimentaux



<b>b</b> (95%)	<b>e</b> (5%)
----------------	------------------