



HAL
open science

Exploration ciblée de l'espace chimique des micro-organismes des “ mares de kopara ” polynésiennes

Phuong Y Mai

► **To cite this version:**

Phuong Y Mai. Exploration ciblée de l'espace chimique des micro-organismes des “ mares de kopara ” polynésiennes. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ003 . tel-04536647

HAL Id: tel-04536647

<https://theses.hal.science/tel-04536647>

Submitted on 8 Apr 2024

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.

Exploration ciblée de l'espace chimique des micro-organismes des « mares de kopara » polynésiennes

(Targeted chemical space exploration of Polynesian Kopara mats microorganisms)

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat: Chimie des Substances Naturelles
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans les unités de recherche **BioCIS** et **ICSN** (Université Paris-Saclay),
sous la direction de **Erwan POUPON**, Professeur des Universités et la co-direction de
Mehdi BENIDDIR, Professeur des Universités, le co-encadrement de **Jamal
OUAZZANI**, Directeur de Recherche et **Géraldine LE GOFF**, Ingénieur de Recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 27 janvier 2023, par

Phuong Y MAI

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Sophie TOMASI Professeure, Université Rennes 1	Présidente
Soizic PRADO Professeure, Muséum national d'Histoire Naturelle	Rapporteuse/Examinatrice
Sylvie LAUTRU Directrice de Recherche CNRS, HDR, I2BC, Gif-sur-Yvette	Examinatrice
Samuel BERTRAND Maître de Conférences, HDR, Nantes Université	Examinateur

Titre : Exploration ciblée de l'espace chimique des micro-organismes des « mares de kopara » polynésiennes

Mots clés : Mattes de « Kopara », Molecular Networking, Micro-organismes, Priorisation.

Résumé : Ayant des structures uniques et très diversifiées, les métabolites microbiens jouent un rôle important dans la recherche de nouvelles molécules par exemple antibiotiques. L'objectif de notre projet est d'isoler, pour la première fois, des métabolites spécialisés à partir d'actinomycètes et de champignons d'échantillons de mattes de « Kopara », un environnement peu exploré et trouvé en Polynésie française. Jusqu'à présent, seuls des pigments et des exopolymères ont été découverts à partir des cyanobactéries et des bactéries provenant de cette source.

En raison du nombre important de micro-organismes isolés de nos prélèvements, et pour éviter la redécouverte de molécules connues, l'identification rapide (ou « déréplication ») de ceux-ci et la priorisation des souches intéressantes sont nécessaires. Pour cela, une stratégie fondée sur l'utilisation des réseaux moléculaires multi-informatifs a été employée.

Cette stratégie nous a permis de prioriser et d'étudier quatre souches, conduisant à l'isolement de dix nouvelles structures et au développement d'une nouvelle technique de culture : la technique SPEED.

Title : Targeted chemical space exploration of Polynesian Kopara mats microorganisms

Keywords : Kopara mats, Molecular Networking, Microorganisms, Prioritization.

Abstract : Natural products produced by microorganisms represent an abundant source for discovering new antibiotic molecules with a high level of structural diversity. The microorganisms isolated from exotic and unexplored sources, called "Kopora" were studied in this project. To date, only pigments and exopolymers were isolated from "Kopora"-dwelling cyanobacteria and bacteria. Our project purpose is the isolation, for the first time, of filament-forming microorganisms, such as actinomycetes and fungi, from Kopara samples and the investigation of their specialized metabolites.

Facing the considerable amount of actinomycetes and fungi isolated from this under-investigated resource and to avoid the rediscovery of known compounds, a significant issue in natural product chemistry, the rapid identification of known compounds (dereplication) and prioritization of interesting strains required intense efforts. To meet this challenge, a multi-informational molecular networking dereplication strategy has been carried out.

The chemical space exploration of four prioritized strains by this strategy led to the isolation of ten new compounds together with a new innovative procedure for microbial cultivation: the SPEED technology.

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe « chimie des substances naturelles » de BioCIS et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS-ICSN) sous la direction des Pr. Erwan Poupon et Pr. Mehdi Beniddir de l'équipe BioCIS et du Dr. Jamal Ouazzani et Dr. Géraldine Le Goff de l'ICSN.

Je voudrais adresser mes premiers remerciements à tous mes directeurs de thèse pour m'avoir donnée l'opportunité de réaliser ce très beau travail dans un bon environnement avec des bonnes conditions. Merci d'avoir toujours été à mes côtés pour me motiver, pour m'aider et pour me soutenir pendant les moments difficiles. J'aimerais vous dire que j'ai eu l'honneur et la chance de recevoir vos connaissances et compétences durant ces trois années de thèse.

Je remercie Mouad Alami (directeur de l'UMR et du laboratoire BioCIS) et Boris Vauzeilles (directeur de l'ICSN) de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de vos unités.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon jury pour avoir accepté de lire et évaluer mon travail :

- Sophie Tomasi, Professeure à l'université Rennes 1
- Soizic Prado, Professeure au Muséum Nationale d'Histoire Naturelle
- Samuel Bertrand, Maître de conférences à l'université de Nantes
- Sylvie Lautru, Chargé de recherche à I2BC, Gif-sur-Yvette

Je tiens à remercier tous les collaborateurs et toutes les personnes qui ont contribué à ce travail de thèse :

- Bernard Costa, président fondateur et Dr. Xavier Moppert, directeur de R&D de l'entreprise Pacific Biotech, Tahiti. Merci de m'avoir confié la source primaire, à partir de laquelle tous ces travaux de recherche ont été commencés.
- Dr. Sylvie Lautru, chercheur à l'I2BC d'Orsay et Maya Long de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir appris l'extraction du génome des micro-organismes.
- Merci à tous les personnels de la plateforme de séquençage à haut débit de l'I2BC, à qui j'ai confié mes échantillons d'ADN microbien pour le séquençage génomique.
- Pascal Retailleau et Elsa Van Elslande du service de cristallographie. Un grand remerciement à Pascal Retailleau, qui a pris énormément de son temps pour faire des expériences de diffraction des rayons X de mes cristaux, peu importe leur qualité.
- Merci à toutes les personnes du service RMN de l'ICSN, principalement à Jean-François Gallard pour son temps et ses efforts pour l'obtention de magnifiques spectres RMN de mes produits isolés.
- Karine Leblanc et Somia Rharrabti, personnels du service des analyses Chromato-

masse pour leur aide de la mise au point des CLHP préparatives.

J'adresse mes remerciements à Dr. Yanyan Li, membre principal de mon comité de thèse. Merci de votre intérêt, de vos suggestions et remarques pertinentes à ce travail.

Je remercie également Pr. Sandrine Onger de m'avoir suivie depuis ma première année de thèse.

Je remercie sincèrement mes collègues de l'équipe 95 de l'ICSN : Philippe Lopes, pour sa disponibilité et son aide pour mes manipulations et Guillaume Arcile qui s'apprête à m'aider à tout moment. Je voudrais remercier à Dr. Chérif Rahbi, qui a pris énormément de son temps pour me donner des conseils scientifiques et personnels. Merci beaucoup, Chérif de m'avoir donnée des leçons de vie et de m'avoir apprise à bien gérer les relations humaines.

Je tiens à remercier Véronique Éparvier, mon responsable de stage de M2, qui m'a transmise les premières connaissances pratiques en métabolites microbiens. Merci d'avoir toujours pensé à moi.

Je voudrais adresser mes remerciements à toutes les personnes avec qui j'ai pu avoir des échanges scientifiques et personnels pendant mes années de thèse : Dr. Pierre Le Pogam, Dr. Guillaume Bernadat, Dr. David Touboul, Blandine Séon-Meniel, Vincent Guérineau, Nicolas Elie.

J'adresse également mes profonds remerciements à toutes mes collègues de l'ICSN et de BioCIS que je considère comme mes amis, avec qui j'ai partagé de bons moments (des soirées et des restaurants inoubliables,...) : Sparta, Marceau, Juliette, Suzanne, Mathieu, Moncef, Guillaume, Estelle, David Lê, Sarah, Axel, Adrien, Nicolas, Rany, Alexandre. Merci Alexandre d'avoir pris de son temps pour lire ma thèse. Merci aux membres de mon CEI : Capucine, Silva, Wanatsaya, Marine et Pierre de m'avoir partagée des moments agréables. Un grand merci à Capucine qui m'a aidé à bien m'intégrer dans notre CEI et avec qui j'ai passé de bons moments à Aussois. Merci à tous les étudiants de l'ICSN et de BioCIS avec qui j'ai partagé de beaux souvenirs.

Je souhaite remercier au fond de mon cœur tous mes meilleurs amis : Jingjing, Châu, Thu, Joseph, Christina, Amanda, Seyma et Yicheng qui sont toujours là pour moi. Merci de votre écoute, votre soutien, votre encouragement et vos conseils précieux. Un grand remerciement à Gilles, mon propriétaire de logement, pour sa gentillesse et son aide. Merci Gilles, d'être toujours disponible pour m'aider à régler le moindre problème. Je le remercie pour toutes les fêtes, tous les moments magnifiques que j'ai partagés avec lui, son ami Alain et les membres de sa famille (Dani, Jean-Charles, Hélène, Alexandre, Misa, Julia et Louis). Je remercie également à Jean-Bosco, mon colocataire, pour ses conseils précieux.

Merci à ma famille, ma grand-mère, tantes, oncles, cousins en France et au Vietnam, pour avoir toujours pensé à moi et pour leur soutien. Un grand merci à mes tantes Vân et Mườì et leur mari Trung et Eric qui se sont bien occupés de moi pendant mes années d'études à Lyon.

Je remercie mon ami, Bastien Champciaux, pour son soutien, ses encouragements, sa présence et son écoute. Merci pour tous ces moments de joie qu'il m'a apportée.

Je souhaite remercier du fond du cœur mes parents et ma petite sœur pour leur écoute, leur soutien, leur encouragement et leur patience. Merci papa et maman d'avoir tout fait pour me donner une très belle vie, merci de m'avoir orientée sur le bon chemin de ma vie. Papa, maman, ma sœur, vous êtes des personnes auxquelles j'ai pensé pendant mes moments difficiles et la raison qui m'encourage à m'avancer dans la vie. Je vous aime !

TABLE DE MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	1
LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE :	17
CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE :	23
• Les défis liés aux produits d'origine microbienne et à la découverte d'antibiotiques	23
• Les approches innovantes pour relever les défis liés aux produits d'origine microbienne et à la découverte d'antibiotiques.....	25
CHAPITRE II – TRAVAUX PERSONNELS	55
• Notre source « exotique » : les mattes de « Kopara ».....	55
• Stratégie de priorisation des micro-organismes des mattes de kopara	60
CHAPITRE III : ÉTUDE APPROFONDIE DES MICRO-ORGANISMES PRIORISÉS	71
III.1 Étude des micro-organismes priorises de l'échantillon 19	71
• Étude approfondie de la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21	71
• La technique Solid-Phase Extraction Embedded Dialysis (SPEED)	72
• Application de la technologie SPEED sur la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21	73
• Exploration chimique de la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21 en utilisant les réseaux moléculaires	75
• Exploration ciblée de l'espace chimique de la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21 en utilisant une sonde chimique	102
• Étude du génome de la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21	104
• Conclusion du chapitre et analyses critiques	105
III.2 Étude des micro-organismes priorisee de l'échantillon 20	107
• Amélioration des critères de priorisation des micro-organismes de l'échantillon 20	107
• Étude approfondie des micro-organismes de l'échantillon 20	109
• Conclusion du chapitre et analyses critiques	164
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	167
CHAPITRE IV : PARTIE EXPÉRIMENTALE	175
Partie Microbiologie	175
• Collection des échantillons de mattes de Kopara.....	175
• Isolement des micro-organismes.....	175
• Culture à « petite échelle » et « grande échelle »	176
• La culture en milieu liquide (LSF pour Liquid State Fermentation) :.....	176
• La culture en milieu solide (SSF pour Solid State Fermentation) :.....	177
• Technique de culture « résine post-culture »	177
• La stratégie de culture SPEED (Solid-Phase Extraction Embedded Dialysis).....	177
• Protocole de synthèse de la sonde <i>N</i> -(4,6-dioxoheptyl) décanamide	178
• Protocole d'incubation de la sonde <i>N</i> -(4,6-dioxoheptyl) décanamide avec la souche.....	179
• Essais biologiques	182
• Extraction de l'ADN génomique des micro-organismes.....	183
• Extraction du génome selon le protocole proposé par notre collaboration	183
• Extraction de l'ADN génomique par Kit commercial	183
• Taxinomie des micro-organismes	184
Partie Chimie	184
• Extraction des métabolites des micro-organismes	184
• Méthodes d'analyse et de séparation	185
• L'expérience de photocycloaddition	200
• Pouvoir rotatoire.....	200
• Dichroïsme circulaire électronique.....	200
• Expériences de cristallographie	200
REFERENCES.....	202
ANNEXES	213
VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	243

PUBLICATIONS243

- THESIS243
- INTERSHIP243

SYMPOSIUM AND WEBINAR.....243

COMMUNICATIONS AND POSTER.....243

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemples des molécules thérapeutiques isolées à partir des micro-organismes.....	18
Figure 2 : Diversité du monde microbien et de ses écosystèmes (figure reprise in extenso de l'article de White, et al.) ²⁰	24
Figure 3 : Photos des collections de souches isolées à partir de divers échantillons du sol (https://www.science-a-la-pelle.fr/).....	25
Figure 4 : "Workflow" d'isolement ciblé. Les défis et les solutions pour chaque étape d'isolement. ...	26
Figure 5 : Les interactions morphologiques entre deux champignons en co-culture (figure reprise in extenso de l'article de Bertrand, et al.) ²¹	27
Figure 6 : Structures des composés détectés à partir de la co-culture de micro-organismes dans le cadre des travaux de Boya et al.	29
Figure 7 : Structures des molécules produites lors de la co-culture d' <i>Alternaria tenuissima</i> et <i>Nigrospora sphaerica</i> : le stemphypéryléol, l'alterpryléol et l'actidione, un antifongique utilisé en tant que contrôle positif dans le test d'activité antifongique.	30
Figure 8 : Le lobocampactol produit à partir de la co-culture de <i>Streptomyces cinnabarinus</i> PK209 et de la bactérie marine <i>Alteromonas</i> sp. KNS-16.....	30
Figure 9 : la technique de culture "iChip". [A] la plaque centrale d'iChip est placée dans le sol riche en micro-organismes, [B] une seule cellule peut-être capturée dans chaque puit, [C] la plaque centrale est scellée à l'intérieur de deux membranes avec des vis. Cette figure a été adaptée à partir des figures de Berdy et al.	32
Figure 10 : Structure de la teixobactine.....	33
Figure 11 : Schéma du système de chambre à membrane à fibres creuses [A], [B] ; coupe transversale d'une fibre creuse observée au microscope électronique à balayage – la barre représente 200 µm [C]. Cette figure a été adaptée à partir des figures d'Aoi et al.	33
Figure 12 : Structures des alcaloïdes dérivés ergoline et de la guanitoxine	35
Figure 13 : « Workflow » de l'approche génomique. [A] Les BGCs peuvent être identifiés dans le génome microbien en utilisant antiSMASH ou les outils adaptés. MIBiG, une base de donnée de BGCs avec des fonctions connues, peut être utilisée pour identifier ces BGCs. BiG-SCAPE est utilisé pour organiser les BGCs similaires en famille de clusters de gènes (GCFs). Les BGCs référencés dans MIBiG sont indiqués en bleu. [B] CORASON est ensuite employé pour exploiter les relations évolutives des BGCs dans chaque GCF. Figure adaptée à partir des figures de Navarro-Munoz et al et Van der Hooft et al.....	36
Figure 14 : Structure de la géninthiocine B.....	37
Figure 15 : Vue aérienne du <i>Grand Prismatic Spring</i> . Crédits : U.S. National Park Service.....	38
Figure 16 : Structure de la molécule thermoactinoamide A.....	39
Figure 17 : Structures des cervimycines A-D.	40
Figure 18 : Tableau des activités biologiques des isolats sélectionnés (repris in extenso de l'article de Nakaew, et al.).....	42
Figure 19 : Structure de la caboxamycine	42
Figure 20 : Structure de la darobactine	43
Figure 21 : « Worflow » de la stratégie de priorisation basée sur l'utilisation des outils de la spectrométrie de masse computationnelle.	45
Figure 22 : Structures des acides maridriques A et B.....	46
Figure 23 : « Workflow » de la priorisation des isolats microbiens en utilisant 2D RMN (HSQC-TOCSY).	47
Figure 24 : Structure de la sonde 5-bromo-2-nitrosopyridine et la réaction d'hétéro-Diels-Alder (figure adaptée de l'article de Gabriel Castro-Falcón et al.).....	48
Figure 25 : Structures de daryamide A et novodaryamide A, molécules détectées par la sonde 5-bromo-2-nitrosopyridine à partir de l'extrait de <i>Streptomyces</i> sp. CNQ-085.....	48
Figure 26 : Réactivité de la sonde « dithiothréitol » et la détection de la présence du composé d'intérêt par comparaison les spectres de masse des extraits avec et sans l'ajout de la sonde (figure adaptée de l'article de Courtney L. Cox et al.).....	49
Figure 27 : Structure de la molécule cyclothiazomycine C.....	50
Figure 28 : Mécanisme de réaction des sondes réagissant aux intermédiaires des polyactétates (figure adaptée à partir de l'article de Elena Riva et al.).....	50
Figure 29 : Structure de la nouvelle molécule dérivée de la lasalocide A, formée par l'interaction des	

sondes chimiques aux intermédiaires des polyacétates	51
Figure 30 : la formation d'un atoll selon la théorie de Darwin (Bernard Duyck - https://tahitileblog.fr/)	55
Figure 31 : Formation des atolls selon le modèle karstique	57
Figure 32 : Illustration d'une stratification de la matre de kopara (figure reprise in extenso de l'article de Guézennec, et al.).....	59
Figure 33 : Les prélèvements des mattes de kopara (Pacific Biotech).....	61
Figure 34 : Les sept échantillons collectés au même endroit à différentes profondeurs.	62
Figure 35 : Les procédures d'isolement des souches. Les différents milieux de culture sont rapportés à droite de la figure.	62
Figure 36 : Repiquage des micro-organismes.....	63
Figure 37 : « Workflow » de la stratégie de priorisation fondée sur les réseaux moléculaires.....	64
Figure 38 . [A] Réseau moléculaire global des actinomyètes de l'échantillon 19. [B] Exemple des clusters « monocouleur » intéressants provenant d'une souche et ceux « multicolore » regroupant des molécules produites par plusieurs souches, ceux qui ne sont pas, a priori, intéressants selon nos critères.....	66
Figure 39 : Structure de la sonde N-(4,6-dioxoheptyl) décanamide	67
Figure 40 . La souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21 avec quelques exemples de ses clusters « monocouleur »	71
Figure 41 . Arbre de proximité phylogénétique obtenu à partir de l'alignement de la séquence d'ARNr 16S de l'isolat et de <i>Streptomyces</i> spp. du groupe d'espèces albidoflavus.....	72
Figure 42 . Représentation schématique de la technologie SPEED.....	73
Figure 43 . Différentes conditions de culture solide et liquide de la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21.....	74
Figure 44 . Différence entre la technique de culture "classique" et la technologie SPEED. [A] Culture liquide classique avec résine. [B] technique de culture SPEED. [C] La poche de culture SPEED après avoir enlevé le biofilm. [D] Poche de culture SPEED entourée par une couche de biofilm. [E] Agrandissement d'une partie de [D] montrant la couche de biofilm attachée à la poche de nylon externe.	74
Figure 45 . Poches de dialyse interne (récupérées et rincées). [A] Poches de dialyse interne de condition SPEED de la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21, [B] L'agrandissement du sac montrant la couleur des billes de résine.	75
Figure 46 . Les étapes pour construire le réseau moléculaire global de la souche.....	76
Figure 47 . Réseau moléculaire construit à partir de différents extraits bruts de la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21. [A] Cluster de la famille des surugamides. [B] Cluster des desferrioxamines. [C] Clusters des antimycines et [D] Cluster des molécules non annotées produites principalement dans les conditions SPEED. Les contrôles représentent des extraits des résines seules dans des différentes conditions de culture et des extraits de la gélose PDB, sans la présence de la souche. EA = extrait à l'acétate d'éthyle ; M = extrait au méthanol.....	77
Figure 48 . Les profils de CLHP analytiques des conditions de culture liquide classique et celle du SPEED. [A] Profil de CLHP-DEDL de SPEED (ligne continue) et de condition classique (ligne pointillée). Selon les profils UV des composés, nous les avons répartis en trois zones : [B] zone contenant la molécule à m/z = 335,1459, dérépliquée en tant que tétrodécamycine, [C] zone contenant des antimycines et [D] zone des acides gras	78
Figure 49 . Spectre HR-ESIMS en mode positif de la tétrodécamycine	79
Figure 50 . Spectre RMN ¹ H de la tétrodécamycine dans CDCl ₃ (500 MHz)	79
Figure 51 . Spectre RMN ¹³ C de la tétrodécamycine dans CDCl ₃ (125 MHz)	80
Figure 52 . [A] Cluster de la tétrodécamycine et ses analogues. [B] Cluster de la tétrodécamycine annoté par NAP. Les structures des nœuds ont été visualisées à l'aide du logiciel Cytoscape® en utilisant l'outil ChemViz2. Le nœud en vert représente l'annotation expérimentale émanant du GNPS (tétrodécamycine). [C] Les cinq meilleures structures candidates du nœud encerclé en rouge proposées par NAP en utilisant le « fusion scoring ».....	81
Figure 53 . Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 1.....	82
Figure 54 : Superposition des spectres RMN ¹ H de la tétrodécamycine (bleu, 500MHz, CDCl ₃) et du composé 1 (rouge, 500MHz, CH ₃ OH-d ₄)	82
Figure 55 : Apparition de nouveaux produits dans la fraction contenant de la tétrodécamycine. [A] Profil CLHP-DEDL analytique de cette fraction (date d'analyse : 08/12/2020). [B] Profil CLHP- DEDL préparative de la même fraction avec l'apparition des nouveaux produits (date d'analyse : 22/03/2021). Il y a un décalage au niveau du temps de rétention en raison de la date d'analyse et de l'appareil (CLHP analytique en haut et semi-préparative en bas).....	83

Figure 56. Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 2	84
Figure 57 : Superposition des spectres RMN ¹ H de la tétrodécamycine (rouge, 500 MHz, CDCl ₃) et du composé 2 (bleu, 500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	85
Figure 58. Détails des corrélations ¹ H- ¹³ C HMBC pour le composé 2 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	86
Figure 59. Corrélations COSY, ROESY et HMBC du composé 2 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	86
Figure 60. Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 3	89
Figure 61 : Les différents diastérisomères possibles résultant de l'homodimérisation de la tétrodécamycine formés par la réaction de photocycloaddition [2+2].....	88
Figure 62. Superposition des spectres RMN ¹ H du composé 2 (bleu, 500 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et du composé 3 (rouge, 600 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	89
Figure 63 : Détails des corrélations ¹ H- ¹³ C HMBC des protons H-5/H-5' et des carbones C-5/C-5' pour le composé 3 (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	90
Figure 64. Corrélations COSY, ROESY et HMBC du composé 3 (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	90
Figure 65. Représentation ORTEP de la spirobistérodécamycine B par diffraction des rayons X.....	92
Figure 66. Spectre ECD de spirobistérodécamycine B.....	92
Figure 67. Photos de l'expérience photocatalyse et de la lampe UV.....	93
Figure 68. EIC de la tétrodécamycine (m/z 335,1489) et des spirobistérodécamycines A et B (m/z 669,2906) : [A] [B] et [C] la tétrodécamycine et les deux dimères comme contrôles ; [D] résultat de l'expérience d'irradiation de la tétrodécamycine à l'état liquide par la lumière UV ; [E] irradiation de la tétrodécamycine par la lampe UV en présence un catalyseur ; [F] irradiation à la lumière UV de la tétrodécamycine à l'état solide avec formation du troisième produit (encadré rouge), qui est probablement une autre forme isomère des spirobistérodécamycines A et B.....	94
Figure 69 : Cluster des antimycines annoté par GNPS.....	95
Figure 70 : Annotation du cluster d'antimycines par l'isolement et identification structurale.....	96
Figure 71 : Spectre RMN ¹ H de l'antimycine A18 (600 MHz, CDCl ₃).....	97
Figure 72 : Superposition des spectres RMN ¹ H de l'antimycine A18 (rouge, 600 MHz, CDCl ₃) et de la molécule à m/z = 493,2182 (bleu, 600 MHz, CDCl ₃).....	98
Figure 73 : Structure du composé 4	98
Figure 74. Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 4	98
Figure 75 : Spectre RMN ¹ H du composé 4 (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	99
Figure 76 : Détails des corrélations ¹ H- ¹³ C HMBC pour le composé 4 (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	100
Figure 77 : Détails des corrélations ROESY pour le composé 4 (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	101
Figure 78 : la sonde N-(4,6-dioxoheptyl) décanamide.....	102
Figure 79 : La sonde solubilisée dans divers solvants a été ajouté dans les Erlenmeyers de 100 mL contenant 20 mL d'eau et 1 g de la résine.....	102
Figure 80 : [A] Résultat d'analyse en CLHP-UV-DEDL de la condition L-J0-AJ montre l'apparition d'une nouvelle molécule à Tr = 20,9 min ; [B] Cette molécule à m/z = 476,228 (entourée en rouge) a été retrouvé dans un cluster non annoté du réseau moléculaire des différentes conditions d'incubation de la sonde.....	104
Figure 81 : Résultat d'antiSMASH des clusters de gènes de biosynthèse de la Streptomyces albidoflavus 19-S21.....	105
Figure 82 : Le réseau moléculaire global des micro-organismes de l'échantillon 20 et quelques clusters intéressants sont représentés. Les extraits des micro-organismes ont été testés sur ces trois bactéries : Escherichia coli (EC), Bacillus subtilis (BS), Micrococcus luteus (MI). Les diamètres d'inhibition des extraits ont été mesurés et comparée à ceux des témoins : gentamycine pour Bacillus subtilis, Micrococcus luteus et chloramphénicol pour Escherichia coli (résultat des tests d'antibiogramme est également décrit dans cette figure).....	109
Figure 83 : Chromatogramme DEDL de l'extrait brut de la souche 20-S1 cultivé en milieu gélosé en présence de la résine (en haut) avec la molécule majoritaire m/z = 345,1326 et les structures proposées par les outils d'annotation in silico NAP (à droite) et ISDB (à gauche) pour cette molécule. Ces deux outils ne proposent pas les mêmes structures.....	110
Figure 84. Spectre HR-ESIMS en mode positif de la molécule à m/z = 345,1339.....	111
Figure 85 : Le réseau moléculaire des extraits bruts (acétate d'éthyle et méthanol) de la culture gélosée avec les résines et les fractions de flash chromatographie (en haut). En bas, quatre composés ont été mis en évidence dans le chromatogramme LC-DEDL de l'extrait à l'acétate d'éthyle du milieu solide avec résine : le composé majoritaire T22 azaphilone a été décrit précédemment et 3 nouveaux composés sont détectés (5 , 6 , et 7).....	112
Figure 86 : Structure du composé 5	112

Figure 87 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 5	113
Figure 88 : Spectre RMN ^1H du composé 5 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	113
Figure 89 : Détails des corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC du proton H-8 pour le composé 5 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	114
Figure 90 : Détails des corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC du carbone C-9 pour le composé 5 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	114
Figure 91 : Détails des corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC du proton aldéhydique H-1 pour le composé 5 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	115
Figure 92 : Détails des corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC du proton H-6 pour le composé 5 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	116
Figure 93 : Structures du composé 5 , de la DHMBA et de la rédoxcitrinine et de la citrinine	117
Figure 94 : Squelette générique des azaphilones.....	118
Figure 95 : Hypothèse de la biosynthèse du composé 5 (SAT : starter unit-ACP transacylase, KS = ketosynthase, AT = acyltransférase, PT = product template, ACP = acyl carrier protein, CM = C-méthyltransférase, R = réductase). La voie de biosynthèse du composé 5 est similaire à celle de la rédoxcitrinine.....	119
Figure 96 : Superposition des spectres RMN ^1H du proton des composés 5 (bleu, 600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) et 6 (rouge, 600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)	120
Figure 97 : Spectres de fragmentation SM/SM des composés 5 (en haut) et 6 (en bas)	120
Figure 98 : Structure du composé 6	121
Figure 99 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 6	121
Figure 100 : Spectre RMN ^1H du composé 6 avec l'agrandissement des signaux à $\delta_{\text{H}} = 7,34$ ppm et δ_{H} entre 6,19 et 6,36 ppm (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	122
Figure 101 : Détails des corrélations $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY pour le composé 6 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	123
Figure 102 : Détails des corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC pour le composé 6 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)	123
Figure 103 : Sous-structure de la molécule 6	124
Figure 104 : Déplacements chimiques de RMN ^{13}C prédits pour les structures (1E,3E)-1,3-pentadiène (en haut) et (1E,3Z)-1,3-pentadiène (en bas) du composé 6 (C-10/C-11 et C-12/C-13) (https://www.nmrdb.org/).....	125
Figure 105 : Structure de l'indigotide C avec le motif (1E,3E)-1,3-pentadiène en rouge.....	126
Figure 106 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 7	127
Figure 107 : Superposition des spectres RMN ^1H des composés 6 (rouge, 600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) et 7 (bleu, 600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	128
Figure 108 : Spectre RMN ^1H du composé 7 avec agrandissements des multiplets associés aux protons à $\delta_{\text{H}} = 2,22, 2,62, 5,38$ et $5,44$ ppm (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	128
Figure 109 : Détails des corrélations du spectre $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY pour le composé 7 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	129
Figure 110 : Chaîne latérale du composé 7	129
Figure 111 : La multiplicité et la constante de couplage de deux protons H-12 et H-13 déterminés par NMRnotebook (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).....	130
Figure 112 : [A] le cluster des ions à $m/z = 350,2075$ dans le réseau moléculaire des extraits bruts aux différentes conditions de culture de la souche 20-S19. [B] le même cluster du réseau moléculaire annoté par NAP ; aucune annotation proposée par NAP et GNPS. [C] Le chromatogramme LC-MS (ESI $^+$) de l'extrait acétate d'éthyle de la souche cultivée en milieu liquide avec la résine.	132
Figure 113 : les spectres de masses des ions observés dans le cluster des ions à $m/z = 350,2075$. [A] , [B] , [C] les ions dichargés ont été observés (à droite : l'agrandissement du massif isotopique de ces ions).....	133
Figure 114 : les spectres de masses des ions observés dans le cluster des ions à $m/z = 350,2075$ avec l'augmentation de la fenêtre d'acquisition des « scans ». Les ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ ont finalement pu être observés.	134
Figure 115 : Structures des molécules de famille des éméricines.	135
Figure 116 : L'ion à $m/z = 269,2111$ observé à $\text{Tr} = 8,590$ (en haut) et sa formule brute générée par MassHunter® (en bas).	136
Figure 117 : Structure du composé 11	137
Figure 118 : Spectre RMN ^1H du composé 11 (500 MHz, CDCl_3).....	137
Figure 119 : Détails des corrélations du spectre $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY des protons H-1' et H-2' pour le composé 11 (500 MHz, CDCl_3).....	138
Figure 120 : Sous-structure du composé 11	138
Figure 121 : Détails des corrélations du spectre $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY du proton H-3' pour le composé 11 (500	

MHz, CDCl ₃)	139
Figure 122 : Détails des corrélations du spectre ¹ H- ¹ H COSY pour le composé 11 (500 MHz, CDCl ₃)	139
Figure 123 : Structure du composé 11 avec les corrélations ¹ H- ¹³ C HMBC	140
Figure 124 : Les isomères cis/trans de la molécule diméthyltétrahydrofurane (figure adaptée de l'article de Mihailović, et al.)	141
Figure 125 : Hypothèse sur la stéréochimie relative du tétrahydrofurane du composé 11	141
Figure 126 : Mécanisme de dégradation de la naphthalène par la souche <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> TSH1 (figure reprise in extenso de l'article de Zeinali, et al.. Les composés entre crochets n'ont pas été détectés dans l'extrait de culture de la souche.....	142
Figure 127 : Structure de la molécule HS-6, isolée à partir de <i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	143
Figure 128 : Le réseau moléculaire de la souche <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> 20-S13 avec quelques clusters non annotés. Les différentes couleurs des nœuds correspondent à différentes souches d'actinobactéries possédant la même morphologie que la souche 20-S13.....	144
Figure 129 : Chromatogramme LC-MS (TIC-ESI +) de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche 20-S13 cultivée en milieu liquide (en bas) et les clusters d'intérêt du réseau moléculaire, générés à partir des extraits bruts de la souche cultivée sous différentes conditions. Dans cette figure, 3 clusters ont été mentionnés : un cluster contenant les molécules majoritaires de l'extrait, annotés comme des entérocinés par GNPS et par NAP ; un cluster avec des adduits NH ₄ ⁺ et un cluster avec des adduits Na ⁺ de la même molécule. L'extrait à l'acétate d'éthyle de la culture liquide est représenté par la couleur vert pomme.....	146
Figure 130 : Structure de l'entérociné et ses dérivés.....	147
Figure 131 : Comparaison des spectres SM/SM du composé 13 et la molécule présente dans le cluster des ions [M+NH ₄] ⁺	148
Figure 132 : Structure du composé 12	148
Figure 133 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 12	149
Figure 134 : Détails de corrélations du spectre ¹ H- ¹ H COSY du composé 12 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	149
Figure 135 : Détails des corrélations du spectre ¹ H- ¹ H COSY du composé 12 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	150
Figure 136 : Détails des corrélations du proton H-2'' du spectre ¹ H- ¹ H COSY pour le composé 12 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	150
Figure 137 : Détails de corrélations ¹ H- ¹³ C HMBC du proton H-2 du composé 12 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	151
Figure 138 : Détails des corrélations ¹ H- ¹³ C HMBC du proton H-1 et H-5 du composé 12 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	152
Figure 139 : Détails des corrélations ¹ H- ¹ H COSY des protons de la chaîne aliphatique du composé 12 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	152
Figure 140 : Détails des corrélations du spectre ¹ H- ¹³ C HMBC du composé 12 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	153
Figure 141 : Superposition des analyses RMN ¹ H des protons H-2a'/H-2b' du composé 12 à différents champs magnétiques dans le but de déterminer leurs multiplicités (vert, 500 MHz, rouge 700 MHz et bleu 800 MHz).....	154
Figure 142 : La multiplicité et la constante de couplage de deux protons H-2a' et H-2b', déterminés par NMRnotebook®.....	154
Figure 143 : Structure du composé 13	156
Figure 144 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé 13	156
Figure 145 : Superposition des spectres de proton ¹ H RMN du composé 12 (rouge, 500 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et composé 13 (bleu, 500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	157
Figure 146 : Représentation ORTEP du composé 13 par diffraction des rayons X	157
Figure 147 : Détails de corrélations du spectre ¹ H- ¹ H COSY du composé 13 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	158
Figure 148 : Spectre de proton RMN ¹ H du composé 13 avec l'agrandissement des signaux du méthine à δ _H = 2,59 ppm (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄)	158
Figure 149 : Détails de corrélations du spectre ¹ H- ¹³ C HMBC d'une sous-structure du composé 13 (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	159
Figure 150 : la chaîne aliphatique du composé 13	159
Figure 151 : Superposition des analyses ¹ H RMN du proton H-2' du composé 13 à différents champs	

magnétiques dans le but de déterminer sa multiplicité (vert, 700 MHz, rouge 500 MHz et bleu 800 MHz).	160
.....	160
Figure 152 : Multiplicités et constantes de couplage des deux protons H-2a' et H-2b', déterminés par NMRnotebook® (700 MHz, CH ₃ OH-d ₄)	160
Figure 153 : Spectre de proton RMN ¹ H du composé 13 avec agrandissement des signaux de protons de deux méthyles à δ _H = 1,15 ppm (doublet) et à δ _H = 1,17 ppm (700 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	161
Figure 154 : Stéréochimie relative des composés 12 et 13	163
Figure 155 : Différentes stratégies de priorisation utilisé dans ce projet de thèse.....	167
Figure 156 : Résumé des résultats obtenus de la souche <i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21 et la technique de culture SPEED.	168
Figure 157 : Résumé des résultats obtenus des souches priorisés de l'échantillon 20	169
Figure 158 : Profil de CLHP-DEDL de la sonde N-(4,6-dioxoheptyl) décanamide	179
Figure 159 : Protocole d'incubation de la sonde dans la culture de la souche avec ou sans la résine	180
Figure 160 : Protocole d'incubation de la sonde dans la culture de la souche avec ou sans la résine avec l'ajout de la sonde tous les trois jours.....	181
Figure 161 : Conditions de contrôle	182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Déplacements chimiques des protons (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et des carbones (125 MHz, CH ₃ OH-d ₄) du composé 2	86
Tableau 2 . Déplacements chimiques des protons (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et des carbones (150 MHz, CH ₃ OH-d ₄) du composé 3	90
Tableau 3 Déplacements chimiques des protons (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et des carbones du composé 4 (150 MHz, CH ₃ OH-d ₄)	101
Tableau 4 : Déplacements chimiques des protons (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et des carbones (150 MHz, CH ₃ OH-d ₄) du composé 5	116
Tableau 5 : Déplacements chimiques des carbones du motif (1E,3E)-1,3-pentadiène de l'indigotide C (150 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et du composé 6 (150 MHz, CH ₃ OH-d ₄).....	126
Tableau 6 : Déplacements chimiques des protons (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et des carbones (150 MHz, CH ₃ OH-d ₄) du composé 6	126
Tableau 7 . Déplacements chimiques des protons (600 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et des carbones (150 MHz, CH ₃ OH-d ₄) du composé 7	130
Tableau 8 . Déplacements chimiques des protons (500 MHz, CDCl ₃) et des carbones (125 MHz, CDCl ₃) du composé 11	140
Tableau 9 . Déplacements chimiques des protons (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et des carbones (125 MHz, CH ₃ OH-d ₄) du composé 12	155
Tableau 10 . Déplacements chimiques des protons (500 MHz, CH ₃ OH-d ₄) et des carbones (125 MHz, CH ₃ OH-d ₄) du composé 13	161
Tableau 11 : Les échantillons des mattes de Kopara avec des caractéristiques morphologiques différentes prélevés au premier point.....	175
Tableau 12 : Les paramètres de traitement MZmine des données LC-SM/SM :.....	185
Tableau 13 : Les paramètres pour la constuction du réseau moléculaire sur GNPS	186

INTRODUCTION GÉNÉRALE :

INTRODUCTION GÉNÉRALE :

Les substances naturelles constituent une source inestimable de structures privilégiées pour interagir avec les cibles biologiques¹. Les produits naturels offrent des structures uniques et très diversifiées par comparaison avec des molécules synthétiques conventionnelles. De 1981 à 2019, environ 64.9 % des médicaments commercialisés sont d'origine naturelle ou inspirés des produits naturels².

Les produits d'origine microbienne jouent un rôle important dans la recherche de nouvelles molécules portant des activités biologiques. De plus, il est possible d'accéder et de manipuler le génome des micro-organismes, ce qui a permis une meilleure compréhension de la machinerie biosynthétique et la régulation des composés bioactifs³.

L'histoire des antibiotiques d'origine microbienne a principalement retenu la découverte de la pénicilline à partir de *Penicillium notatum* par Alexander Fleming en 1928. Sa commercialisation plus d'une décennie plus tard a révolutionné la recherche et la découverte de molécules thérapeutiques. Le grand succès de la pénicilline a amené à un effort mondial les entreprises pharmaceutiques et les groupes de recherche à assembler des collections des micro-organismes afin de découvrir de nouveaux antibiotiques et de compléter l'arsenal thérapeutique à la disposition des médecins et du grand public⁴.

Au début des années 1940, plusieurs criblages de la capacité de production des molécules bioactives de plusieurs bactéries ont été réalisés, conduisant à l'identification de plus de 2000 antibiotiques de différentes classes⁵. Selon l'article de revue de « Subramani et Sipkema » en 2019, 60 % des antibiotiques connus ont été produits par les streptomycètes entre 1950 et 1970. Parmi les 500 000 composés naturels décrits, il existe 70 000 composés d'origine microbienne (bactéries et champignons), dont 29 % dérivés des actinomycètes. Par conséquent, ces micro-organismes sont considérés comme une source importante de composés bioactifs. Cependant, seulement 1 % des actinomycètes sont identifiés et étudiés⁶.

L'effort de recherche des molécules thérapeutiques à partir des micro-organismes a été récompensé par la découverte, entre autres, de la streptomycine, du

¹ Saldivar-Gonzalez, *et al.*, *Chemical science*, **2022**, 13, 1526-1546.

² Newman and Cragg, *Journal of Natural Products*, **2020**, 83, 770-803.

³ Maithani, *et al.*, *Microbiological research*, **2022**, 261, 127053.

⁴ Swann, *The British Journal for the History of Science*, **2009**, 25, 376-377.

⁵ Gverzdys and Nodwell, *Journal of Bacteriology*, **2016**, 198, 1965-1973.

⁶ Subramani and Sipkema, *Marine Drugs*, **2019**, 17, 249.

chloramphénicol, de la céphalosporine C, de l'érythromycine A ou encore de la vancomycine (**Figure 1**). Tous ces composés, ou leurs dérivés, sont encore utilisés comme médicaments jusqu'à nos jours⁷.

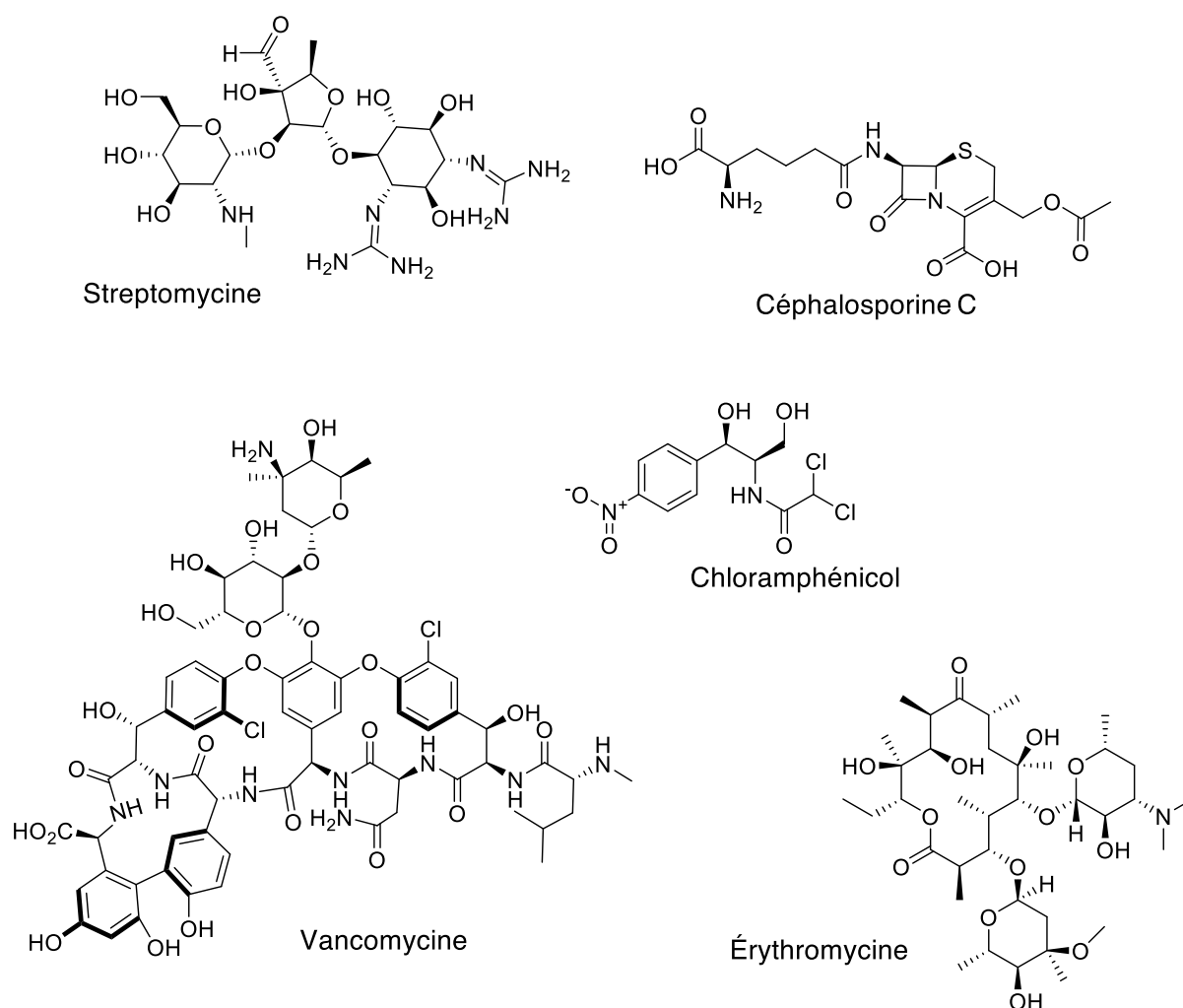


Figure 1 : Exemples des molécules thérapeutiques isolées à partir des micro-organismes

Malgré la découverte de plusieurs antibiotiques possédant différents mécanismes d'action, les bactéries ont développé des mécanismes d'adaptation leur permettant de résister à l'action de ces molécules. L'abréviation « ESKAPE » a été proposée par Louis Rice pour décrire un groupe de six bactéries pathogènes nosocomiales résistantes telles qu'*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et les espèces du genre *Enterobacter*⁸.

Les gènes de résistance aux antibiotiques sont présents dans l'environnement

⁷ Butler, *J. Nat Prod*, **2004**, 67, 2141-53.

⁸ Rice, *The Journal of infectious diseases*, **2008**, 197, 1079-81.

et s'insèrent dans le génome des agents pathogènes par transfert de gène horizontal⁹.

Les membranes cellulaires bactériennes représentent une des causes de l'antibiorésistance car elles empêchent les antibiotiques de pénétrer dans la cellule bactérienne. Le phénomène d'antibiorésistance est plus important chez les bactéries à Gram négatifs car elles possèdent une membrane externe supplémentaire composée de lipopolysaccharide (LPS), qui forment un réseau hydrophile et empêchent la pénétration des composés hydrophobes. Leur membrane interne, composée quant à elle d'une bicouche phospholipidique et de protéines membranaires, bloque le passage de composés hydrophiles. Par conséquent, les membranes bactériennes constituent une barrière impénétrable par les médicaments. De plus, les bactéries présentent ainsi des pompes à efflux qui expulsent des médicaments qui ont déjà traversé les membranes cellulaires¹⁰. Tous ces mécanismes rendent les bactéries encore plus résistantes aux antibiotiques.

Depuis 2016, la lutte contre le phénomène d'antibiorésistance est devenue la priorité mondiale par les Nations Unies et l'un des grands enjeux du XXI^e siècle en termes de santé publique (<https://www.msf.fr/>). Les bactéries multirésistantes causent 33 000 morts en Europe (<https://health.ec.europa.eu/>) et 23 000 morts aux États-Unis par an^{11,12}. L'augmentation mondiale de l'incidence des bactéries multirésistantes justifie de nouveaux efforts dans la recherche et la découverte des antibiotiques. Il est donc nécessaire de trouver non seulement de nouvelles molécules, mais de nouveaux squelettes structuraux ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques. Les substances naturelles jouent toujours un rôle très important dans la découverte de nouveaux antibiotiques avec environ 70 % des composés qui sont soit des produits naturels, soit leurs dérivés hémi-synthétiques¹³. Seules trois des 20 classes d'antibiotiques disponibles sur le marché sont d'origine synthétique (sulfamides, fluoroquinolones et oxazolidinones). Les produits naturels microbiens présentent la principale source d'antibiotiques actuellement utilisés en clinique¹⁴.

Ce manuscrit sera divisé en quatre principaux chapitres. Le premier traitera des défis relatifs à la découverte de substances bioactives d'origine microbienne ainsi que les approches innovantes pour relever ces défis. Le deuxième chapitre introduira notre source de micro-organismes et la stratégie de priorisation permettant de cibler les micro-organismes intéressants. Le troisième chapitre consiste à détailler les procédures de recherche des micro-organismes marins, de l'isolement des micro-organismes et de la priorisation des souches intéressantes jusqu'à l'obtention finale

⁹ Schneider, *Antibiotics*, **2021**, *10*, 842.

¹⁰ Lewis, *Cell*, **2020**, *181*, 29-45.

¹¹ Dadgostar, *Infection and Drug Resistance*, **2019**, *12*, 3903

¹² Baym, *et al.*, *Science*, **2016**, *351*, aad3292.

¹³ O'Shea and Moser, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *51*, 2871-2878.

¹⁴ Teta, *et al.*, *J. Nat Prod*, **2017**, *80*, 2530-2535.

des produits purs. Enfin, le dernier chapitre détaillera les méthodes et les expériences utilisées pour ce projet de thèse.

CHAPITRE I :

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

Comme nous le savons déjà, la recherche de nouvelles molécules à partir des sources naturelles est extrêmement difficile, longue et coûteuse. Toutes les procédures d'isolement, de purification et d'élucidation structurale des molécules nécessitent des investissements considérables en équipements techniques, en temps et en ressources humaines.

Dans ce chapitre, nous allons nous focaliser sur les défis rencontrés dans la découverte de molécules d'origine microbienne sans revenir sur les difficultés communément rencontrées en chimie des substances naturelles comme la complexité des extraits bruts et la redécouverte des molécules connues.

- Les défis liés aux produits d'origine microbienne et à la découverte d'antibiotiques

1.1 Les micro-organismes non-cultivables et les gènes silencieux/cryptiques.

Depuis plus d'un demi-siècle, les micro-organismes terrestres et marins sont connus pour la production de molécules actives. Cependant, il est difficile d'accéder à l'intégralité des métabolites produits par les micro-organismes dans leur habitat naturel. De nombreux micro-organismes environnementaux, les actinobactéries incluses, ne peuvent pas être cultivés de façon optimale ou cessent de produire des composés antibiotiques lorsqu'ils ne sont plus en interaction avec leur environnement¹⁵. Des analyses métagénomiques d'échantillons telluriques et marins ont montré que 99 % des micro-organismes sont « non cultivables »¹⁶, cette formule étant continuellement reprise.

De plus, un génome microbien peut contenir des clusters de gènes « cryptiques » ou « silencieux ». Le terme « cryptique » décrit les clusters de gènes de biosynthèse (BGC : *biosynthetic gene cluster*) inconnus et le terme « silencieux » décrit les BGC présents dans le génome mais qui ne sont pas exprimés, ou très faiblement dans des conditions standards de laboratoire. Par exemple, un génome d'une souche d'actinomycètes peut contenir entre 20 et 50 *clusters* de gènes de biosynthèse de métabolites spécialisés mais seuls certains gènes sont exprimés en condition de culture microbienne classique¹⁷. Le séquençage complet ou partiel du génome de plusieurs espèces de *Streptomyces* a montré que le même génome peut contenir

¹⁵ Birer, *Bacterial microbiota of ant's cuticle in French Guiana : antibiotic activities and community ecology*, Thèse de Doctorat en Chimie, Université de Guyane, **2017**.

¹⁶ Lewis, *Nature reviews. Drug Discovery*, **2013**, 12, 371-87.

¹⁷ Hoskisson and Seipke, *mBio*, **2020**, 11, 460-466.

jusqu'à 30 *clusters* de gènes « cryptiques » appartenant à des métabolites spécialisés¹⁸. Cela montre que les micro-organismes représentent potentiellement une source très importante de nouveaux produits naturels mais qu'il est nécessaire de trouver des approches pour accéder à cette diversité "cachée".

1.2 Accéder à des sources de micro-organismes inexplorées

Malgré les efforts de recherche des molécules d'origine microbienne, il y a moins de 1 % de micro-organismes qui ont été explorés chimiquement jusqu'à présent¹⁹. Il est nécessaire d'explorer des nouvelles sources de micro-organismes.

Les micro-organismes sont présents dans tous les écosystèmes : dans le sol, dans les eaux douces, marines ou saumâtres, dans les environnements dits « extrêmes » (profondeurs océaniques, sédiments profonds), permafrost, etc.), associés à des insectes sociaux (fourmis coupeuses de feuilles, termites), sur la peau et dans l'intestin des animaux²⁰. (**Figure 2**)

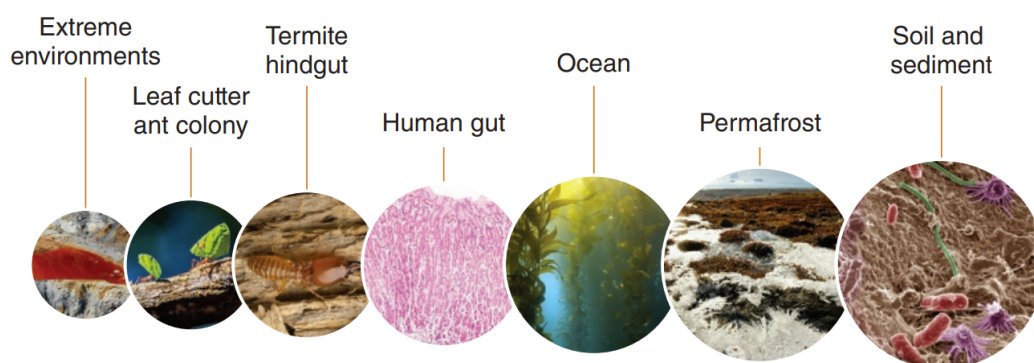


Figure 2 : Diversité du monde microbien et de ses écosystèmes (figure reprise *in extenso* de l'article de White, *et al.*)²⁰

Les micro-organismes ont la capacité de s'adapter à leur environnement afin de survivre et de se développer dans différentes niches écologiques. Par conséquent, l'exploration des micro-organismes des écosystèmes atypiques (les environnements extrêmes, les tapis microbiens marins, etc...) permet d'augmenter la probabilité de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques.

Le projet de recherche « Science à la pelle », a été lancé récemment en 2022 par une équipe de chercheurs de l'Université de Paris (Unité INSERM 1284), dans le but de découvrir des antibiotiques à partir des micro-organismes isolés de divers

¹⁸ Aigle, *et al.*, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **2014**, 41, 251-63.

¹⁹ Brahmachari, *Natural Products in Drug Discovery: Impacts and Opportunities - An Assessment*, **2011**, 1-199.

²⁰ White, *et al.*, *Nature Protocols*, **2016**, 11, 2049-2053.

échantillons de sols (dans nos jardins, nos parcs, les forêts et les espaces naturels) en France métropolitaine et en Corse. A partir de ces échantillons, les micro-organismes seront ensuite isolés (**Figure 3**). Leur génome sera ensuite analysé pour détecter les *clusters* de gènes associés à des voies de biosynthèse de molécules fonctionnelles ([Science à la pelle \(science-a-la-pelle.fr\)](http://science-a-la-pelle.fr)).



Figure 3 : Photos des collections de souches isolées à partir de divers échantillons du sol (<https://www.science-a-la-pelle.fr/>).

- Les approches innovantes pour relever les défis liés aux produits d'origine microbienne et à la découverte d'antibiotiques.

Les principaux défis dans la recherche des nouvelles substances d'origine microbienne à activité antibiotique et les approches innovantes pour relever ces défis sont présentés sur la **Figure 4**.

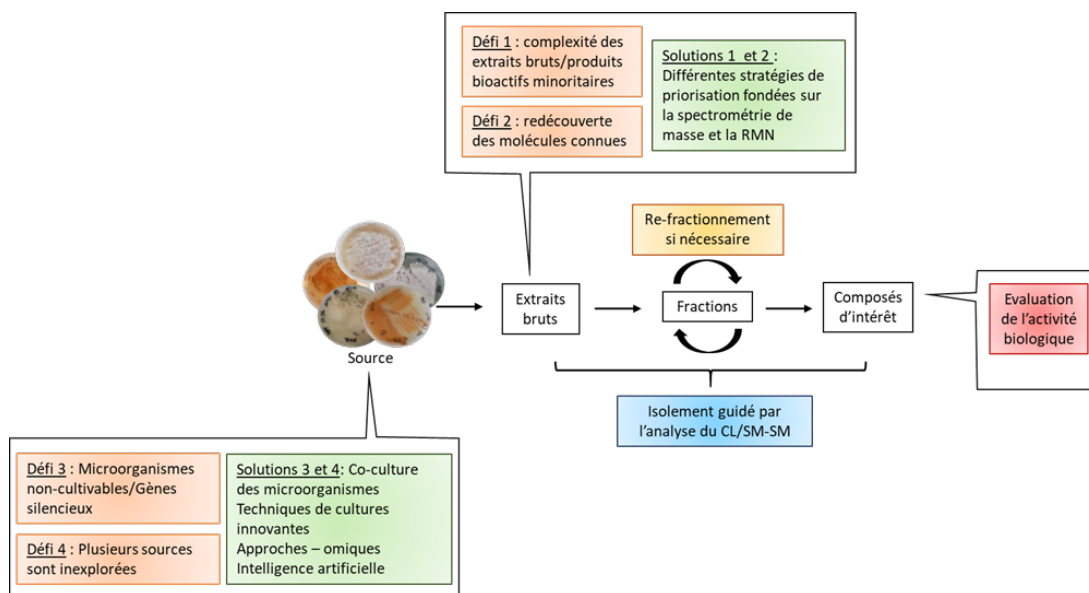


Figure 4 : "Workflow" d'isolement ciblé. Les défis et les solutions pour chaque étape d'isolement.

Dans ce chapitre, les solutions pour les défis communément rencontrés dans le domaine des substances naturelles ne seront pas traitées. Seules les approches innovantes qui ont un lien avec les micro-organismes seront abordées.

2.1 Co-culture de micro-organismes

La co-culture de micro-organismes est une stratégie intéressante qui permet de stimuler la production de substances dites de défense. Cette approche s'inspire du fait de l'omniprésence des communautés microbiennes dans la nature. Au sein de ces communautés, les micro-organismes interagissent par l'intermédiaire de molécules de signalisation ou de défense qui sont potentiellement des nouveaux « *leads* » pour la découverte de médicaments²¹.

La co-culture de micro-organismes consiste donc à cultiver différents micro-organismes dans un environnement limité en nutriments et en espace, ce qui entraîne une compétition de ressources entre eux. Par conséquent, ils vont produire des métabolites spécialisés qui sont généralement impliqués dans les mécanismes de défense ou de communication « inter-souche » ou « inter-spécifique »²².

²¹ Bertrand, *et al.*, *Biotechnology Advances*, **2014**, 32, 1180.

²² Birer, *Bacterial microbiota of ant's cuticle in French Guiana : antibiotic activities and community ecology*, Thèse de Doctorat en Chimie, Université de Guyane, **2017**.

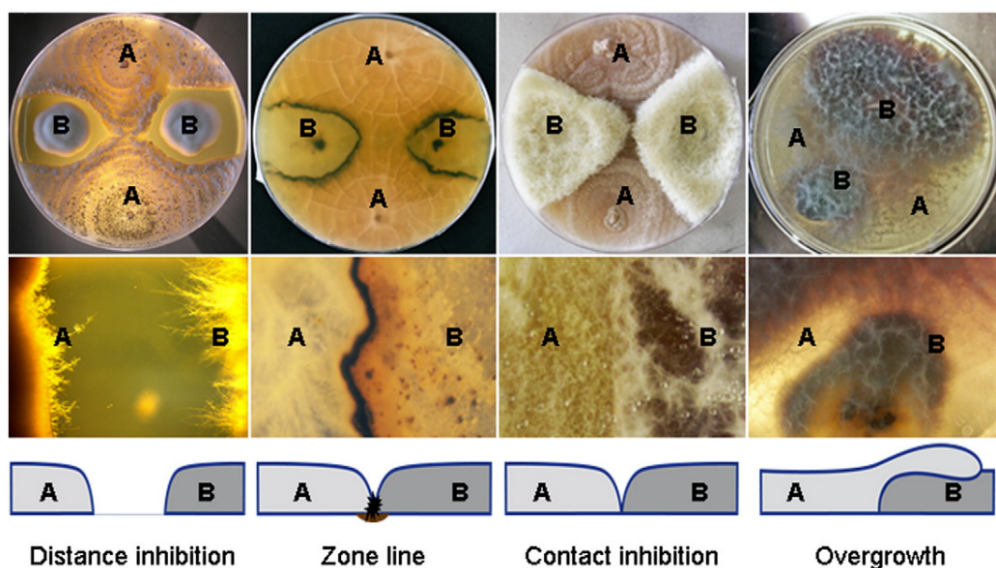


Figure 5 : Les interactions morphologiques entre deux champignons en co-culture (figure reprise *in extenso* de l'article de Bertrand, *et al.*)²¹

Quatre types d'interactions morphologiques entre les micro-organismes cultivés en culture sur boîtes de gélose ont été observés lors des expériences de co-culture : le premier type d'interaction représente une zone d'inhibition entre les deux micro-organismes (« *distance inhibition* »), le deuxième montre les deux micro-organismes entrant en contact et formant une ligne de démarcation (« *zone line* »), les deux micro-organismes cessent de se développer lorsqu'ils entrent en contact (« *contact inhibition* ») dans le troisième type et sur le dernier type, nous observons un des deux micro-organismes qui se développe au-dessus de l'autre (« *overgrowth* ») (**Figure 5**).

Les molécules impliquées dans l'interaction des micro-organismes sont difficilement détectables en raison de la complexité des extraits microbiens. Par conséquent, les méthodes analytiques avancées comme la métabolomique et les méthodes de spectrométrie de masse sont nécessaires pour détecter ces composés.

Boya *et al.* a utilisé la technique d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI (MALDI-MSI : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Mass Spectrometry Imaging*) couplée à la technique des réseaux moléculaires afin d'étudier les interactions microbiennes dans la symbiose tripartite impliquant fourmi, bactérie et champignon. Pour cela, les bactéries isolées à partir de la fourmi *Acromyrmex echinaior* et le champignon pathogène *Escovopsis* sp. sont co-cultivés dans des boîtes de Pétri. Les auteurs ont utilisé MALDI-MSI pour visualiser la distribution des antimicrobiens dans les zones d'inhibition entre les micro-organismes. Le réseau moléculaire est ensuite utilisé pour dérépliquer les composés détectés dans ces zones.

Cette approche a permis aux auteurs d'identifier différents composés à partir de

différentes bactéries associées à la fourmi. Par exemple, les antibiotiques actinomycines D, X2 et X0 β , produits par la bactérie *Streptomyces* CBR38 ; les macrolides élaiophyline, éfomycine A et éfomycine G, produits par la bactérie *Streptomyces* CBR53. Cette dernière présente un diamètre de zone d'inhibition de $3,47 \pm 0,51$ mm contre *Escovopsis* TZ49, une zone d'inhibition de $4,49 \pm 0,15$ mm de diamètre a été observée pour la co-culture de *Streptomyces* sp. CBR38 et *Escovopsis* sp. ACRO424. De plus, les composés shearinines D, F et J du pathogène *Escovopsis* TZ49 ont été également détectés (**Figure 6**). Les molécules élaiophyline, actinomycine X0 β et shearinines ont été détectées pour la première fois dans cette symbiose²³.

²³ Boya, et al., *Scientific Reports*, 2017, 7, 5604.

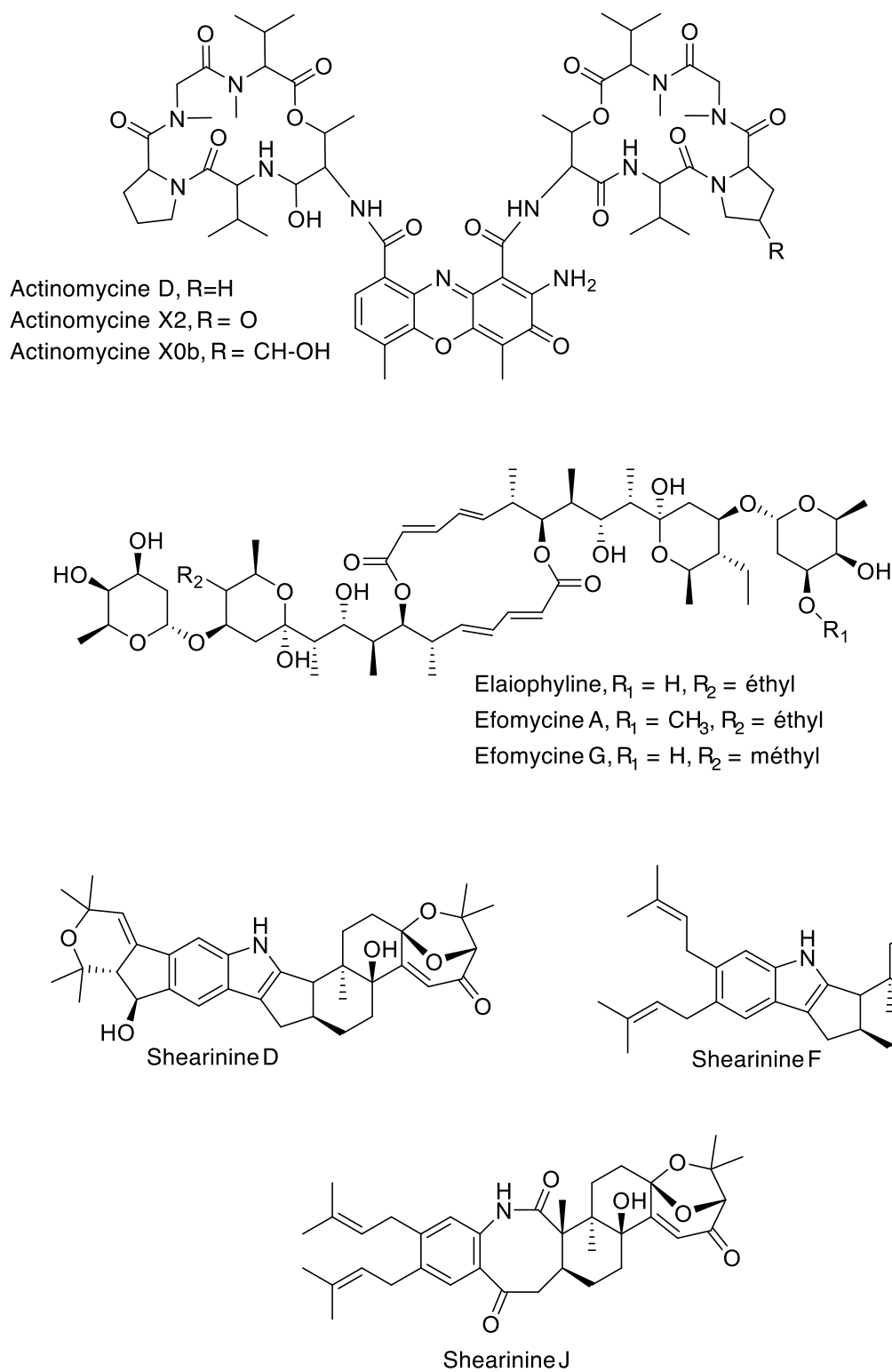


Figure 6 : Structures des composés détectés à partir de la co-culture de micro-organismes dans le cadre des travaux de Boya *et al.*

Plusieurs autres composés bioactifs produits durant des expériences de co-

culture ont été décrits. Par exemple, la formation des molécules antifongiques comme le stemphypéryléol et l'alterpryléol à partir des co-cultures d'*Alternaria tenuissima* et de *Nigrospora sphaerica*. Le composé stemphypéryléol bloque la croissance de *Nigrospora sphaerica* à 200 μM tandis que la molécule d'actidione, un antifongique connu, à la même concentration utilisée, ne peut pas d'inhiber la croissance de ce champignon²⁴ (**Figure 7**).

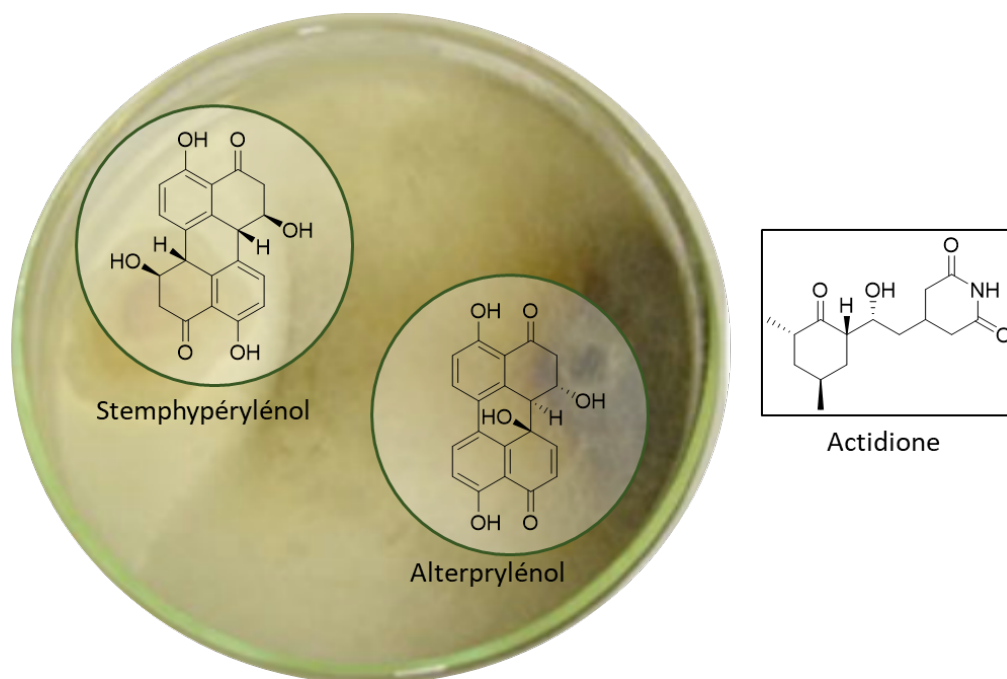


Figure 7 : Structures des molécules produites lors de la co-culture d'*Alternaria tenuissima* et *Nigrospora sphaerica* : le stemphypéryléol, l'alterpryléol et l'actidione, un antifongique utilisé en tant que contrôle positif dans le test d'activité antifongique.

Nous notons également la formation du lobocampactol, un diterpène présentant plusieurs applications potentielles comme agent antifouling, anti-oxydant et antitumoral à partir de la culture de *Streptomyces cinnabarinus* PK209 et de la bactérie marine *Alteromonas* sp. KNS-16²⁵ (**Figure 8**).

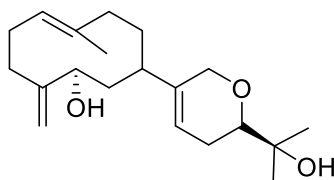


Figure 8 : Le lobocampactol produit à partir de la co-culture de *Streptomyces cinnabarinus* PK209 et de la bactérie marine *Alteromonas* sp. KNS-16.

²⁴ Chagas, et al., *Journal of Chemical Ecology*, **2013**, 39, 1335-42.

²⁵ Cho and Kim, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2012**, 76, 1849-54.

Ces différents exemples montrent que la co-culture de micro-organismes représente une approche potentielle pour stimuler la production de molécules bioactives par les micro-organismes. Cependant, l'étude d'interaction entre les micro-organismes est une tâche difficile à cause de la nature complexe et la diversité chimique de leurs métabolomes. De plus, l'identification de composés responsables de cette interaction est encore plus compliquée et demande beaucoup de rigueur en raison de la variabilité chimique des micro-organismes durant la co-culture. Des méthodes analytiques avancées, telles que l'étude des profils chimiques des extraits par la spectrométrie de masse ou MALDI-MSI directe de la co-culture, sont des approches intéressantes pour étudier le phénomène d'induction des molécules bioactives grâce à la co-culture²⁶.

2.2 Les techniques de culture innovantes

Afin de tenter de résoudre les problèmes de culture des micro-organismes, dits « non-cultivables », plusieurs stratégies ont également été proposées²⁵. Nous pouvons diviser ces stratégies de culture en trois catégories : (i) les méthodes de culture basées sur la diffusion membranaire, (ii) celles basées sur les techniques de la microfluidique (SlipChip²⁷ et l'incubateur microbien à micro-échelle nanoporeux²⁸) et enfin (iii) les méthodes basées sur le tri cellulaire (*Raman-activated cell sorting* (RACS)²⁹ et sur l'hybridation *in situ* en fluorescence appliquée aux cellules vivantes (live-FISH)³⁰).

Nous n'allons pas détailler les méthodes de culture fondées sur la microfluidique et le tri cellulaire car, à notre connaissance, il n'existe pas encore d'exemples de molécules antibiotiques découvertes en utilisant ces méthodes. Cependant, il a été montré que ces méthodes sont efficaces pour isoler des micro-organismes non-cultivables dans les conditions de culture standard. Seules les techniques de culture basées sur la diffusion membranaire seront discutées ci-dessous.

2.2.1 Technologie « iChip »

La technologie « iChip » a été développée pour isoler et cultiver des micro-organismes *in situ* dans leur environnement dans le but de réussir à cultiver les micro-organismes non-cultivables dans les conditions de culture de laboratoire. Ce dispositif a été conçu par la start-up NovoBiotic Pharmaceuticals, fondée par Kim Lewis et Slava Epstein. Cette technique consiste à placer directement la plaque centrale d'iChip dans un milieu riche en micro-organismes (**Figure 9A**). Cela permet de capturer en

²⁶ Bertrand, *et al.*, *Biotechnology Advances*, **2014**, 32, 1180-204.

²⁷ Du, *et al.*, *Lab on a Chip*, **2009**, 9, 2286-92.

²⁸ Ge, *et al.*, *Lab on a Chip*, **2016**, 16, 480-8.

²⁹ Lau, *et al.*, *Lab on a Chip*, **2008**, 8, 1116-20.

³⁰ Batani, *et al.*, *Scientific reports*, **2019**, 9, 18618.

moyenne une cellule microbienne dans chaque puit de la plaque (**Figure 9B**). La plaque centrale sera ensuite protégée par une membrane inférieure et une membrane supérieure. Des vis ont été utilisées pour bien fixer ces trois parties et fournir une pression suffisante pour sceller le contenu de chaque puit. Chaque puit devient une chambre de diffusion miniature contenant statistiquement une seule cellule de micro-organisme (**Figure 9C**)³¹.

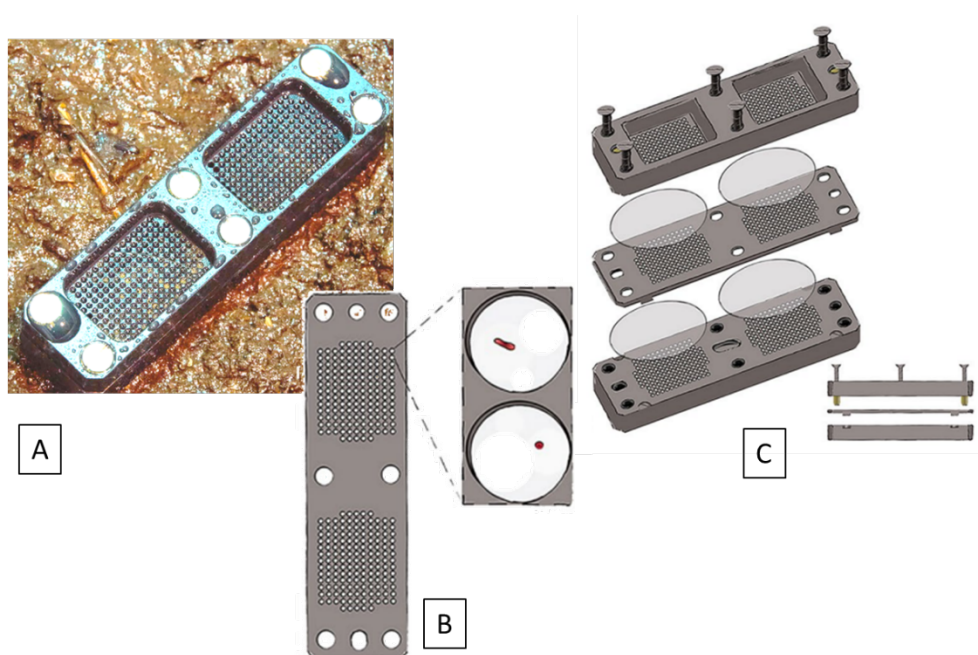


Figure 9 : la technique de culture "iChip". [A] la plaque centrale d'iChip est placée dans le sol riche en micro-organismes, [B] une seule cellule peut-être capturée dans chaque puit, [C] la plaque centrale est scellée à l'intérieur de deux membranes avec des vis. Cette figure a été adaptée à partir des figures de Berdy *et al.*³²

Cette technique de culture a permis d'isoler la teixobactine (**Figure 10**), une nouvelle molécule antibactérienne, à partir d'*Eleftheria terrae* (une nouvelle espèce de Bêtaprotéobactérie). La teixobactine a montré une forte efficacité contre les bactéries à Gram positif comme celles des genres *Mycobacterium* et *Staphylococcus*, et sans aucune résistance détectée jusqu'à présent³³. Cette molécule a ainsi montré une efficacité très prometteuse *in vivo* sur les modèles animaux de la tuberculose, qui est actuellement un problème majeur de santé publique ([Press Releases — Novobiotic Pharmaceuticals](#)).

³¹ Nichols, *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **2010**, 76, 2445-50.

³² Berdy, *et al.*, *Nature Protocols*, **2017**, 12, 2232-2242.

³³ Jung, *et al.*, *Marine Life Science & Technology*, **2020**, 3, 148-161.

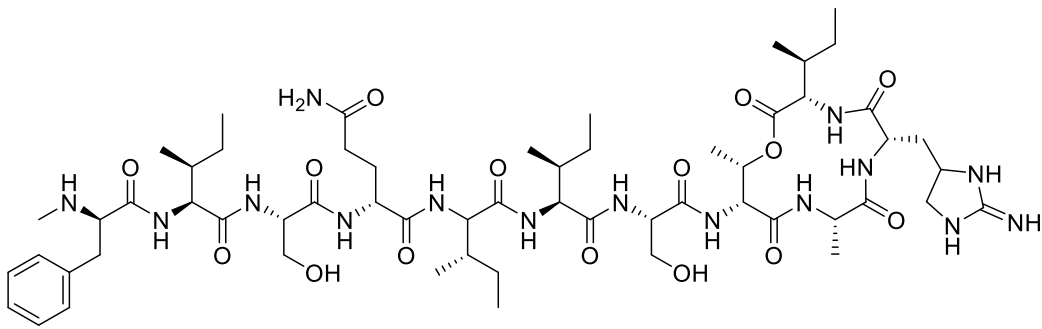


Figure 10 : Structure de la teixobactine

2.2.2 Chambre à membrane à fibres creuses (*Hollow-Fiber Membrane Chamber*)

Cette technique consiste à utiliser plusieurs tubes poreux reliés par des seringues qui fonctionnent comme des chambres d'isolement cellulaire. Une suspension d'une seule cellule seraensemencée dans chacun de ces tubes à l'aide des seringues qui y sont connectées (**Figure 11A**). Ces tubes seront ensuite immergés dans un échantillon aqueux du site environnemental en présence des facteurs de croissance (**Figure 11B**).

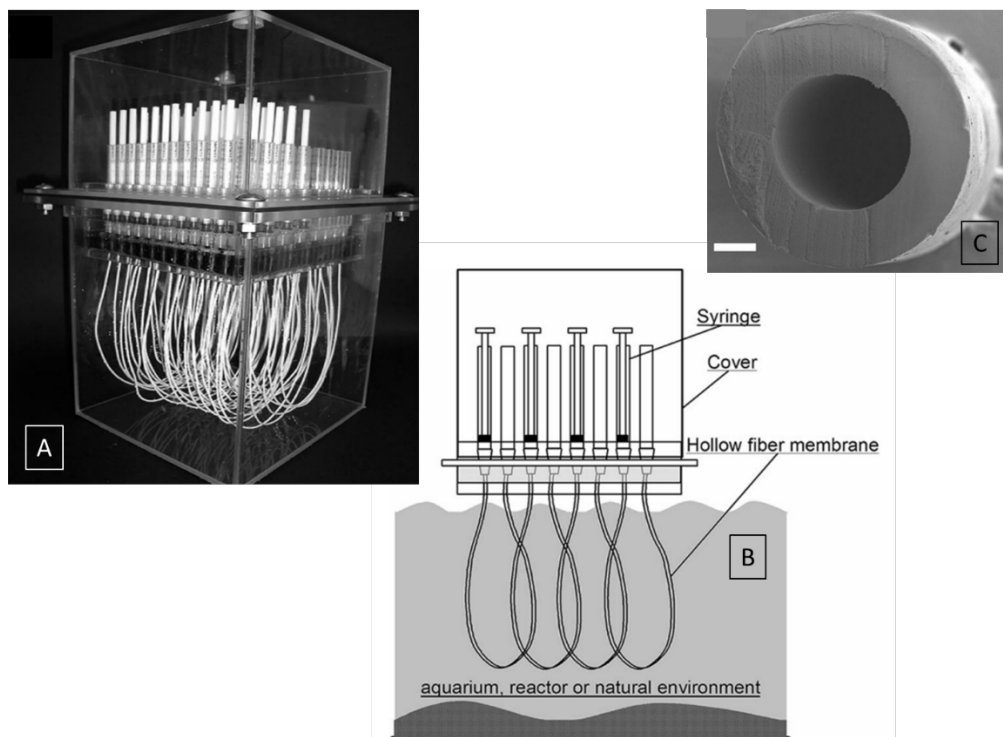


Figure 11 : Schéma du système de chambre à membrane à fibres creuses [A], [B] ; coupe transversale d'une fibre creuse observée au microscope électronique à balayage – la barre représente 200 µm [C]. Cette figure a été adaptée à partir des

figures d'Aoi *et al.*³⁴

Cette technique permet d'isoler plus de nouveaux phylotypes³⁵ avec une très grande diversité au niveau des espèces par rapport à la méthode de culture standard en boîtes de Pétri³³. Cependant, il n'y a pas encore d'exemple de molécules antibiotiques découvertes grâce à cette technique de culture.

Il est très difficile de reproduire le même habitat naturel avec ses facteurs de croissance pour les micro-organismes en conditions de culture standards aux laboratoires. Les méthodes citées précédemment ont pour but d'imiter l'environnement naturel des micro-organismes en utilisant une membrane perméable avec des pores qui sont capables de diffuser les facteurs de croissance, les nutriments, les composés de signalisation et les métabolites dont les micro-organismes ont besoin pour se développer, mais pas les cellules microbiennes.

2.3 Approche génomique en utilisant la biologie moléculaire

Les métabolites spécialisés microbiens sont le produit final d'un ensemble de réactions de biosynthèse, qui sont catalysées par des enzymes. Ils ne sont pas utilisés de façon permanente par les micro-organismes, leurs gènes restent silencieux et ne sont exprimés qu'en cas de besoin (en cas de défense, de survie dans un environnement compétitif, etc.). Il est donc nécessaire d'étudier l'intégralité de l'information génétique des micro-organismes et particulièrement les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des métabolites spécialisés³⁶.

Le séquençage du génome entier des micro-organismes est une stratégie clé qui permet la découverte de nouveaux métabolites. Les gènes impliqués dans la biosynthèse des métabolites spécialisés codent pour les enzymes appartenant à des classes différentes comme les enzymes de synthèse des peptides non ribosomiaux (NRPSs), les synthases de polyacétates (PKS)³⁷, les peptides ribosomiaux et modifiés post-traductionnellement, des terpènes, ainsi que les enzymes impliquant dans la biosynthèse de certains alcaloïdes³⁸ (par exemple, le diméthylallyl tryptophane synthase, une enzyme impliquée dans la première réaction de la voie de biosynthèse des alcaloïdes dérivés d'ergoline : des lysergamides présents chez les champignons de la famille Clavicipitaceae et des alcaloïdes de type clavine chez les champignons

³⁴ Aoi, *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **2009**, *75*, 3826-33.

³⁵ Un phylotype est une définition opérationnelle utilisée pour regrouper des individus phylogénétiquement proches

³⁶ Schroeckh, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2009**, *106*, 14558-14563.

³⁷ Navarro-Munoz, *et al.*, *Nature Chemical Biology*, **2020**, *16*, 60-68.

³⁸ Hemmerling and Piel, *Nature Reviews. Drug discovery*, **2022**, *21*, 359-378.

de l'ordre Eurotiales (des fumigaclavines A, B, and C chez *Aspergillus fumigatus*^{39,40}) ; et des clusters de gènes codant pour des enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse de la guanitoxine, une neurotoxine de la cyanobactérie *Sphaerospermopsis torques-reginae* ITEP-024, décrite récemment par l'équipe de Moore⁴¹) (**Figure 12**).

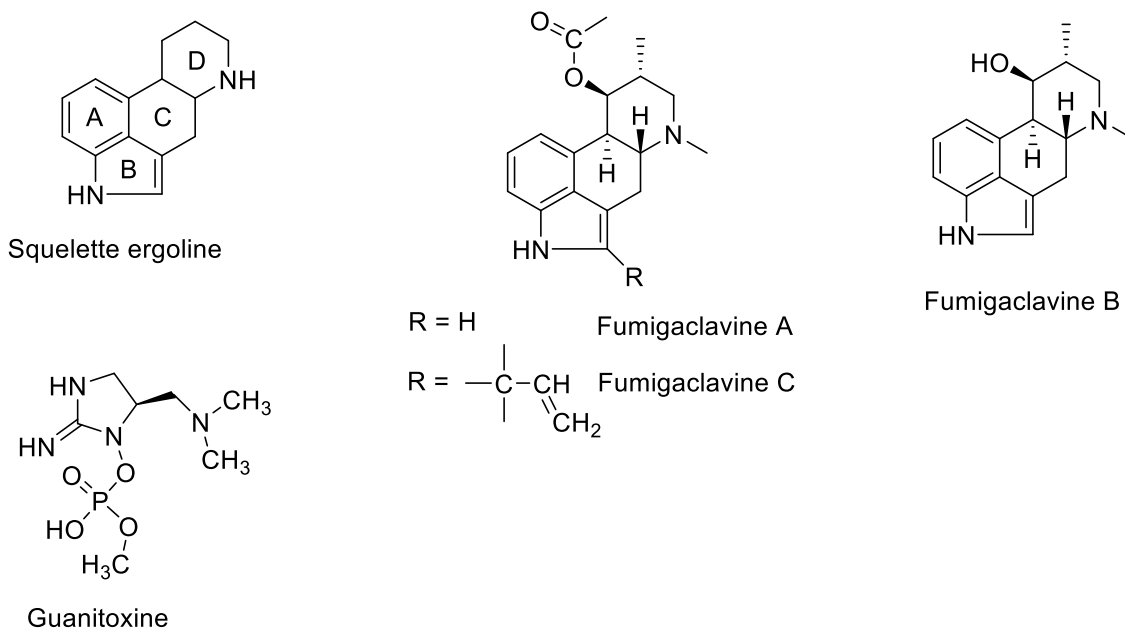


Figure 12 : Structures des alcaloïdes dérivés ergoline et de la guanitoxine

Dans l'approche génomique, les BGC sont d'abord identifiés par les outils informatiques et les logiciels spécialisés tels que antiSMASH, SMURF, and NP searcher⁴² et ensuite les enzymes codés par les gènes appartenant à ces BGC et leurs produits biosynthétiques seront prédits.

³⁹ Metzger, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2009**, 106, 14309-14314.

⁴⁰ Coyle and Panaccione, *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**, 71, 3112-8.

⁴¹ Lima, *et al.*, *J Am Chem Soc*, **2022**, 144, 9372-9379.

⁴² Maithani, *et al.*, *Microbiological Research*, **2022**, 261, 127053.

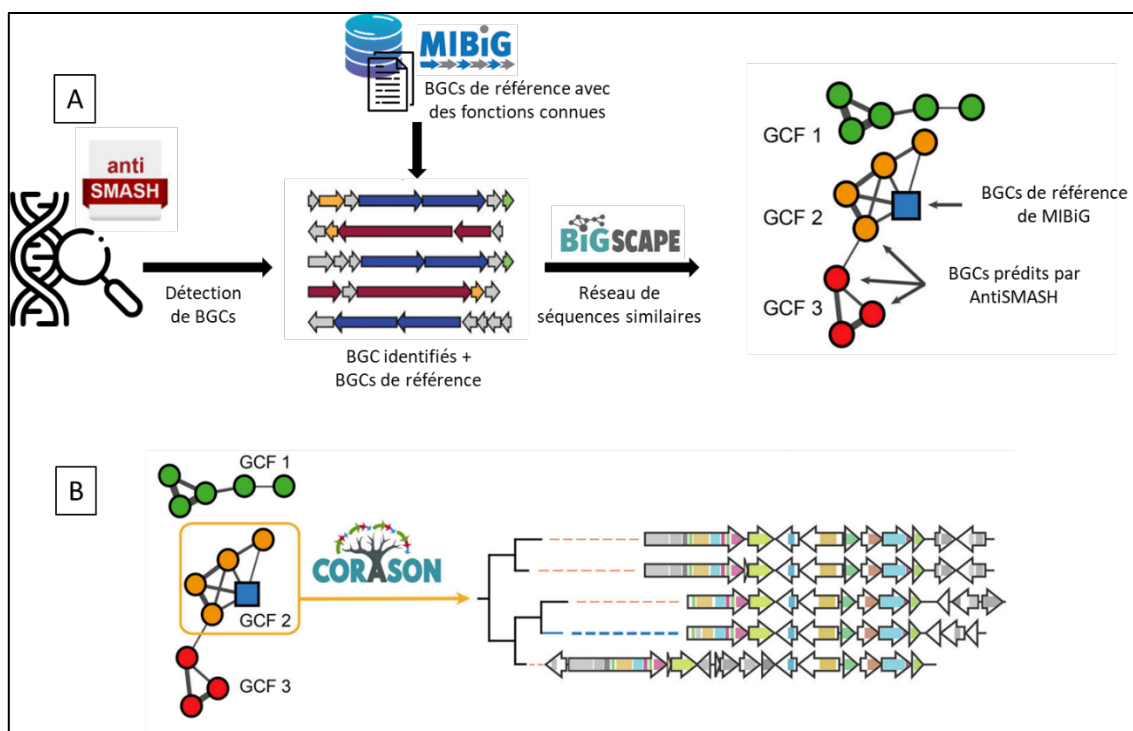


Figure 13 : « Workflow » de l'approche génomique. **[A]** Les BGCs peuvent être identifiés dans le génome microbien en utilisant antiSMASH ou les outils adaptés. MIBiG, une base de donnée de BGCs avec des fonctions connues, peut être utilisée pour identifier ces BGCs. BiG-SCAPE est utilisé pour organiser les BGCs similaires en famille de clusters de gènes (GCFs). Les BGCs référencés dans MIBiG sont indiqués en bleu. **[B]** CORASON est ensuite employé pour exploiter les relations évolutives des BGCs dans chaque GCF. Figure adaptée à partir des figures de Navarro-Munoz *et al*⁴³ et Van der Hooft *et al*⁴⁴.

Afin d'accéder efficacement aux informations des BGCs et leurs produits spécifiques, la communauté « *Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster (MIBiG)* » a été introduit⁴⁵. MIBiG augmente la fiabilité des résultats de la prédiction en comparant les BGCs identifiés avec ceux dans les bases de données⁴⁶. Par la suite, le logiciel BiG-SCAPE (*Biosynthetic Gene Similarity Clustering and Prospecting Engine*) peut être utilisé pour construire les réseaux de similarité des séquences de BGCs et les regrouper en familles de *clusters* de gènes (GCFs). BiG-SCAPE permet d'identifier rapidement les familles de *clusters* de gènes avec des BGCs connus dans MIBiG, conduisant à l'identification des nouveaux BGCs analogues (**Figure 13A**). Si ces GCFs contiennent des BGCs inconnus dans MIBiG, il y a potentiellement de

⁴³ Navarro-Munoz, *et al.*, *Nature Chemical Biology*, **2020**, *16*, 60-68.

⁴⁴ Van der Hooft, *et al.*, *Chemical Society Reviews*, **2020**, *49*, 3297-3314.

⁴⁵ Kautsar, *et al.*, *Nucleic Acids Research*, **2020**, *48*, D454-D458.

⁴⁶ Hautbergue, *et al.*, *Natural Product Reports*, **2018**, *35*, 147-173.

nouveaux outils⁴⁷. CORASON (*CORe Analysis of Syntenic Orthologs to prioritize Natural Product Biosynthetic Gene Clusters*)⁴⁸ est un algorithme complémentaire de BiG-SCAPE, qui identifie les clusters de gènes partageant un core génome⁴⁹ commun et reconstruit les phylogénies multi-locus de ces gènes pour explorer leurs histoires évolutives (**Figure 13B**).

Cette approche a été utilisée - par exemple - pour la découverte de la géninthiocine B (**Figure 14**), un nouvel antibiotique thiopeptidique isolé à partir d'une espèce de *Streptomyces* sp. (YIM 130001)⁵⁰.

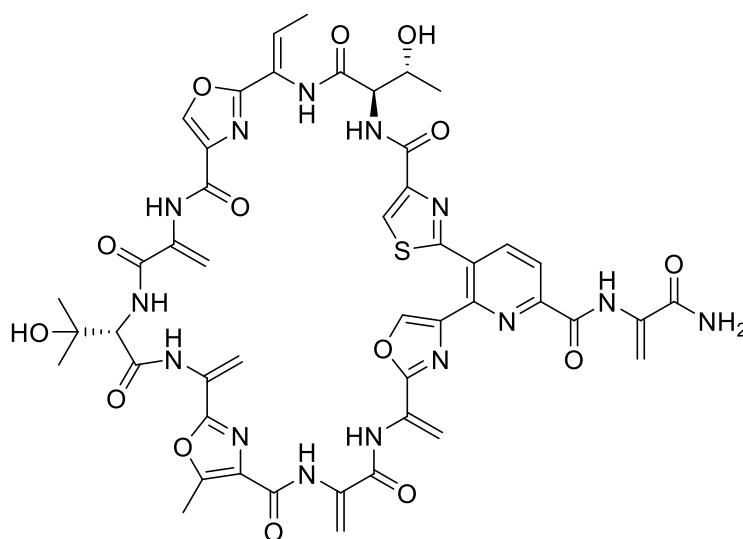


Figure 14 : Structure de la géninthiocine B

Les auteurs ont utilisé antiSMASH pour identifier les BGCs de la bactérie. Un des *clusters* a été prédit comme étant impliqué dans la biosynthèse du thiopeptide. Ce *cluster* a été ensuite analysé manuellement en utilisant Protein BLAST et MIBiG pour valider cette prédiction. Cette étude démontre particulièrement la puissance de l'approche génomique dans la découverte de nouveaux antibiotiques.

En plus des approches innovantes de culture et de génomique, il est nécessaire d'explorer les nouvelles sources exotiques afin d'augmenter davantage les chances de découvrir de nouveaux antibiotiques. Dans la partie suivante, les sources exotiques et leur intérêt seront introduits.

⁴⁷ Van der Hooft, *et al.*, *Chemical Society Reviews*, **2020**, *49*, 3297-3314.

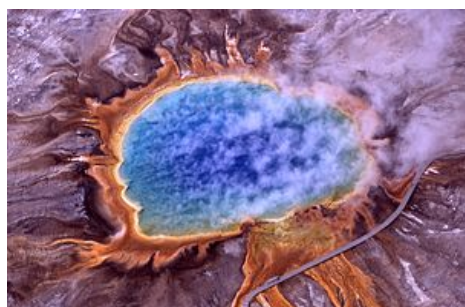
⁴⁸ Navarro-Munoz, *et al.*, *Nature Chemical Biology*, **2020**, *16*, 60-68.

⁴⁹ Ensemble des gènes communs à toutes les souches d'une même espèce (gènes orthologues)

⁵⁰ Schneider, *et al.*, *Frontiers in Microbiology*, **2018**, *9*, 3139.

2.4 Étude de nouvelles sources exotiques

2.4.1 Les micro-organismes des sources chaudes



La figure 15 montre la vue aérienne de *Grand Prismatic Spring*, la source chaude la plus extraordinaire du parc national de Yellowstone, avec une température de plus de 70 °C.

Figure 15 : Vue aérienne du *Grand Prismatic Spring*. Crédits : U.S. National Park Service

Les sources chaudes sont des habitats des micro-organismes thermophiles, qui se développent à haute température. En fonction de leur température de croissance, ils peuvent être répartis en trois sous-catégories : les thermophiles modérés (50-60 °C), les thermophiles extrêmes (65-80 °C) et les hyperthermophiles (supérieure à 80 °C). Les micro-organismes thermophiles possèdent une grande diversité de mécanismes moléculaires afin de résister et de corriger les dommages causés par les hautes températures. Par exemple, l'augmentation d'adénine dans les séquences codantes. L'adénine présente une fonction adaptative en favorisant la stabilité des ARN⁵¹. Au niveau protéique, les interactions entre les résidus d'acides aminés polaires et non polaires sont préférables chez les thermophiles. L'augmentation de la tyrosine contribue ainsi à la stabilité des protéines car elle peut former des interactions avec plusieurs autres résidus d'acides aminés⁵². Les acides aminés thermolabiles tels que la glutamine, l'alanine, l'histidine ou la thréonine sont moins présents dans les protéines des thermophiles⁵³.

Ces micro-organismes sont connus pour la production de composés antibactériens⁵⁴, antiviraux⁵⁵ et anti-tumoraux⁵⁶. Quelques exemples de ces composés sont cités ci-dessous.

- **Les composés antibactériens :**

Un criblage de l'activité antimicrobienne de 150 souches bactériennes isolées

⁵¹ Singer and Hickey, *Gene*, **2003**, 317, 39-47.

⁵² Gromiha, *Biophysical Chemistry*, **2001**, 91, 71-77.

⁵³ Vieille, *et al.*, *European Journal of Biochemistry*, **2001**, 268, 6291-6301.

⁵⁴ Mahajan and Balachandran, *Biochemical Pharmacology*, **2017**, 134, 35-41.

⁵⁵ Shivilata and Satyanarayana, *Frontiers in Microbiology*, **2015**, 6, 1014.

⁵⁶ Mehta, *et al.*, *3 Biotech*, **2016**, 6, 81.

à partir de différents environnements marins islandais a été réalisé. La bactérie thermophile, *Thermoactinomyces vulgaris*, isolée d'une source hydrothermale côtière en Islande a montré une activité antimicrobienne. L'étude approfondie de cette souche a permis de découvrir la molécule thermoactinoamide A (**Figure 16**) qui est active contre le pathogène *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 35 μM ⁵⁷.

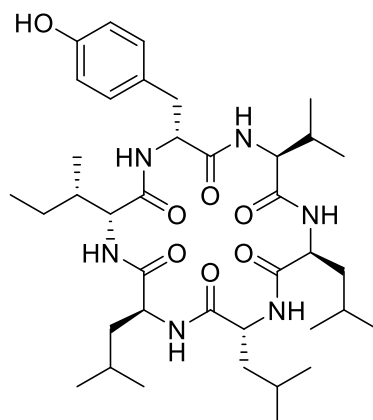


Figure 16 : Structure de la molécule thermoactinoamide A

- Les composés antiviraux :

Les activités immunomodulatrices et antivirales d'un exopolysaccharide extracellulaire (EPS-2), produit par la souche *Geobacillus thermodenitrificans*, isolée d'une source hydrothermale peu profonde de l'île de Vulcano (Italie), ont été étudiées. L'étude a montré, pour la première fois, que des concentrations élevées d'EPS-2 permettent d'inhiber la réplication du virus *Herpes simplex* de type 2 (HSV-2) et d'augmenter la réponse inflammatoire induite par les cytokines des lymphocytes Th-1, y compris l'IL-12, l'IL-18, le FN- γ , l'IFN- α et le TNF- α ⁵⁸.

- Les composés potentiellement anticancéreux :

Des études des bactéries des écoulements d'une source thermale de Polichnitos (Lesvos, Grèce) ont permis de mettre en évidence l'activité cytotoxique du milieu de culture d'une souche de *Cyanobacterium* sp. contre la lignée cellulaire cancéreuse PC3 ainsi qu'une forte activité insecticide contre les larves d'*Aedes aegypti*⁵⁹.

⁵⁷ Teta, et al., *J. Nat Prod*, **2017**, 80, 2530-2535.

⁵⁸ Arena, et al., *Immunology letters*, **2009**, 123, 132-7.

⁵⁹ Mizerakis, et al., *Annals of Microbiology*, **2017**, 67, 643-654.

2.4.2 Les micro-organismes des grottes

Les organismes qui vivent dans des grottes sont également une source intéressante en raison de leur capacité d'adaptation et de survie dans des conditions spécifiques (l'obscurité, l'oligotrophe, et une forte concentration minérale). Les métabolites spécialisés produits par les bactéries des grottes peuvent présenter de fortes propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires ou potentiellement anticancéreuses⁶⁰.

- Les composés antibactériens et antifongiques :

Les cervimycines A-D (**Figure 17**), des composés appartenant à la classe des polyacétates glycosylés, ont été isolées à partir de *Streptomyces tendae* provenant d'une ancienne grotte en Italie (*Grotta dei Cervi*). Ces molécules ont montré une forte activité antibactérienne contre des souches de *Staphylococcus aureus* multi-résistantes EfS4 et les souches *Enterococcus faecalis* résistantes à la vancomycine 1528 (VRE) avec une valeur de CMI comprise entre 1,6 et 12,5 µg/mL, en comparant à la tétracycline, la vancomycine ou la ciprofloxacine, qui sont respectivement inefficaces contre ces souches pathogènes⁶¹.

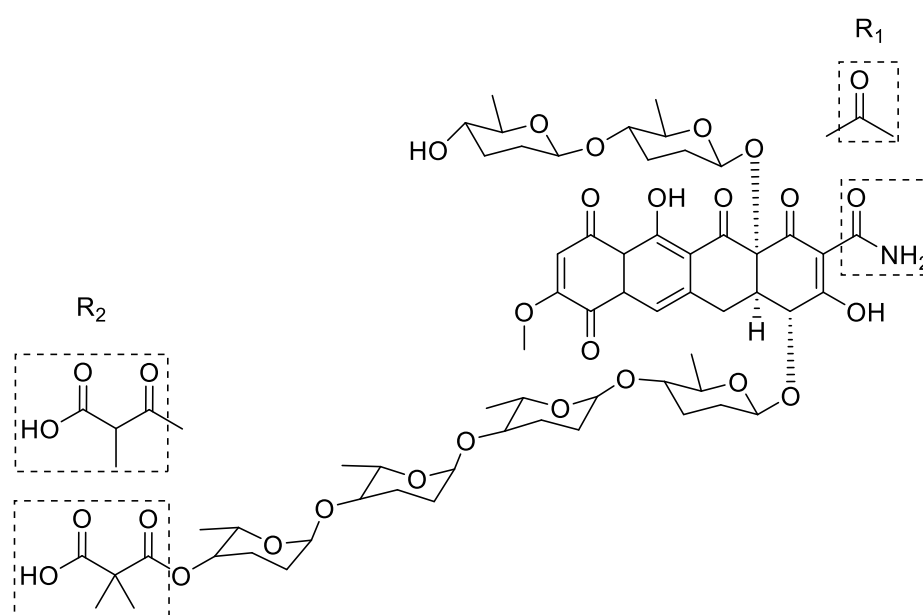


Figure 17 : Structures des cervimycines A-D.

Cervimycine A : $R^1 = \text{COCH}_3$, $R^2 = \text{diméthylmalonyl}$

Cervimycine B : $R^1 = \text{COCH}_3$, $R^2 = \text{monométhylmalonyl}$

Cervimycine C : $R^1 = \text{CONH}_2$, $R^2 = \text{diméthylmalonyl}$

⁶⁰ Kosznik-Kwasnicka, *et al.*, *Microorganisms*, **2022**, *10*, 222.

⁶¹ Herold, *et al.*, *Chemistry*, **2005**, *11*, 5523-30.

Cervimycine D : R¹ = CONH₂, R² = monométhylmalonyl

Des travaux récents, publiés en 2021, sur des souches bactériennes, provenant d'une carotte de glace venant de la grotte de Scarisoara en Roumanie, ont permis de découvrir les premiers isolats bactériens de glaces pérennes, accumulées dans les grottes depuis la fin de l'ère glaciaire. Les 68 isolats ont montré une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomona aeruginosa*. Parmi ces 68 isolats, dix présentaient des activités contre *Enterobacter cloacae* et *P. aeruginosa*, neuf isolats avaient une activité contre *Escherichia coli* et avec une faible inhibition des souches cliniques comme *Klebsiella* 19094 CK1, KC2 et CK3, et trois souches d'*Enterococcus faecium*. Plus de 50 % des souches présentaient une résistance importante à 17 classes d'antibiotiques. Certains isolats ont inhibé la croissance des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. La résistance aux antibiotiques des isolats peuvent être expliquée par la présence des antibiotiques naturels dans leur habitat, ou produits par eux-mêmes pour combattre les micro-organismes à proximité.

Avec un large spectre antimicrobien et un profil étendu de résistance aux antibiotiques, les souches isolées de la grotte glacière de Scarisoara présentent une source prometteuse dans la recherche des nouveaux antibiotiques et dans la compréhension de l'évolution de la résistance environnementale⁶².

- Les composés anticancéreux :

À partir des échantillons du sol collecté des grottes de Phatup et de Phanangkhoi dans le nord de la Thaïlande, 377 isolats d'actinomycète ont été collectés. Parmi ces isolats, deux ont montré des activités cytotoxiques et antibactériennes sur les bactéries à Gram-positif (**Figure 18**). Ces deux isolats appartiennent au genre *Spirillospora* et *Nonomuraea*, respectivement. Ces deux genres sont très mal connus jusqu'à présent⁶³.

⁶² Paun, *et al.*, *Scientific Reports*, **2021**, 11, 514.

⁶³ Nakaew, *et al.*, *Actinomycetologica*, **2009**, 23, 21-26.

Isolate	Anti bacterial (inhibition zone (mm))					Anti-cancer (IC ₅₀ (µg/ml))		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	MRSA	<i>Paenibacillus lavae</i>	Breast cancer	Oral Cavity	Small Cell Lung cancer
PNK225	0	0	0	0	0	inactive	inactive	inactive
PNK384	0	0	0	0	0	inactive	inactive	inactive
PNK393	0	0	0	0	0	inactive	inactive	inactive
PNK404	0	0	7	0	10	24.26	inactive	7.20
PNK470	0	0	20	32	17	inactive	inactive	10.18
PNK464	0	0	0	0	0	inactive	inactive	inactive
PT702	0	0	0	0	0	inactive	inactive	inactive
PT707	0	0	0	0	0	inactive	inactive	inactive
PT708	0	0	16	25	20	inactive	16.11	3.48
PT725	0	0	0	0	30	inactive	inactive	inactive
PT749	0	0	0	0	0	inactive	29.34	19.60

Figure 18 : Tableau des activités biologiques des isolats sélectionnés (repris *in extenso* de l'article de Nakaew, et al.)⁶⁴

2.4.3 Les micro-organismes des environnements aquatiques extrêmes

Les environnements aquatiques extrêmes tels que les lacs souterrains, les sources hydrothermales et les régions polaires regorgent de micro-organismes qui méritent d'être étudiés sur le plan chimique. Des substances bioactives ont pu être isolées à partir de ces sources exotiques. Certains exemples sont cités ci-dessous :

- Les composés antibactériens et antifongiques :

La caboxamycine (**Figure 19**), un nouvel antibiotique benzoxazole, a été produite par la souche marine *Streptomyces* sp. NTK 937. Cette dernière a été isolée à partir des échantillons d'eau profonde collectés dans le bassin des Canaries à une profondeur de 3814 m. La molécule présente des activités inhibitrices plus ou moins fortes contre les bactéries à Gram-positif : *Bacillus subtilis* (IC₅₀ = 8 µM), *Staphylococcus lentus* (IC₅₀ = 20 µM) et la levure *Candida glabrata* (IC₅₀ = 117 µM). De plus, elle inhibe significativement les bactéries phytopathogènes *Xanthomonas campestris* (IC₅₀ = 43 µM) et *Ralstonia solanacearum* (IC₅₀ = 176 µM) et le pathogène opportuniste *Staphylococcus epidermidis* (IC₅₀ = 43 µM)⁶⁵.

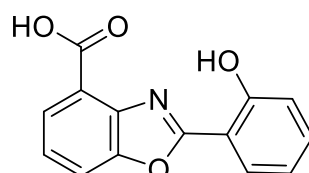


Figure 19 : Structure de la caboxamycine

⁶⁴ Ibid.

⁶⁵ Hohmann, *et al.*, *J Antibiot (Tokyo)*, **2009**, 62, 99-104.

2.4.4 Les micro-organismes symbiotiques

Les interactions symbiotiques sont très étudiées dans le but de trouver des nouvelles molécules antibiotiques. L'exemple le plus remarquable dans cette interaction est la découverte de la molécule darobactine (**Figure 20**) à partir de la symbiose entre un nématode entomopathogène et son symbiote bactérien, *Photorhabdus*⁶⁶.

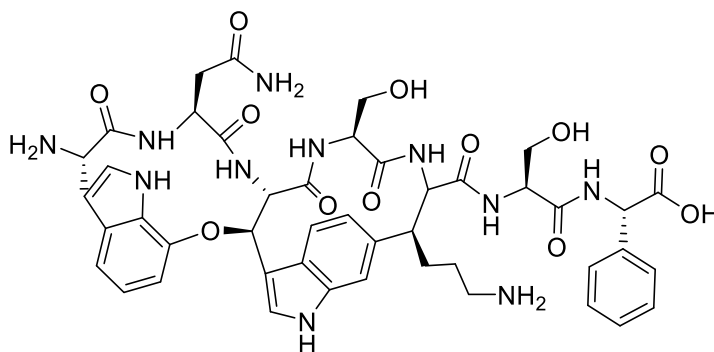


Figure 20 : Structure de la darobactine

Lorsque les nématodes pénètrent dans leur hôte (les larves d'insecte), les bactéries nématophiliques relâchent des neurotoxines qui immobilisent leur hôte et puis produisent des antimicrobiens pour détruire sa faune bactérienne rivale⁶⁷.

Les bactéries Gram-négatif sont abondantes dans le microbiome des nématodes entomopathogènes. Les bactéries nématophiles produisent des composés antimicrobiens qui ne sont pas toxiques pour leurs hôtes pour se protéger contre les autres membres du microbiome intestinal des nématodes. Ainsi, ces composés possèdent une faible toxicité et de bonnes propriétés pharmacocinétiques contre les bactéries pathogènes à Gram négatif.

En se basant sur ce raisonnement, le composé darobactine a été isolé en criblant des isolats de *Photorhabdus*. Une faible zone d'inhibition de la croissance d'*E.coli* par la bactérie *Photorhabdus kharii* HGB1456 a été observée sur des antibiogrammes. L'isolement bio-guidé de l'extrait de cette bactérie a permis aux auteurs de découvrir la darobactine qui est active contre les bactéries pathogènes à Gram-négatif *in vitro*, ainsi que sur des modèles animaux. La molécule inhibe la protéine membranaire BamA de la membrane externe en bloquant son ouverture et

⁶⁶ Imai, *et al.*, *Nature*, **2019**, 576, 459-464.

⁶⁷ Tobias, *et al.*, *Trends in Microbiology*, **2018**, 26, 833-840.

donc prévenant le rejet des substrats médicamenteux en dehors des cellules bactériennes⁶⁸.

Tous les exemples précédents montrent que les micro-organismes venant des environnements atypiques représentent une source très prometteuse dans la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes. Cependant, un nombre important de micro-organismes peut être isolé à partir d'un seul échantillon environnemental. Pour analyser les données massives associées à ces échantillons, des stratégies de priorisation des sources intéressantes sont requises afin de mettre en œuvre les efforts nécessaires pour atteindre les résultats voulus. Dans la partie suivante, nous allons citer deux stratégies de priorisation employées en chimie des substances naturelles.

2.5 Les stratégies de priorisation de micro-organismes

2.5.1 Stratégie de priorisation basée sur l'utilisation des réseaux moléculaires

La technique des réseaux moléculaires⁶⁹, introduite en 2012, est une stratégie très employée pour identifier rapidement les métabolites connus dans des extraits bruts. Le principe du réseau moléculaire est de comparer et d'organiser les spectres SM/SM des métabolites présents dans les extraits bruts sous forme de *clusters* en fonction de leur similarité spectrale.

La technique des réseaux moléculaires a été rendue accessible au public en 2013 via une plate-forme en libre accès dénommée *Global Natural Product Social Molecular Networking* (GNPS), dédiée à l'organisation et au partage des données SM/SM (<http://gnps.ucsd.edu>)⁷⁰.

⁶⁸ Imai, *et al.*, *Nature*, **2019**, 576, 459-464.

⁶⁹ Watrous, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012**, 109, E1743-E1752.

⁷⁰ Wang, *et al.*, *Nature Biotechnology*, **2016**, 34, 828-837.

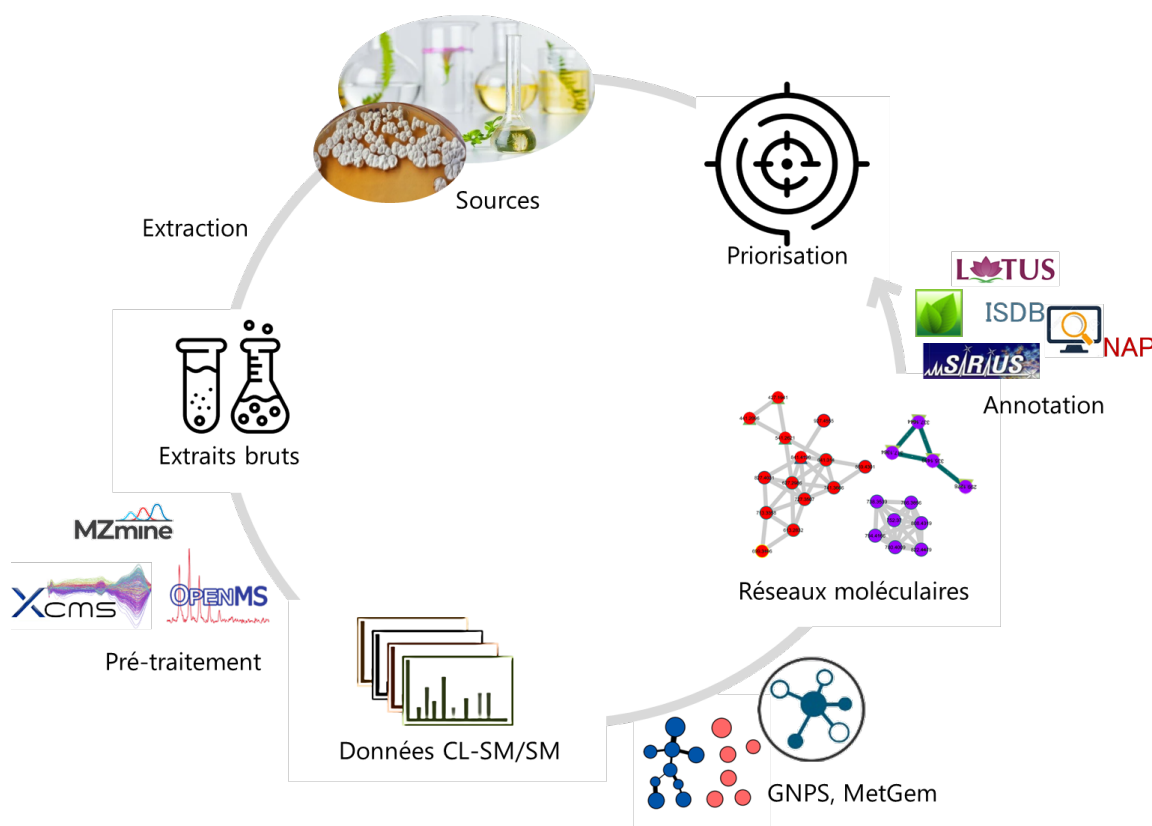


Figure 21 : « Workflow » de la stratégie de priorisation basée sur l'utilisation des outils de la spectrométrie de masse computationnelle.

La **Figure 21** montre toutes les étapes classiques pour construire un réseau moléculaire à partir d'une source naturelle ainsi que l'annotation et la déréduplication des molécules du réseau moléculaire.

La stratégie de priorisation par l'utilisation du réseau moléculaire a été appliquée par Floros *et al.*⁷¹ afin d'explorer l'espace chimique de 1000 micro-organismes sélectionnés aléatoirement dans la souchothèque marine du *Scripps Institution of Oceanography* (SIO). En combinant le réseau moléculaire et les analyses statistiques, 3000 données SM/SM de ces micro-organismes ont été analysées. Les clusters des molécules spécifiques à une souche sont mis en évidence par un code de couleur.

Un *cluster* regroupant une douzaine de nœuds d'une même famille de molécule spécifique à une souche, a été observé dans le réseau moléculaire. Cette approche a permis de découvrir deux nouvelles molécules (acides maridriques A et B) à partir de la souche CNP-993 (**Figure 22**).

Le réseau moléculaire est donc un outil adapté à la priorisation et à l'analyse des grandes collections de micro-organismes lors de méthodes de criblage non ciblées

⁷¹ Floros, *et al.*, *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, **2016**, 12, 145.

acquises en HRMS.

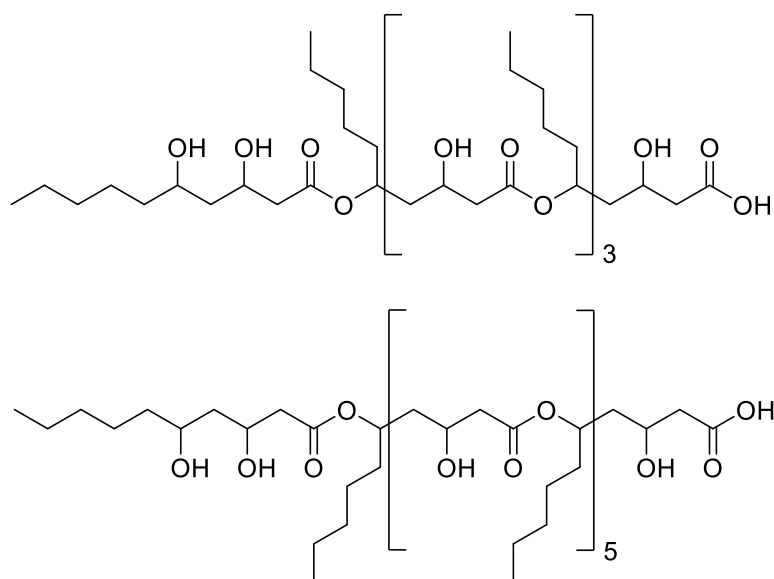


Figure 22 : Structures des acides maridriques A et B⁷²

2.5.2 Stratégie de priorisation basée sur l'utilisation de la RMN

La RMN à deux dimensions est également très utile dans la dérégulation des types de molécules présents dans les extraits bruts. Les analyses de type HSQC-TOCSY (*Heteronuclear Single Quantum Coherence - Total Correlation Spectroscopy*) permettent de révéler les corrélations entre un proton et le carbone qui le porte ainsi qu'aux autres carbones dans le même système de spin couplé.

La séquence HSQC-TOCSY a été appliquée pour la priorisation des extraits d'actinomycètes contenant des polyacétates et des peptides. Les auteurs ont d'abord listé les régions de corrélations HSQC-TOCSY indiquant la présence des motifs intéressants dans les extraits des souches. Les souches présentant le plus de signaux de type « polyacétates » ont été priorisées pour une étude approfondie (**Figure 23**)⁷³.

⁷² Fox Ramos, *et al.*, *Natural Product Reports*, **2019**, 36, 960-980.

⁷³ Buedenbender, *et al.*, *Marine Drugs*, **2018**, 16, 189.

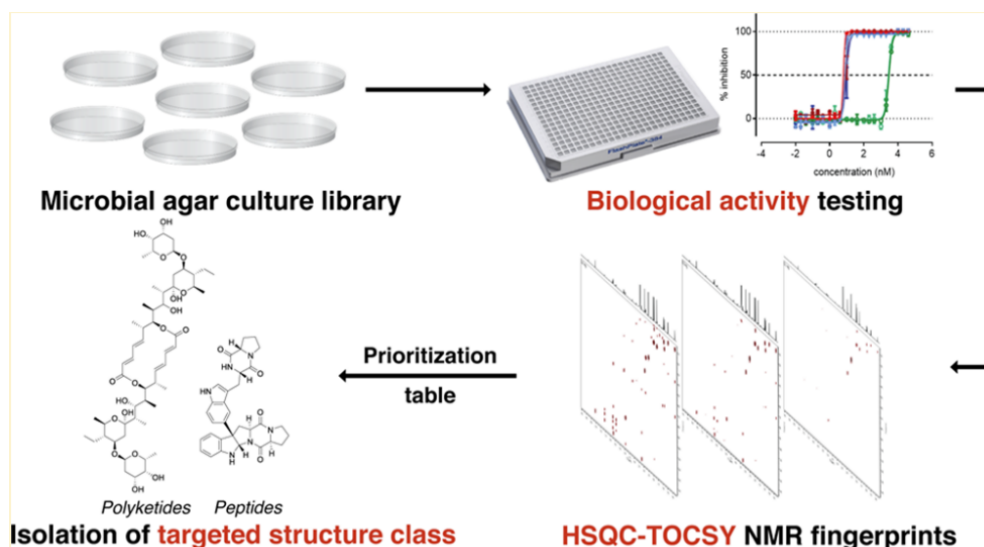


Figure 23 : « Workflow » de la priorisation des isolats microbiens en utilisant 2D RMN (HSQC-TOCSY)⁷⁴.

La déréplication basée sur l'utilisation de la RMN est une stratégie intéressante car cette technique est non destructive. La préparation des échantillons est simple et rapide. Cependant, la complexité de certains extraits bruts constitue un facteur limitant à cause de la superposition de signaux. De plus, l'annotation des corrélations requiert un regard expert pour élucider la structure des motifs détectés.

2.5.3 Stratégie de priorisation basée sur l'utilisation des sondes chimiques

Cette stratégie consiste à ajouter une molécule réactive dans un extrait brut pour détecter directement la présence d'entités possédant un motif chimique particulier. Quelques exemples des sondes chimiques qui permettent de détecter des produits naturels seront cités ci-dessous.

- La sonde « 5-bromo-2-nitrosopyridine »

La sonde 5-bromo-2-nitrosopyridine (**Figure 24**) a été employée pour détecter la présence de polyacétates à partir d'extraits bruts des bactéries marines : *Streptomyces*, *Salinispora*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Kocuria*, *Saccharomonospora*, *Frankia* et *Nocardiopsis*⁷⁵.

Cette sonde réagit de manière chimiosélective avec des motifs poly-diéniques présents dans des polyacétates *via* la réaction d'hétéro-Diels-Alder pour former un dérivé. Celui-ci contient un groupement chromophore et un atome de brome qui lui

⁷⁴ Buedenbender, *et al.*, *J. Nat Prod*, **2018**, *81*, 957-965.

⁷⁵ Castro-Falcon, *et al.*, *ACS Chemical Biology*, **2018**, *13*, 3097-3106.

permet d'être détecté rapidement à la fois par l'UV et par spectrométrie de masse.

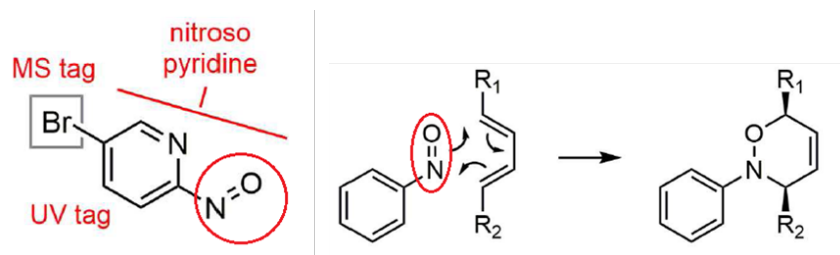


Figure 24 : Structure de la sonde 5-bromo-2-nitrosopyridine et la réaction d'hétéro-Diels-Alder (figure adaptée de l'article de Gabriel Castro-Falcón et *al.*)⁷⁶

L'ajout de la sonde dans l'extrait de la souche *Streptomyces* sp. CNQ-085 a permis de mettre en évidence deux produits : le daryamide A, un composé connu, faiblement cytotoxique, et le novodaryamide A, une nouvelle molécule (**Figure 25**).

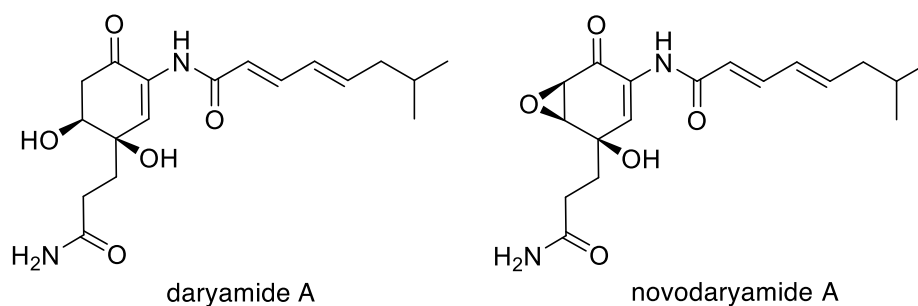


Figure 25 : Structures de daryamide A et novodaryamide A, molécules détectées par la sonde 5-bromo-2-nitrosopyridine à partir de l'extrait de *Streptomyces* sp. CNQ-085

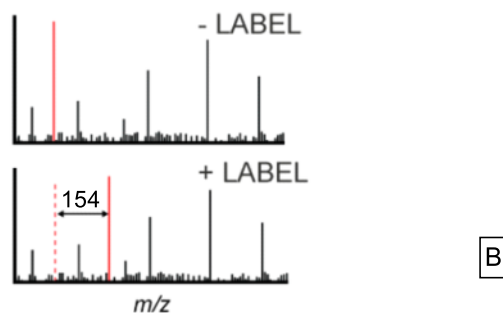
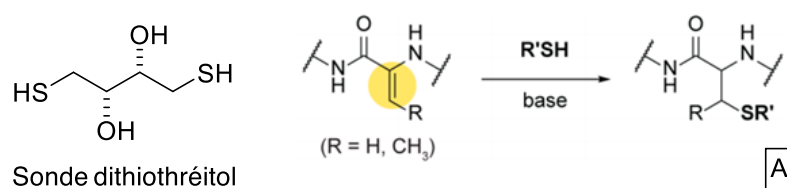
- La sonde « dithiothréitol »

Afin de détecter rapidement les métabolites contenant le motif déshydroaminoacide dans les extraits microbiens, un produit commercialisé, le dithiothréitol, a été employé⁷⁷. Ce produit forme une liaison covalente avec les alcènes actifs des molécules d'intérêt par une addition nucléophile 1,4 (**Figure 26A**).

Une différence de 154 Da des produits des extraits avec la sonde et ceux sans la sonde sera détectée par spectrométrie de masse si les produits d'intérêt sont présents (**Figure 26B**).

⁷⁶ Ibid.

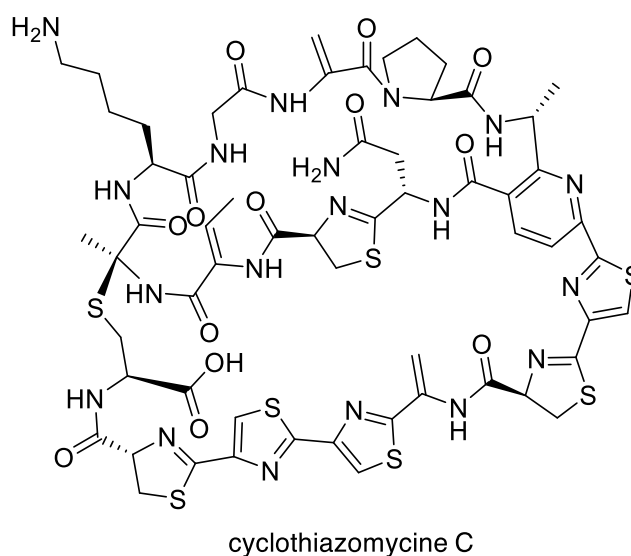
⁷⁷ Cox, et al., *ACS Chemical Biology*, **2014**, 9, 2014-22.



une différence de masse entre
le composé avec et sans la sonde
détectée par spectrométrie de masse

Figure 26 : Réactivité de la sonde « dithiothréitol » et la détection de la présence du composé d'intérêt par comparaison des spectres de masse des extraits avec et sans l'ajout de la sonde (figure adaptée de l'article de Courtney L. Cox *et al.*)⁷⁸

Cette sonde a permis de découvrir une nouvelle molécule thiopeptidique, la cyclothiazomycine C (**Figure 27**) à partir de WC-3908, une des 23 souches d'actinomycètes testées. Ces 23 souches ont été priorisées par l'approche génomique en cherchant la présence de *clusters* de gènes de biosynthèse des thiopeptides.



⁷⁸ Ibid.

Figure 27 : Structure de la molécule cyclothiazomycine C

- Sondes chimiques pour détecter les intermédiaires de la voie de biosynthèse des polyacétates

Différentes sondes chimiques interagissant avec les intermédiaires de la voie de biosynthèse des polyacétates ont été développées par l'équipe de M. Tosin⁷⁹. Ces sondes entrent en compétition avec l'unité malonique greffée à l'ACP (*Acyl Carrier Protein*) pour réagir avec les intermédiaires attachés à la « cétoynthase » (*ketosynthase*), au cours de la biosynthèse des polyacétates (**Figure 28**).

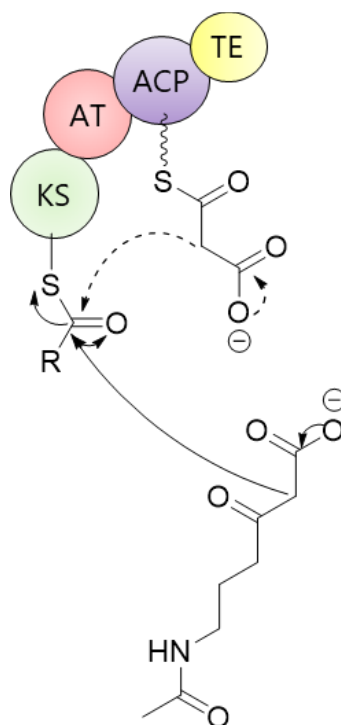


Figure 28 : Mécanisme de réaction des sondes réagissant aux intermédiaires des polyactétates (figure adaptée à partir de l'article de Elena Riva *et al.*)⁸⁰

Ces sondes sont particulièrement intéressantes car elles peuvent être ajoutées directement dans le milieu de culture pour intégrer la voie de biosynthèse des polyacétates, permettant une exploration *in vivo* de la diversification des polyactétates.

La fermentation des mutants de la souche *Streptomyces lasaliensis* (mutation au niveau de la protéine ACP) en présence de ces sondes a permis la découverte d'une nouvelle molécule polyactétique dérivée de la lasalocide A (**Figure 29**).

⁷⁹ Riva, *et al.*, *Angewandte Chemie*, **2014**, 53, 11944-9.

⁸⁰ *Ibid.*

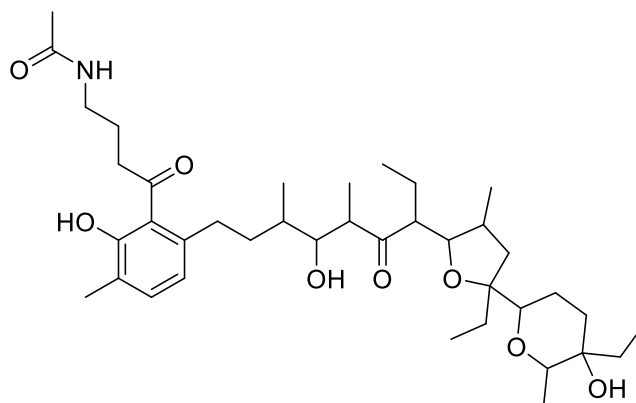


Figure 29 : Structure de la nouvelle molécule dérivée de la lasalocide A, formée par l'interaction des sondes chimiques aux intermédiaires des polyacétates

CHAPITRE II :

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE II – TRAVAUX PERSONNELS

- Notre source « exotique » : les mattes de « Kopara »

Comme cité précédemment, les environnements aquatiques atypiques sont des sources prometteuses pour la recherche des nouvelles molécules portant une activité biologique. L'objectif de ce projet de thèse est d'explorer une source exotique appelée les mattes de « Kopara ». Ces mattes se trouvent en Polynésie française, sur les bords d'atolls comme à Rangiroa⁸¹.

1.1 Formation d'un atoll

D'après la théorie de Darwin⁸², un atoll est formé par le phénomène volcanique du point chaud et par le déplacement de la plaque Pacifique et enfin par le développement du corail⁸³. Un point chaud est une zone de formation de magma qui remonte jusqu'à la surface terrestre et perce la lithosphère indépendamment de la configuration des plaques. Le magma se solidifie lorsqu'il émerge de la mer et devient alors une île (<https://tahitileblog.fr/>).

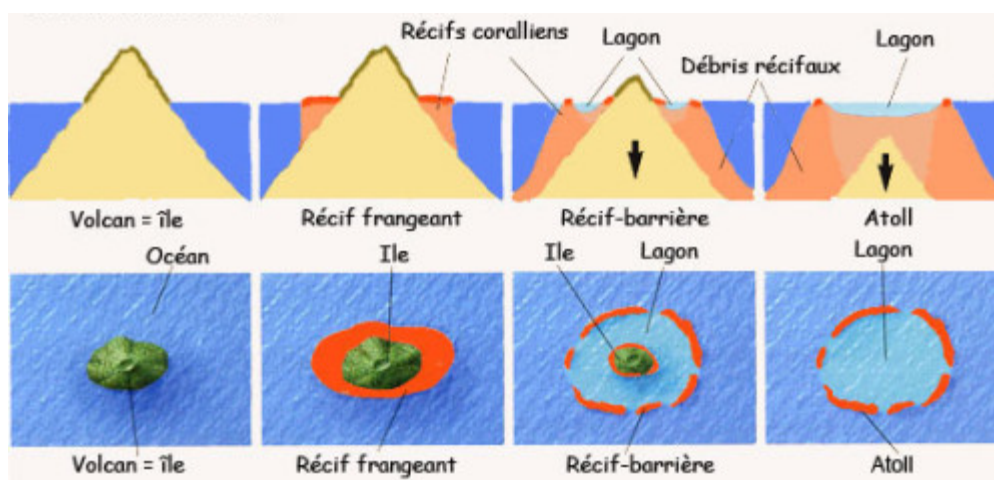


Figure 30 : la formation d'un atoll selon la théorie de Darwin (Bernard Duyck - <https://tahitileblog.fr/>)

Lorsque l'île est formée, les récifs coralliens commencent à se développer

⁸¹ Simon-Colin, *et al.*, *Journal of Applied Microbiology*, **2008**, 104, 581-6.

⁸² Darwin, *The structure and Distribution of coral reefs. Being the first part of the Geology of the voyage of the Beagle, under the command of Capt. Fitzroy, R.N. during the years 1832 to 1836*, Smith, Elder & Co, **1842**, 258.

⁸³ Labrosse, *Des îles hautes aux atolls : une histoire du plancher océanique*, Planet Terre, 2010

verticalement autour de cette dernière, à des faibles profondeurs, où la lumière est présente en abondance. Ce type de récif est appelé « récif frangeant ». Lorsque la plaque océanique s'éloigne de la dorsale, sa densité augmente, elle refroidit puis elle s'enfonce, entraînant avec elle les îles volcaniques, la ceinture de récif corallien se détache ensuite de l'île. Les coraux poursuivent leur croissance verticalement afin de se rapprocher de la surface et donc de la lumière, entraînant la formation d'une barrière. Finalement, l'île disparaît sous la surface océanique en laissant une barrière corallienne entourant un lagon ouvert ou fermé, que l'on appelle un atoll (**Figure 30**). (<https://tahitileblog.fr/>).

Cependant, une étude récente réalisée par Stéphan Jorry, un géologue à l'Institut français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, et son collègue, André W. Droxler, de l'université Rice (États-Unis), a montré que les atolls ne se sont pas formés comme décrit dans la théorie de Darwin⁸⁴. D'après ces chercheurs, la fluctuation du niveau des océans au cours des ères géologiques n'a pas été prise en compte par Darwin. En effet, ils ont proposé un nouveau modèle de formation des atolls en se basant sur le phénomène karstique et des études sur les fluctuations du niveau de la mer au cours des 5 derniers millions d'années de différents atolls (Maldives, Mururoa, Funafuti et Bassas da India).

Selon eux, l'histoire de la formation des atolls commence il y a 3,2 millions d'années et à cette époque, le niveau de la mer est encore stable, des plates-formes sédimentaires se développaient donc sur les hauts fonds océaniques. Il y a 2,5 millions d'années, les fluctuations du niveau de la mer devenaient plus importantes, ces plateformes sont alors tantôt immergées, tantôt émergées. De plus, lorsqu'elles sont émergées, une dissolution maximale du calcaire au niveau central des plateformes et une dissolution minimale au niveau des bordures par la pluie entraînent une dépression centrale karstique entourée de bordures surélevées. Lors de période d'immersion, dans des conditions favorables, les coraux occupent les bordures des plateformes et se développent verticalement selon les montées successives du niveau de la mer. Ils forment des anneaux de corail qui entourent des lagons profonds, d'où l'origine des atolls (**Figure 31**) (<https://wwz.ifremer.fr/>)⁸⁵.

⁸⁴ Droxler and Jorry, *Annual Review of Marine Science*, **2021**, 13, 537-573.

⁸⁵ Les atolls ne se sont pas formés comme l'expliquait Darwin ! <https://wwz.ifremer.fr/Actualites-et-Agenda/Toutes-les-actualites/Les-atolls-ne-se-sont-pas-formes-comme-l-expliquait-Darwin>

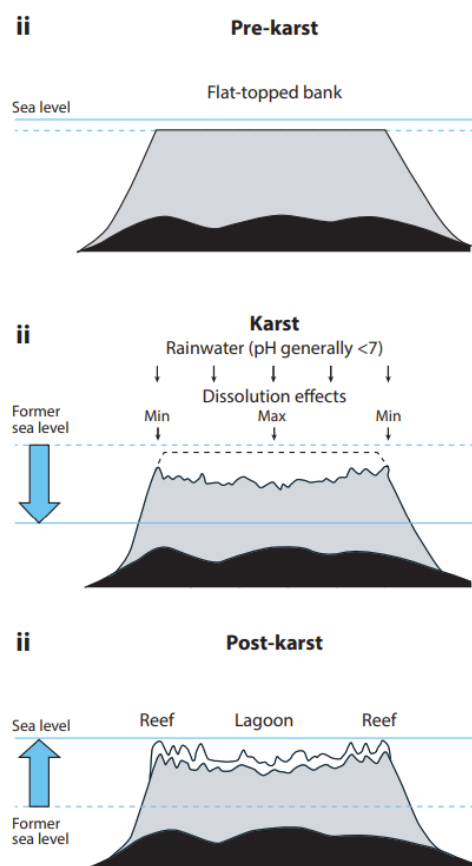


Figure 31: Formation des atolls selon le modèle karstique⁸⁶

1.2 Formation et composition des mattes de Kopara

Sur les bords de l'atoll de Rangiroa, des mattes microbiennes se forment en développant des sédiments plus ou moins gélatineux avec une stratification verticale, composée de plusieurs fines couches riches en matières organiques (les « couches rouges » sur la **Figure 32**) et en matières minérales qui sont généralement composées de carbonate de magnésium pur (les « couches blanches ») (**Figure 32**). Ces mattes, souvent appelées « mattes de kopara » par les habitants de l'archipel des Tuamotu, sont à comparer aux plus anciennes formes de vie sur terre que l'on connaît sous le nom de « stromatolithes »⁸⁷.

La stratification verticale est due à la distribution des micro-organismes selon des gradients de lumière, d'oxygène, d'humidité, de sulfure et de pH en fonction des besoins physiologiques. Le gradient de pH varie entre 6 et 10,5, la salinité entre 5 g/L

⁸⁶ Droxler and Jorry, *Annual Review of Marine Science*, **2021**, 13, 537-573.

⁸⁷ Lacombe, *et al.*, *50 ans de recherche pour le développement en Polynésie française*, **2013**,

et 42 g/L, la température moyenne est de 20 °C pendant la nuit et peut aller jusqu'à 42 °C vers midi et l'intensité lumineuse varie, elle, d'un site à l'autre⁸⁸.

Chaque strate des mattes de kopara est donc constituée par différents types de micro-organismes qui sont autant de nouvelles sources potentielles de molécules intéressantes dues à leur capacité à survivre dans des écosystèmes aux paramètres physico-chimiques fluctuants.

Les premières couches de Kopara situées à la surface sont dominées par des cyanobactéries et les organismes qui utilisent la lumière comme une source d'énergie. Ces couches se présentent sous différentes couleurs : oranges, brunes, vertes et noires lorsqu'elles sont asséchées.

La diversité des bactéries est également influencée par la salinité. À faible salinité, les mattes microbiennes présentent des couches vertes à la surface dominées par les cyanobactéries de type *Phormidium*. Au contraire, à fort degré de salinité, les tapis avec des couches oranges à la surface sont dominés par des cyanobactéries de type *Schizothrix*⁸⁹.

Juste en dessous des premières couches, les bactéries phototrophes sulfo-oxydantes forment une très fine couche rose-violette. Plus bas, les couches épaisses et riches en pigments caroténoïdes ont été formées par les anciennes cyanobactéries et les bactéries sulfo-oxydantes en absence de la lumière et d'oxygène⁹⁰. La distribution, l'activité et la classification des bactéries qui se développent dans de telles associations sont très peu connues à ce jour⁹¹.

⁸⁸ Raguénès, *et al.*, *Current microbiology*, **2004**, 49, 145-51.

⁸⁹ Che, *et al.*, *Canadian Journal of Microbiology*, **2001**, 47, 994-1012.

⁹⁰ Rougerie, *Tahiti Pacifique*, **1995**, 42-43.

⁹¹ Guézennec, *et al.*, *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 16-22.

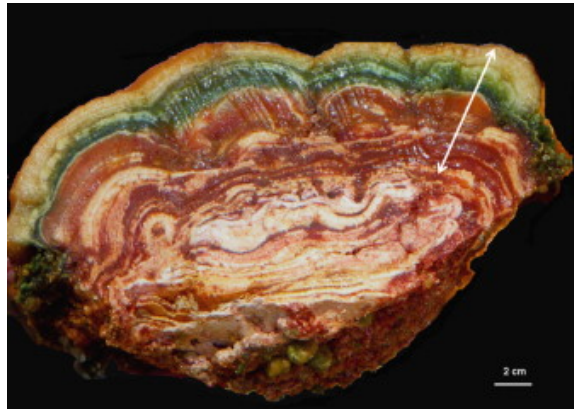


Figure 32 : Illustration d'une stratification de la matte de kopara (figure reprise *in extenso* de l'article de Guézennec, *et al.*)⁹²

Les cyanobactéries sont connues pour développer des mécanismes efficaces de protection contre le rayonnement UV-B. En effet, une caractéristique unique de certaines cyanobactéries est leur capacité à se protéger contre la photo-oxydation qui leur est toxique et à maintenir leur croissance sous un rayonnement solaire élevé⁹³.

Elles sont également connues pour la production d'un grand nombre de couches stratifiées visqueuses en raison de l'excrétion d'exopolysaccharides (EPS). Dans la plupart des mares analysées à ce jour, les niveaux les plus élevés d'exopolysaccharides, allant jusqu'à 50 mg d'EPS/g de poids sec, ont été trouvés dans les couches supérieures. La proportion d'exopolysaccharides diminue nettement avec l'augmentation de la profondeur et négligeable au-delà de 8 cm⁹⁴.

Les exopolymères aident les micro-organismes à survivre aux changements de conditions environnementales. Grâce à plusieurs propriétés physico-chimiques intéressantes de ces exopolymères telles que la capacité de stabiliser, épaissir, gélifier, former des films et retenir l'eau, les polysaccharides sont souvent employés dans de nombreux secteurs industriels comme les détergents, la peinture, dans les industries alimentaires, dans le domaine pharmaceutique en tant que système d'administration de médicaments⁹⁵.

Les polysaccharides sont également utilisés dans le domaine cosmétique en tant que produit anti-âge en association avec les vitamines, les protéines, les peptides, les enzymes et les coenzymes. Les propriétés biogéochimiques des mattes de kopara et la formation de dépôts de phosphorite dans le « kopara » ont été également

⁹² Ibid.

⁹³ Charpy-Roubaud and Larkum, *Coral Reefs*, **2005**, 24, 622-628.

⁹⁴ Guézennec, *et al.*, *Process Biochemistry*, **2011**, 46, 16-22.

⁹⁵ Ibid.

étudiées⁹⁶.

De nos jours, il n'existe aucune étude sur la recherche de nouvelles molécules bioactives à partir de cette source. Dans ce qui va suivre, nous détaillerons la stratégie employée pour explorer cette source d'un point de vue microbiologique et chimique.

- **Stratégie de priorisation des micro-organismes des mattes de kopara**

Dans cette section, nous détaillerons les différentes étapes relatives au prélèvement des échantillons des mattes de Kopara, l'isolement des micro-organismes à partir de ces mattes ainsi que la stratégie de priorisation des micro-organismes en fonction de nos critères.

a. Accès à la source : Mattes de Kopara

Une collaboration avec l'entreprise Pacific Biotech⁹⁷ située à Tahiti nous a permis d'avoir accès à cette source exotique : « les mattes de kopara ». Xavier Moppert a réalisé des prélèvements dans le cadre de cette étude, à quatre points de l'atoll de Rangiroa (**Figure 33**).

Pour chaque point, les échantillons ont été prélevés à différentes coordonnées GPS et à différentes profondeurs. Chaque partie de matre prélevée présentait des caractéristiques morphologiques spécifiques.

Les mattes prélevées au niveau du premier point proviennent des mares d'eau saumâtre. Au niveau du deuxième et troisième point, les mares étaient peu profondes et au quatrième point, les mares étaient situées plus en profondeur. Un des points de prélèvement de la position numéro trois présentait une substance gélatineuse rouge flottante au milieu de la mare.

Finalement, nous avons obtenu 93 prélèvements dont 56 échantillons de mattes de Kopara et 37 écouvillonnages d'eau et d'animaux (trocas, bénitiers, éponges, coraux) provenant de différents endroits de l'atoll de Rangiroa et à des profondeurs différentes (de la surface à -20 cm de profondeur) ont été collectés.

⁹⁶ Richert, *et al.*, *European Journal of Phycology* (0967-0262) (Taylor & Francis), 2006-08, Vol. 41, N. 3, P. 259-279, 2006, 41,

⁹⁷ <https://pacificbiotech-com.webnode.fr/expertises/> - Une société de biotechnologie créée en 2006 et basée sur l'île de Tahiti (Polynésie française) a pour objectif de rechercher, identifier et produire à l'échelle industrielle des molécules innovantes valorisables dans les domaines de l'environnement, de la chimie, de la cosmétique et/ou de la santé à partir de la biodiversité de Polynésie française.

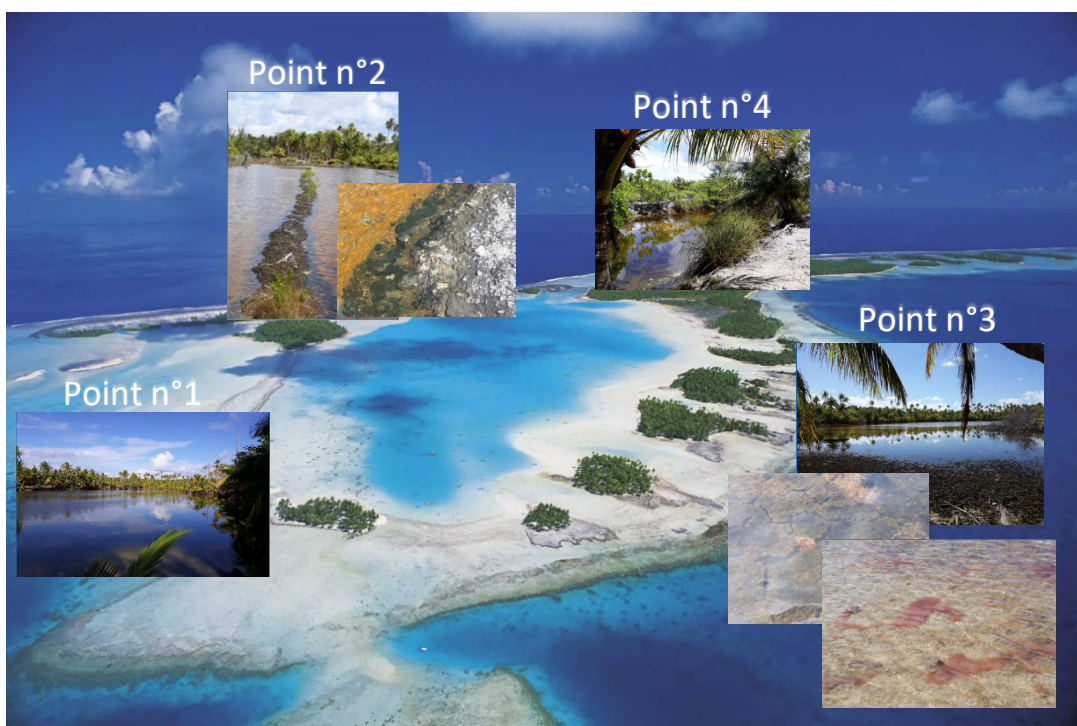


Figure 33: Les prélèvements des mattes de kopara (Pacific Biotech)

b. Isolement des souches basés sur leur morphologie

Pour explorer la diversité chimique des micro-organismes des mattes de Kopara, nous avons commencé à isoler les micro-organismes de sept échantillons (17 à 23) collectés à partir de ces coordonnées GPS : 14°55'58.8"S 147°51'00.7"W (**Figure 34**). Ces échantillons ont été collectés au milieu de la mare pour éviter la contamination des sédiments du bord. Ce sont donc les échantillons les plus homogènes et représentatifs des mattes de Kopara.

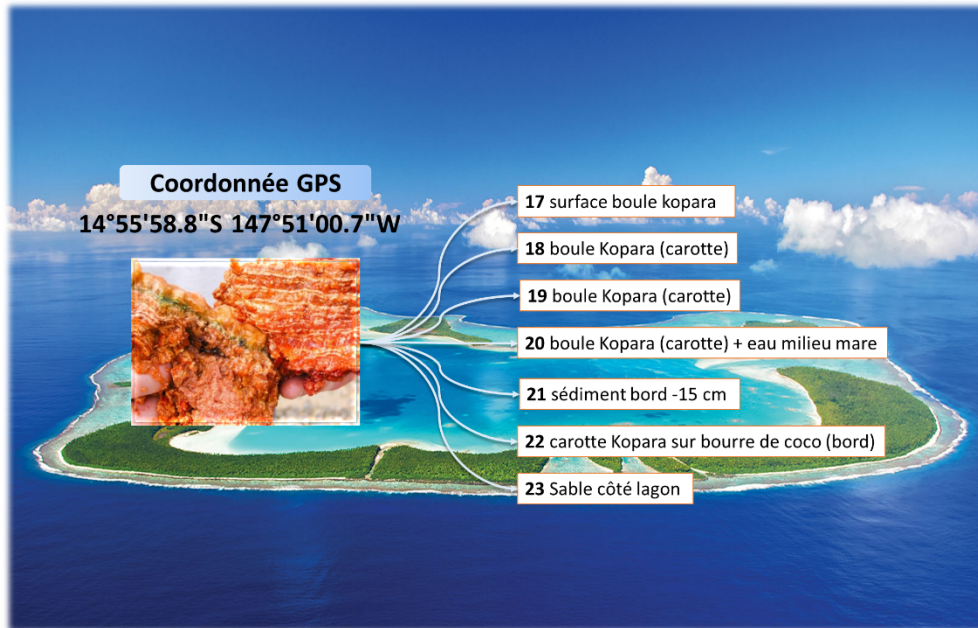


Figure 34: Les sept échantillons collectés au même endroit à différentes profondeurs.

Les micro-organismes de ces sept échantillons ont été isolés selon les procédures décrites dans la **Figure 35**. Tout d'abord, les échantillons ont été homogénéisés dans l'eau stérile, puis partagés en deux séries : une série à température ambiante et une autre chauffée au bain-marie à 50 °C pour éliminer certaines bactéries moins résistantes.

Ces suspensions, après décantation, ont étéensemencées dans différents milieux de culture marins et non marins afin d'optimiser la culture des micro-organismes (**Figure 35**).

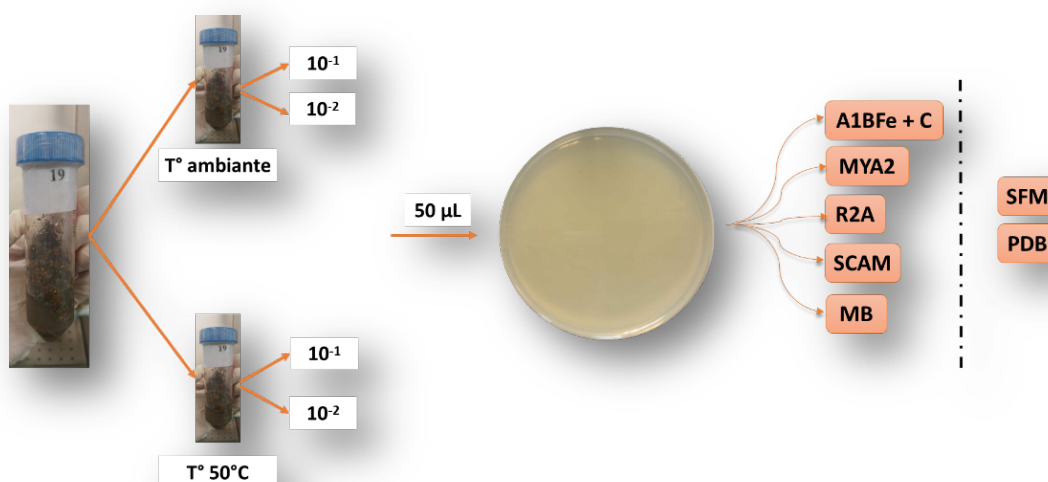


Figure 35: Les procédures d'isolement des souches. Les différents milieux de culture

sont rapportés à droite de la figure.

Nous nous sommes intéressés prioritairement aux micro-organismes formant des filaments tels que les champignons filamenteux et les actinomycètes car ces derniers sont des producteurs connus des métabolites bioactifs⁹⁸.

Nous avons donc sélectionné les micro-organismes en nous basant sur leur morphologie. Les différentes cultures ont été observées au quotidien et le repiquage des micro-organismes d'intérêt a été réalisé plusieurs fois afin d'obtenir des colonies de souches pures (**Figure 36**). Les souches pures ont été ensuite stockées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans 20 % de glycérol.

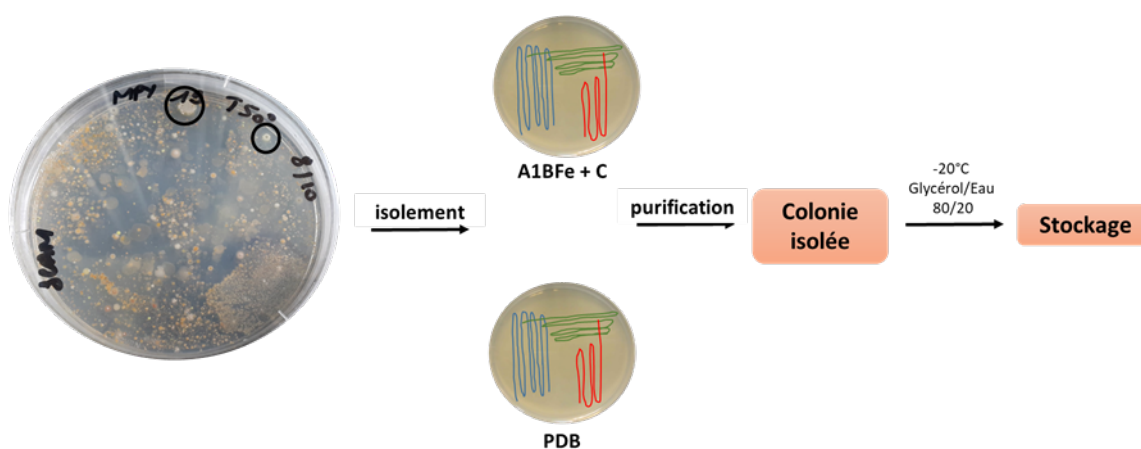


Figure 36: Repiquage des micro-organismes.

c. Priorisation des micro-organismes en utilisant les réseaux moléculaires

Afin de sélectionner les micro-organismes intéressants, nous avons utilisé la stratégie de priorisation fondée sur l'utilisation des réseaux moléculaires (**Figure 37**).

⁹⁸ Berdy, *J Antibiot (Tokyo)*, **2012**, 65, 385-95.

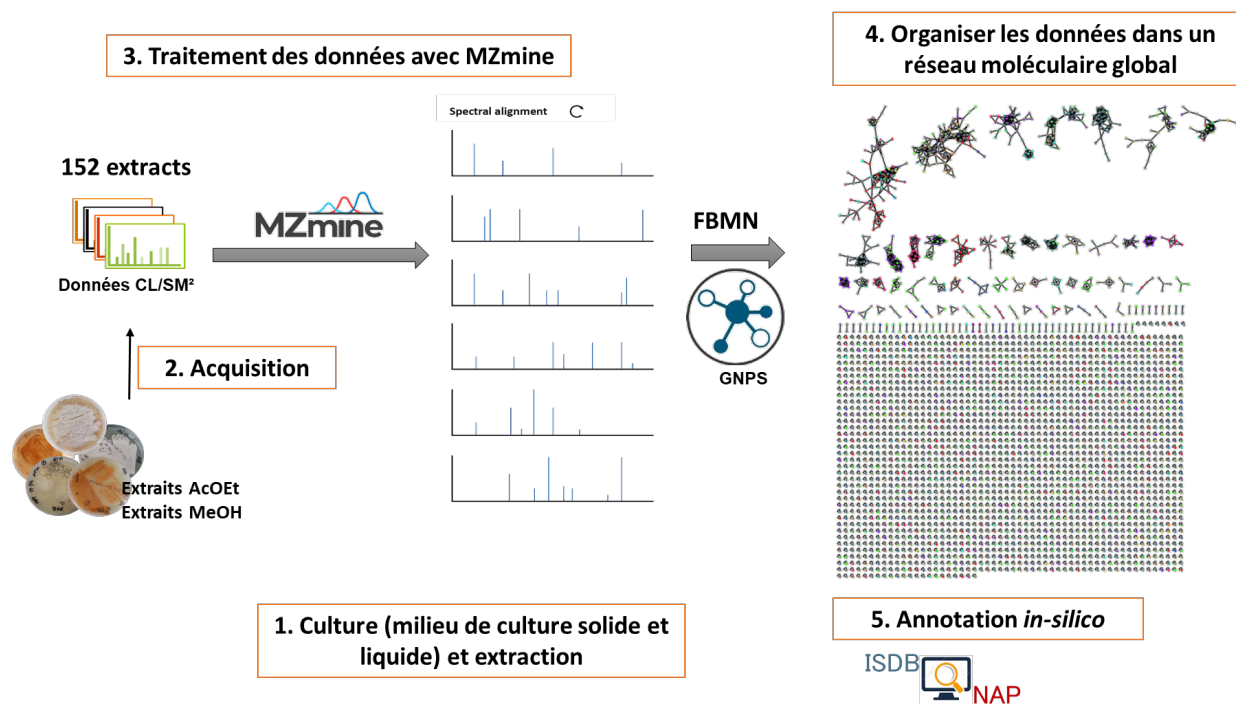


Figure 37: « Workflow » de la stratégie de priorisation fondée sur les réseaux moléculaires

Pour cette étude, la stratégie de priorisation a été adaptée à notre objectif de recherche, soit, la découverte de nouvelles substances microbiennes bioactives. Le parti pris pour atteindre cet objectif a d'abord été d'explorer l'espace chimique des macrocycles en ciblant des molécules de masse élevée. En effet, des molécules majeures de l'arsenal thérapeutique telles que la ciclosporine, le tacrolimus (FK506) et la rapamycine font partie de cet espace chimique particulier.

Au-delà de ce critère de masse moléculaire et pour augmenter nos chances de sélectionner des souches microbiennes productrices de famille de molécules nouvelles, nous avons décidé d'exploiter la topologie dictée par la représentation des données de spectrométrie de masse en tandem en réseaux moléculaires. En effet, le postulat ici repose sur le fait que si des molécules (ici des ions), provenant de souches taxinomiquement homogènes (à l'échelle du genre ou de la classe), s'organisaient sous la forme de familles isolées au sein d'un réseau moléculaire global, nous pouvions espérer détecter une famille chimique spécifique à une souche. De plus, en appliquant les différentes opérations de déréplication (données SM/SM expérimentales et *in silico* (ISDB⁹⁹, NAP¹⁰⁰) ainsi que la recherche de formule brute

⁹⁹ *In-Silico* MS/MS DataBase

¹⁰⁰ Network Annotation Propagation

dans le DNP®¹⁰¹), nous augmenterions les chances de cibler des molécules nouvelles.

En raison de la richesse de la diversité microbienne des échantillons 19 et 20, ces derniers ont été choisis pour réaliser des études approfondies. Pour l'échantillon 19, nous avons priorisé les micro-organismes selon les critères détaillés précédemment.

Cependant, pour l'échantillon 20, nous avons ajouté le critère de l'activité biologique des souches. Nous avons ainsi sélectionné les souches qui ont montré une activité antibiotique sur les bactéries suivantes : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*.

A noter que, pour les deux échantillons, la granularité de la taxonomie des micro-organismes était grossière, nous les avons donc distingués seulement par leur morphologie.

- **Les réseaux moléculaires de l'échantillon 19**

Afin de construire le réseau moléculaire global des micro-organismes de l'échantillon 19, ces derniers ont été cultivés à petite échelle en culture solide et liquide avec la résine Amberlite® XAD-16.

La technique de culture avec la résine a été employée depuis longtemps au laboratoire afin de capter les métabolites sécrétés par les micro-organismes pendant la culture. Cette technique permet de mieux concentrer les métabolites, de capter les intermédiaires de biosynthèse et de faciliter l'extraction des molécules d'intérêt¹⁰².

Après 7 jours de culture pour la condition liquide et entre 10-15 jours pour la condition solide, les métabolites des micro-organismes ont été extraits.

Les extraits bruts ont été analysés par CLUHP-HRSM/SM¹⁰³ (en mode positif). Les données obtenues ont été ensuite traitées par MZmine 2.53¹⁰⁴ puis organisées en réseau moléculaire en utilisant le « *Feature-based molecular networking*¹⁰⁵ » (**Figure 37**).

Nous avons réparti les données CLUHP-HRSM/SM en trois groupes en fonction de la taxonomie des souches (champignons, actinomycètes et bactéries (autres que actinomycètes)). À noter que, nous avons isolé 4 bactéries, 26 actinomycètes et 8

¹⁰¹ Dictionary of Natural Products

¹⁰² Le Goff, *et al.*, *Marine Drugs*, **2019**, *17*, 678.

¹⁰³ Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

¹⁰⁴ Pluskal, *et al.*, *BMC Bioinformatics*, **2010**, *11*, 395.

¹⁰⁵ Nothias, *et al.*, *Nature Methods*, **2020**, *17*, 905-908.

champignons à partir de l'échantillon 19.

Nous avons ensuite utilisé l'ISDB¹⁰⁶ afin d'annoter nos trois réseaux moléculaires. Nous avons également appliqué une pondération taxinomique¹⁰⁷ pour nos réseaux moléculaires afin d'obtenir les cinq meilleurs résultats parmi les 50 proposés par l'ISDB.

La **Figure 38** montre le réseau moléculaire des actinomycètes de l'échantillon 19, dans lequel la couleur de chaque nœud correspond à une souche. Dans ce réseau, on s'intéressera particulièrement à des *clusters* « monocouleurs » qui regroupent des ions correspondant à une famille de molécules produite à partir d'une souche. De plus, un accent sera mis sur les *clusters* contenant des m/z élevés ($m/z > 400$, rappelant des molécules macrocycliques) avec très peu ou sans annotations GNPS et/ou ISDB.

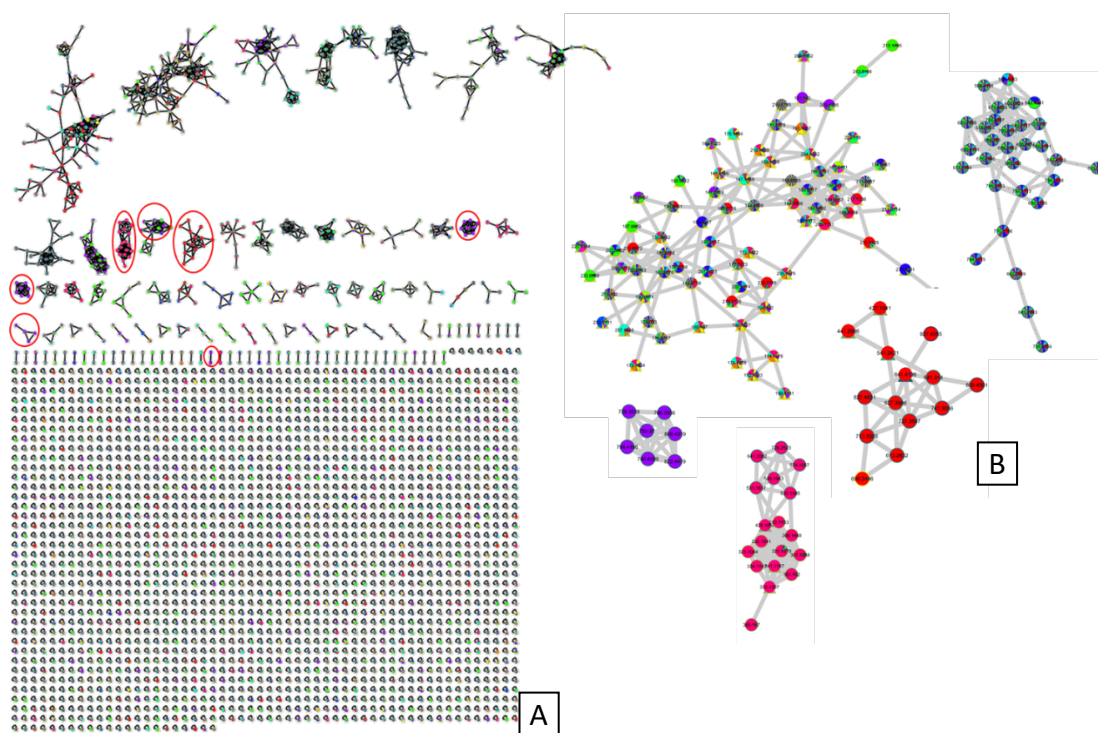


Figure 38. [A] Réseau moléculaire global des actinomycètes de l'échantillon 19. [B] Exemple des *clusters* « monocouleur » intéressants provenant d'une souche et ceux « multicolore » regroupant des molécules produites par plusieurs souches, ceux qui ne sont pas, a priori, intéressants selon nos critères.

En utilisant le réseau moléculaire, nous avons priorisé huit souches dont quatre

¹⁰⁶ Allard, et al., *Analytical Chemistry*, **2016**, *88*, 3317-23.

¹⁰⁷ Rutz, et al., *Frontiers in Plant Science*, **2019**, *10*, 1329.

actinomycètes, trois champignons et une bactérie. Un des actinomycètes a été choisi pour des études approfondies.

- **Les réseaux moléculaires de l'échantillon 20**

Nous avons également employé la stratégie de priorisation fondée sur les réseaux moléculaires pour prioriser les souches de l'échantillon 20. En plus des critères employés pour étudier les souches de l'échantillon 19, nous avons utilisé en complément, l'outil NAP¹⁰⁸ pour annoter les réseaux moléculaires des souches de l'échantillon 20. Les souches priorisées doivent produire des molécules originales et en même temps avoir des activités sur les bactéries testées.

d. **Priorisation basée sur l'utilisation des sondes chimiques**

En complément de la priorisation des micro-organismes basée sur l'exploitation des réseaux moléculaires, une stratégie complémentaire fondée sur l'utilisation de sondes chimiques a été employée dans ce projet.

Deux sondes chimiques ont été utilisées pour l'exploration ciblée de l'espace chimique des micro-organismes de l'échantillon 19 avec notamment la sonde 5-bromo-2-nitrosopyridine (**Figure 24**) et la *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide (**Figure 39**), une des sondes qui détecte les intermédiaires de biosynthèse des polyacétates décrites dans la partie « [Sondes chimiques pour détecter les intermédiaires de la voie de biosynthèse des polyacétates](#) ».

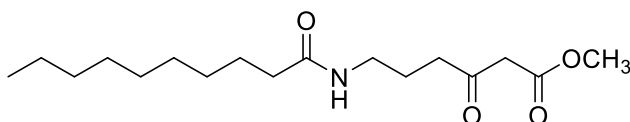


Figure 39 : Structure de la sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide

La sonde 5-bromo-2-nitrosopyridine a été incubée dans différents extraits des micro-organismes de l'échantillon 19 ([Culture à « petite échelle » et « grande échelle »](#)). Les extraits avec et sans sonde ont ensuite été analysés par CL-SM/SM avant et après injection de la sonde. Un réseau moléculaire de ces différents extraits avec et sans sonde a été réalisé.

La sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl)décanamide est plus prometteuse car elle peut être ajoutée directement dans le milieu de culture. De ce fait, cette sonde a été employée dans l'isolement guidé des molécules du *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 (voir [Étude approfondie de la souche Streptomyces albidoflavus 19-S21](#)).

Dans la partie de priorisation basée sur les sondes chimiques, seuls les résultats

¹⁰⁸ da Silva, et al., *PLoS computational biology*, **2018**, 14, e1006089.

de la sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide sur la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 seront détaillés. Les résultats de la sonde 5-bromo-2-nitrosopyridine nécessitent d'être valorisés.

CHAPITRE III :
ÉTUDE APPROFONDIE DES
MICRO-ORGANISMES
PRIORISÉES

CHAPITRE III : ÉTUDE APPROFONDIE DES MICRO-ORGANISMES PRIORISÉS

III.1 ÉTUDE DES MICRO-ORGANISMES PRIORISÉS DE L'ÉCHANTILLON 19

- Étude approfondie de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21

La souche de l'actinomycète 19-S21 a été priorisée en raison de sa production de molécules de hautes masses moléculaires regroupées dans des *clusters* « monocouleur » avec très peu d'annotations (**Figure 40**).

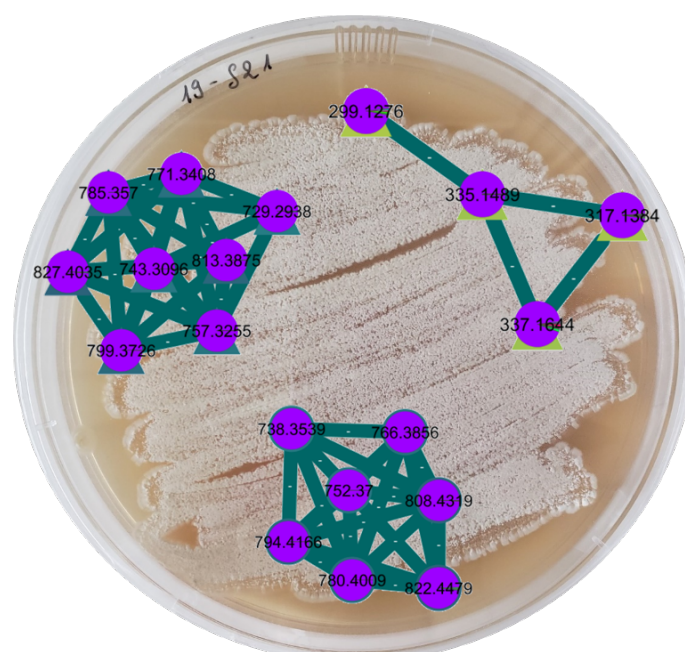


Figure 40. La souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 avec quelques exemples de ses *clusters* « monocouleur »

En analysant la phylogénie basée sur la séquence d'ARNr 16S, la souche a été identifiée comme appartenant à l'espèce *albidoflavus* (**Figure 41**). Comme toutes les espèces de ce clade (*S. canescens*, *S. champvatii*, *S. coelicolor*, *S. felleus*, *S. globisporus* ssp. *caucasicus*, *S. griseus* ssp. *solvifaciens*, *S. limosus*, *S. odorifer*, *S. sampsonii*) ont été classées comme des synonymes hétérotypiques de *S. albidoflavus*¹⁰⁹, nous avons nommé la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 avec le numéro d'accèsion dans GenBank® MW446171.

¹⁰⁹ Rong, et al., *Systematic and Applied Microbiology*, **2009**, 32, 314-22.

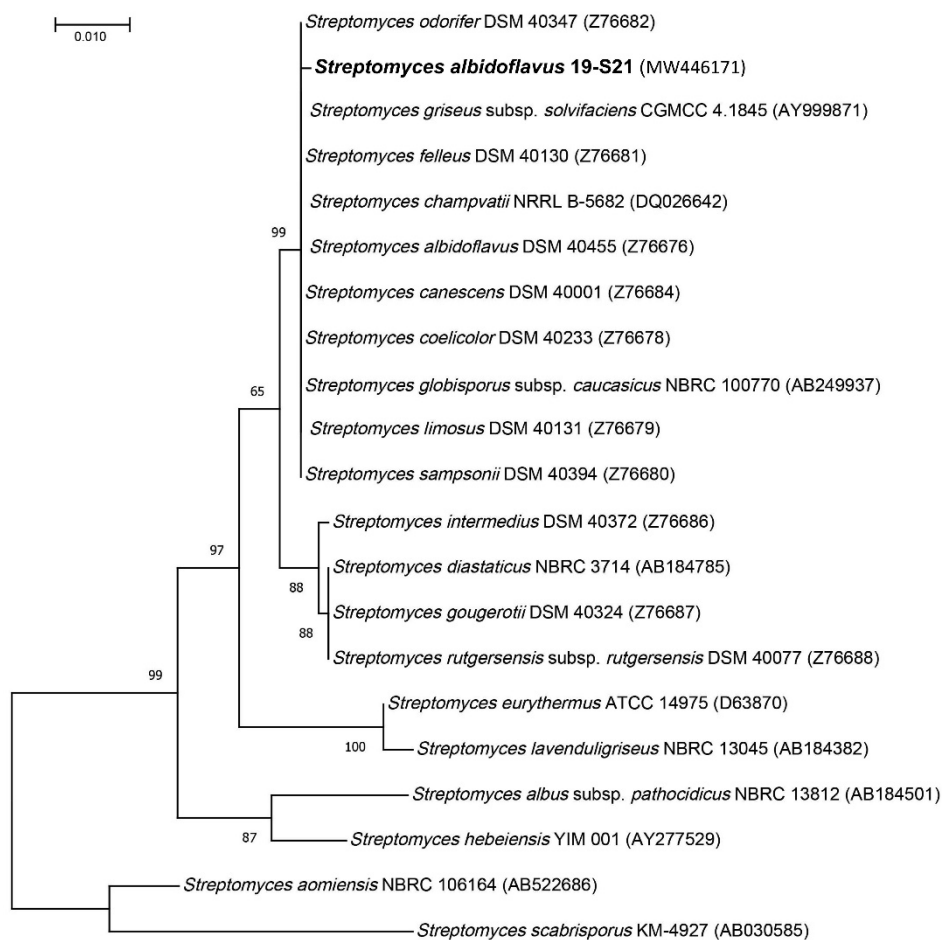


Figure 41. Arbre de proximité phylogénétique obtenu à partir de l'alignement de la séquence d'ARNr 16S de l'isolat et de *Streptomyces* spp. du groupe d'espèces *albidoflavus*

Nous utilisons les billes de résine pour capter les métabolites des micro-organismes qui sont excrétés pendant la culture ([Culture à « petite échelle » et « grande échelle »](#)) En culture liquide, les résines sont souvent piégées dans les filaments des micro-organismes, ce qui rend les profils analytiques des extraits bruts des résines-biomasses plus complexes et donc plus difficiles pour purifier des produits intéressants. Par conséquent, nous avons développé une nouvelle technique de culture, appelée SPEED (*Solid-Phase Extraction Embedded Dialysis*)¹¹⁰. La souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 a été choisie comme un cas d'étude afin de développer cette nouvelle technique de culture.

- La technique Solid-Phase Extraction Embedded Dialysis (SPEED)

¹¹⁰ Mai, et al., *Marine Drugs*, **2021**, *19*, 371.

Cette nouvelle technologie de culture a été développée afin d’empêcher l’agrégation de la biomasse des micro-organismes sur les billes de résine. Le dispositif SPEED comprend deux parties : une poche de dialyse interne et une enveloppe externe en nylon (**Figure 42**). La poche de dialyse interne permet de filtrer les molécules, seules les molécules avec la masse moléculaire appropriée peuvent passer du liquide de culture vers la résine.

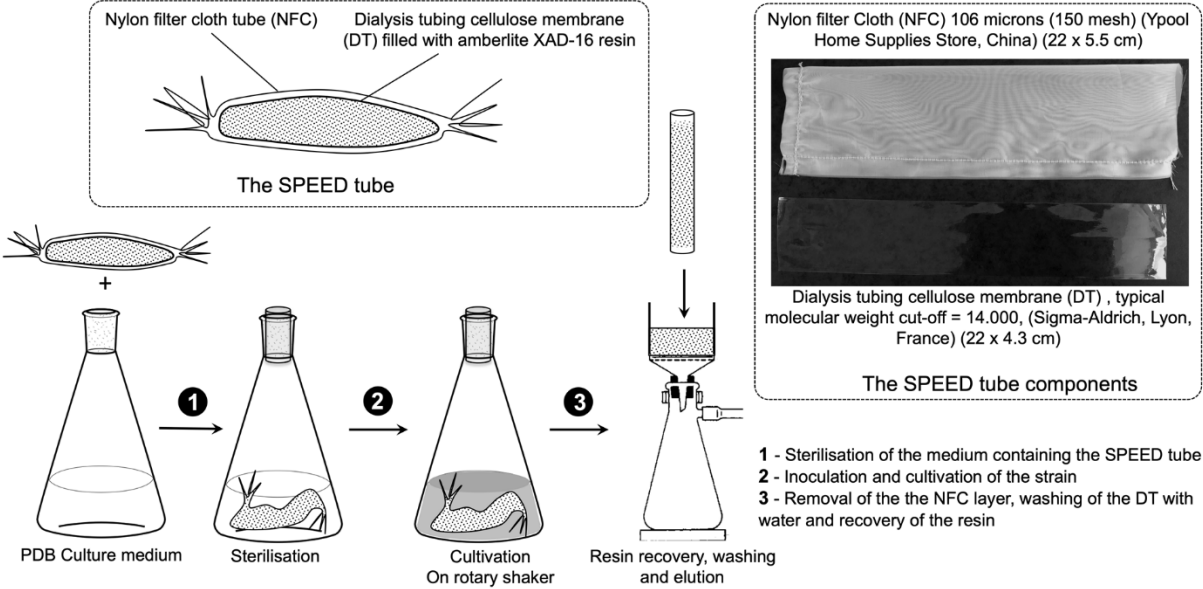


Figure 42. Représentation schématique de la technologie SPEED

Cette technique emploie une poche résistante à la chaleur, ce qui nous permet de la stériliser directement dans le milieu de culture. Nous pouvons donc ensemercer les souches dans des conditions stériles.

- Application de la technologie SPEED sur la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21

Afin de maximiser la diversité des métabolites de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, cette dernière a été cultivée dans différentes conditions de culture - solide et liquide - dans le milieu PDB (*Potato Dextrose Broth*) en présence ou absence de billes de résine (**Figure 43**).



Figure 43. Différentes conditions de culture solide et liquide de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21.

Après 11 jours de culture, les expériences dans les différentes conditions ont été traitées selon le protocole classique (voir la partie [Extraction des métabolites des micro-organismes](#)). Pour la culture solide sans résine, la gélose a été découpée à l'aide d'une spatule et séchée à 50°C afin d'enlever l'eau présente dans la gélose avant l'extraction. Pour les autres conditions avec la résine, cette dernière a été récupérée et lavée avant l'extraction. Comme la technique SPEED est récente, nous allons détailler le traitement des expériences utilisant ces conditions de culture particulières.

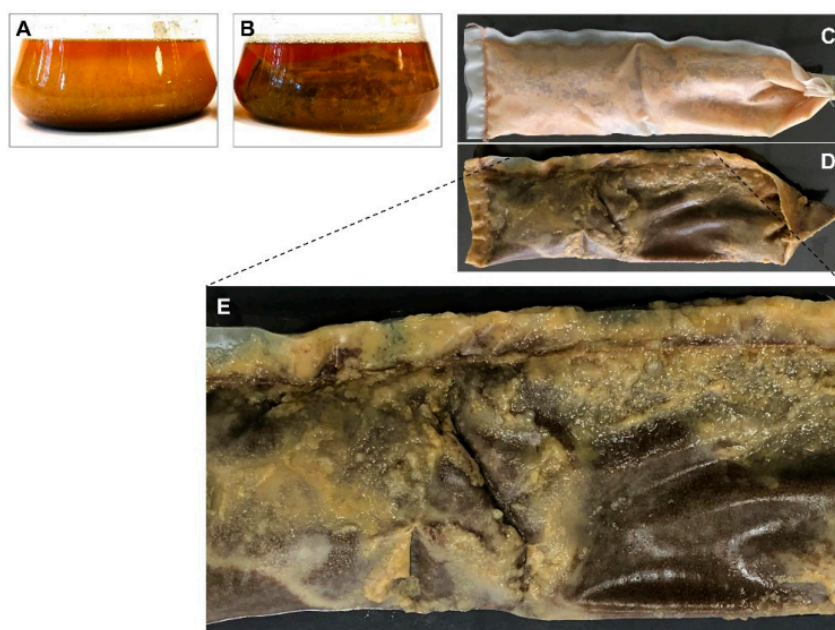


Figure 44. Différence entre la technique de culture “classique” et la technologie SPEED. **[A]** Culture liquide classique avec résine. **[B]** technique de culture SPEED. **[C]** La poche de culture SPEED après avoir enlevé le biofilm. **[D]** Poche de culture SPEED entourée par une couche de biofilm. **[E]** Agrandissement d’une partie de **[D]** montrant la couche de biofilm attachée à la poche de nylon externe.

Comme décrit précédemment, l’avantage principal de la technologie SPEED est de séparer *in situ* la biomasse des micro-organismes des résines. La poche de dialyse interne avec un seuil de coupure de 1,4 kD présente un autre avantage : elle permet de “trier” les masses des molécules, ce qui implique la possibilité de discriminer la masse des molécules biologiques de hautes masses moléculaires des métabolites spécialisés¹¹¹.

¹¹¹ Lamichhane, *et al.*, *Comprehensive Analytical Chemistry*, **2018**, 82, 387-413.

En comparant cette technique à la culture liquide classique où le milieu de culture était trouble, la technique SPEED offre un milieu de culture propre et limpide (**Figure 45A, B**). La souche s'accroche sur la poche de nylon externe et forme un biofilm autour de la poche (**Figure 45D, E**). Le tube SPEED a été récupéré soigneusement après 11 jours de culture. La couche de biofilm a été retirée en la grattant sous l'eau avec précaution permettant de récupérer la poche de dialyse sans la contaminer ni l'abîmer (**Figure 45A, B**).



Figure 45. Poches de dialyse interne (récupérées et rincées). **[A]** Poches de dialyse interne de condition SPEED de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, **[B]** L'agrandissement du sac montrant la couleur des billes de résine.

- Exploration chimique de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 en utilisant les réseaux moléculaires

4.1 Exploration du réseau moléculaire de la *Streptomyces albidoflavus* 19-S21

Toutes les conditions de culture ont été traitées et extraites par l'acétate d'éthyle puis le méthanol. Tous ces extraits bruts ont ensuite été analysés en CL-SM/SM pour construire un réseau moléculaire global de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 (**Figure 46**).

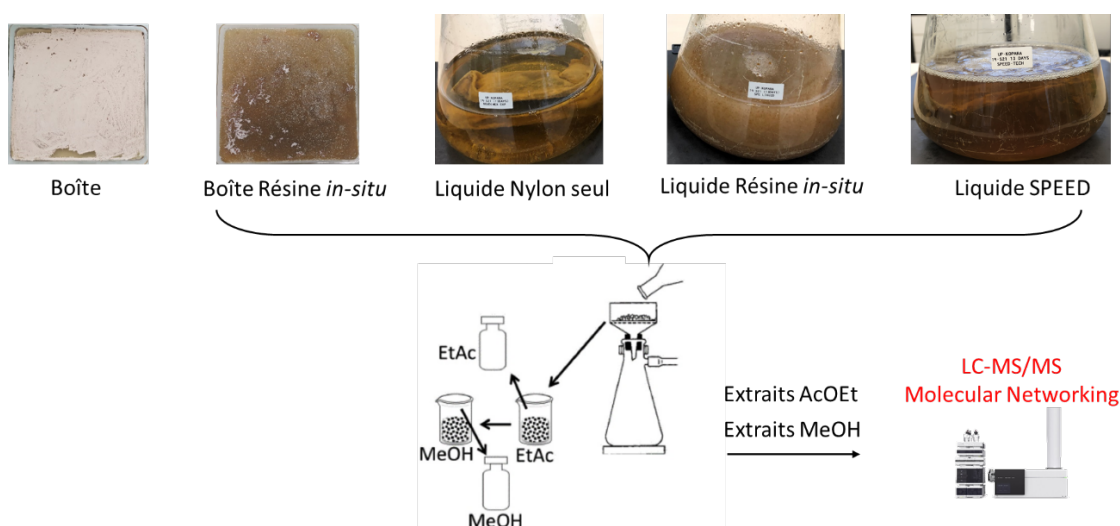


Figure 46. Les étapes pour construire le réseau moléculaire global de la souche

Tous les données SM/SM des extraits ont été traitées par Mzmine2.53¹¹² et puis téléchargées sur la plateforme GNPS¹¹³ afin de créer un réseau moléculaire de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, cultivée en différentes conditions de culture. Ce réseau comprenait 2714 nœuds et 136 *clusters*.

Le réseau moléculaire de cette souche a permis de visualiser une partie de sa diversité chimique en fonction des conditions de culture. Nous observons dans ce réseau moléculaire :

- Un *cluster* contenant des surugamides, une famille d'octapeptides cycliques initialement isolées à partir de *Streptomyces* marin sp. JAMM992, a été mis en évidence uniquement en condition de culture solide (**Figure 47A**).
- Un *cluster* à sidérophores de type desférioxamines, principalement retrouvé dans les extraits méthanoliques et en condition de culture liquide (**Figure 47B**).
- L'antimycine A1 et trois autres antimycines (antimycines A2, A3 et A4) ont été annotées et produites par la souche dans différentes conditions de culture (**Figure 47C et Figure 69**). Les antimycines comprennent divers squelettes en fonction de la taille de la lactone et de ses substitutions. Ces composés ont été décrits chez de nombreux *Streptomyces* et présentent des activités biologiques intéressantes, telles que des activités antifongiques, insecticides, nématocides, en raison – notamment – de leur capacité à bloquer le transport des électrons dans les mitochondries. Plusieurs classes d'antimycines ont également été signalées comme possédant de puissantes activités anti-inflammatoires et antitumorales^{114,115}.

¹¹² Pluskal, *et al.*, *BMC Bioinformatics*, **2010**, *11*, 395.

¹¹³ Wang, *et al.*, *Nature Biotechnology*, **2016**, *34*, 828-837.

¹¹⁴ Liu, *et al.*, *Natural Product Reports*, **2016**, *33*, 1146.

¹¹⁵ Li, *et al.*, *Frontiers in Microbiology*, **2017**, *8*, 678.

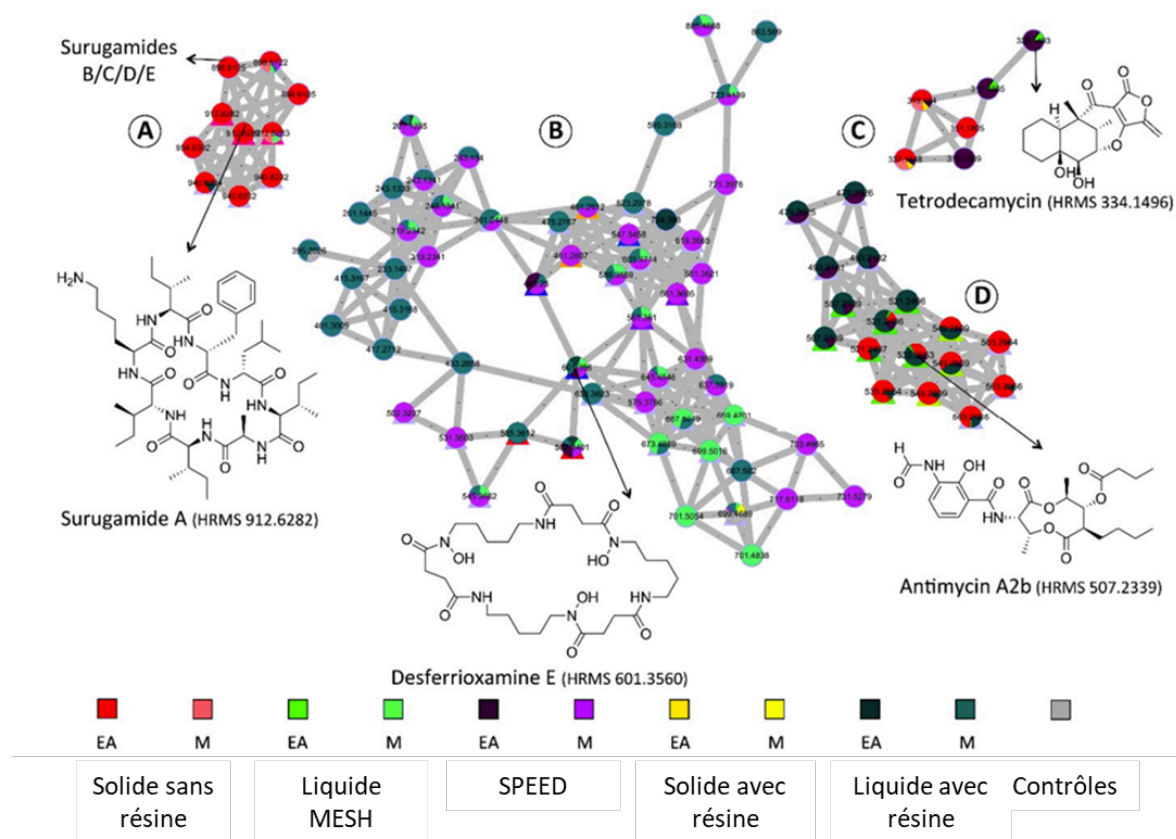


Figure 47. Réseau moléculaire construit à partir de différents extraits bruts de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21. **[A]** Cluster de la famille des surugamides. **[B]** Cluster des desferrioxamines. **[C]** Clusters des antimycines et **[D]** Cluster des molécules non annotées produites principalement dans les conditions SPEED. Les contrôles représentent des extraits des résines seules dans des différentes conditions de culture et des extraits de la gélose PDB, sans la présence de la souche. EA = extrait à l'acétate d'éthyle ; M = extrait au méthanol

4.2 Isolement de la tétrodécamycine

Un *cluster* avec des nœuds non annotés a été détecté dans le réseau moléculaire. L'ion au $m/z = 335,1459$ $[M+H]^+$ a attiré notre attention car il a été produit principalement dans la condition SPEED (**Figure 47C**). Afin de dérépliquer cette molécule, la formule brute générée à partir de sa masse exacte a été recherchée dans les bases de données *AntiBase®* (Wiley) et *Dictionary of Natural Products®*. Nous avons trouvé 125 *hits* dans le *Dictionary of Natural Products®* dont un *hit* correspondant à la tétrodécamycine, une molécule isolée à partir de *Streptomyces*

nashvillensis MJ885-mF8¹¹⁶.

Afin de confirmer la déréplication basée sur le réseau moléculaire de ce composé à $m/z = 335,1459$ $[M+H]^+$, ainsi que les annotations des autres molécules par le GNPS, l'extrait à l'acétate d'éthyle du milieu de culture obtenu dans les conditions dites SPEED a été étudié. Les extraits bruts de toutes les conditions de culture de la souche ont été également analysés par CLHP. La présence unique de la molécule à $m/z = 335,1459$ ($T_r = 20,2$ min) en condition SPEED a été confirmée en comparant les profils CLHP-UV-DEDL¹¹⁷ analytiques des conditions de culture liquide classique à celle du SPEED (**Figure 47A,B**).

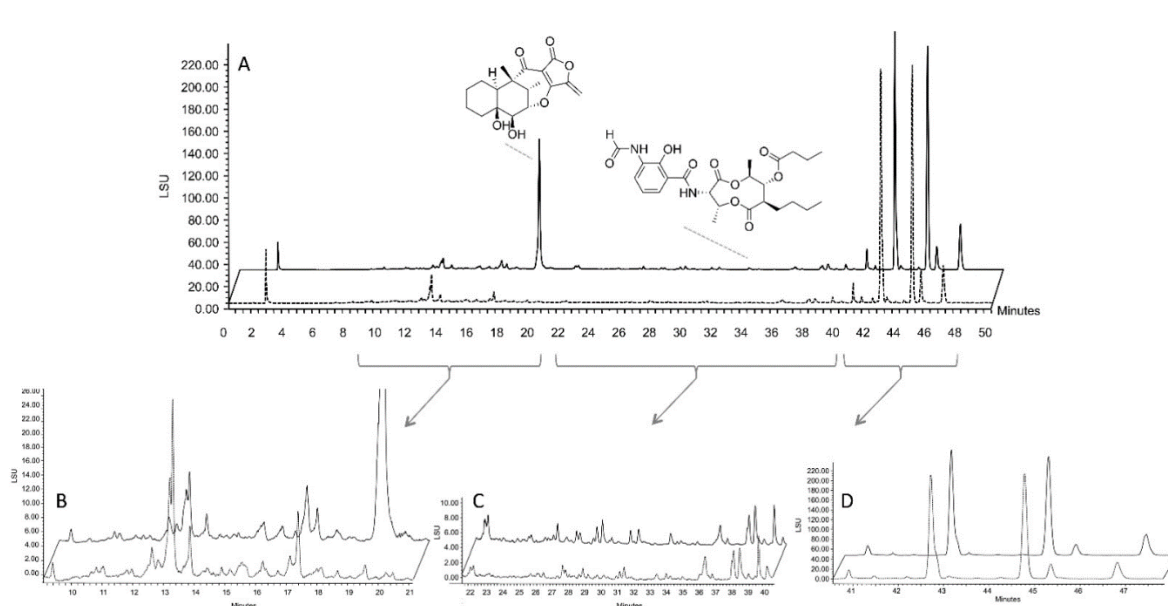


Figure 48. Les profils de CLHP analytiques des conditions de culture liquide classique et celle du SPEED. **[A]** Profil de CLHP-DEDL de SPEED (ligne continue) et de condition classique (ligne pointillée). Selon les profils UV des composés, nous les avons répartis en trois zones : **[B]** zone contenant la molécule à $m/z = 335,1459$, déréplicquée en tant que tétrodécamycine, **[C]** zone contenant des antimycines et **[D]** zone des acides gras

Afin d'isoler et de confirmer l'identité de la molécule à $m/z = 335,1459$ ($C_{18}H_{22}O_6$), l'extrait à l'acétate d'éthyle des conditions SPEED a été fractionné en utilisant la chromatographie flash. La purification de cette molécule a été réalisée par CLHP semi-préparative en phase inverse.

¹¹⁶ Tsuchida, *et al.*, *J Antibiot (Tokyo)*, **1994**, *47*, 386-8.

¹¹⁷ Chromatographie Liquide Haute Performance – Ultra-violet - Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière

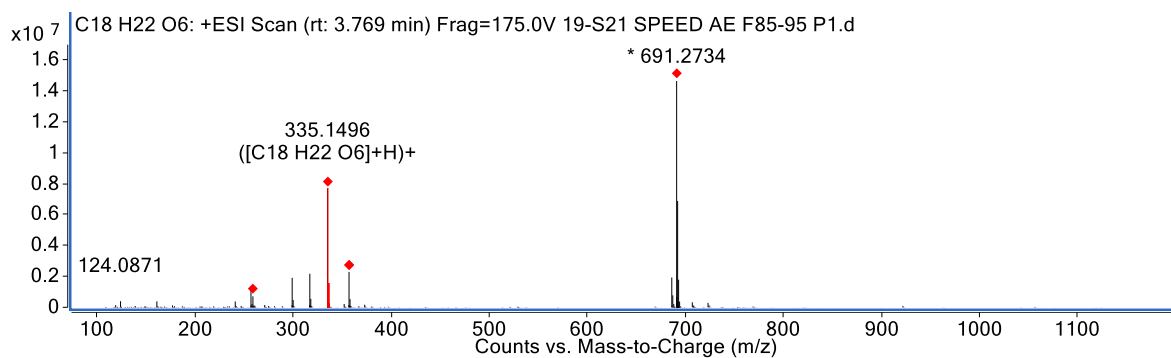


Figure 49. Spectre HR-ESIMS en mode positif de la tétrodécamycine

La molécule a été identifiée comme étant la tétrodécamycine en comparant ses données RMN ¹H et ¹³C avec celles de la littérature (**Figure 50, Figure 51**)¹¹⁸.

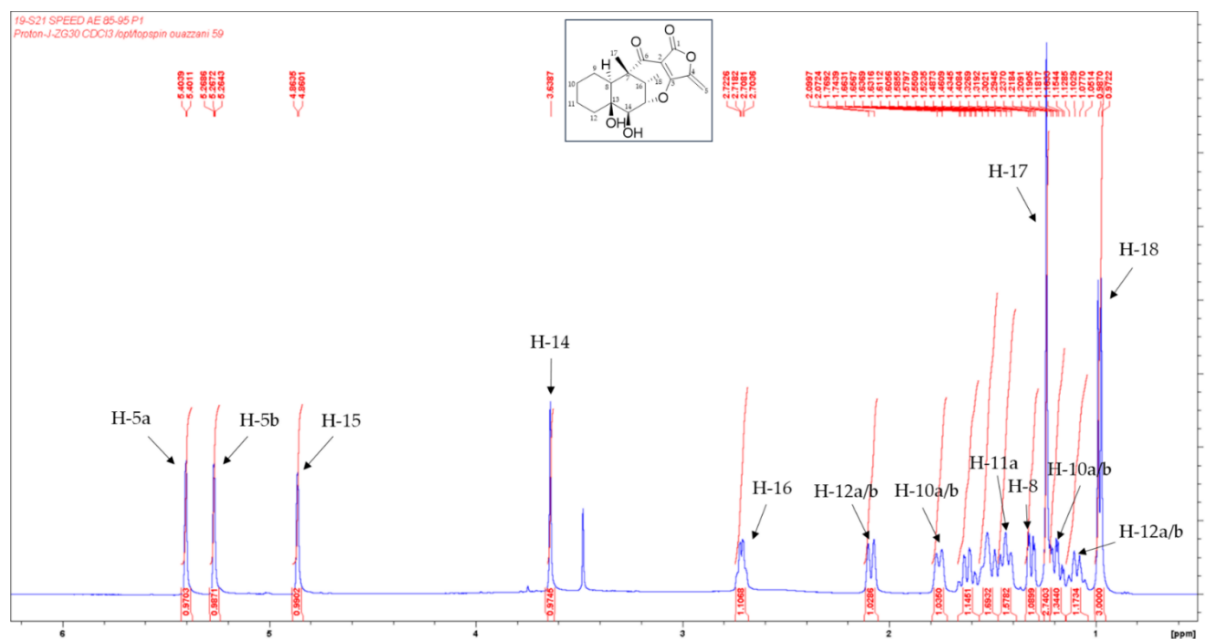


Figure 50. Spectre RMN ¹H de la tétrodécamycine dans CDCl₃ (500 MHz)

¹¹⁸ Tsuchida, *et al.*, *J Antibiot (Tokyo)*, **1995**, *48*, 1104-9.

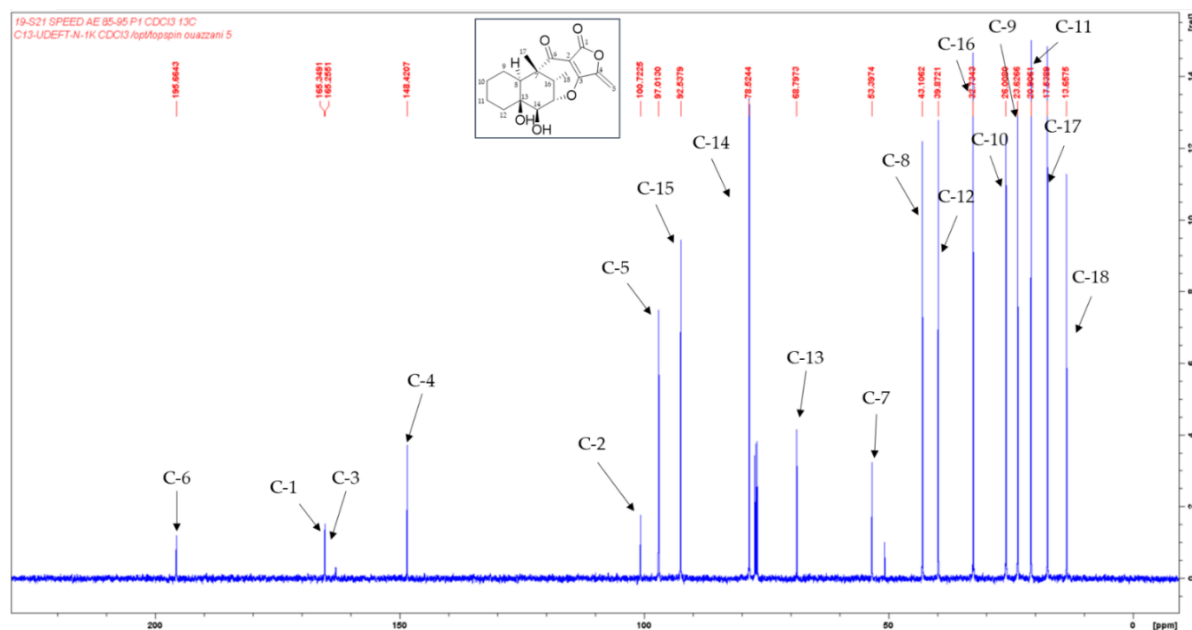


Figure 51. Spectre RMN ^{13}C de la tétrodécamycine dans CDCl_3 (125 MHz)

- Annotation *in silico* du réseau moléculaire de la souche par NAP

Nous avons reconstruit le réseau moléculaire en baissant le « cosine score » et en ajoutant la tétrodécamycine dans la base de données GNPS¹¹⁹ afin d'identifier les potentiels analogues des molécules identifiées (**Figure 52A**).

Nous avons ensuite utilisé un outil d'annotation *in silico*, *Network Annotation Propagation* (NAP) pour annoter notre réseau moléculaire. Cet outil intégré sur la plateforme du GNPS, est très utile pour annoter les molécules qui n'ont aucun *match* dans les bases de données spectrales. Cet outil utilise *MetFrag* pour générer les spectres *in silico* et reclasse les structures candidates en tenant compte de la topologie du réseau moléculaire.

En utilisant le « fusion scoring », NAP a permis d'identifier un analogue de la tétrodécamycine, la dihydrotétrodécamycine ($m/z = 337,1647$, $[\text{M}+\text{H}]^+$). Cette molécule représente une modification au niveau de la position 5-*exo*-méthylène (**Figure 52B**). La molécule $m/z = 337,1647$ a été isolée et identifiée. Sa structure a été confirmée en comparant ses données spectroscopiques (HR-ESIMS et X-Ray) à celles dans la littérature¹²⁰.

¹¹⁹ Global Natural Products Social Molecular Networking

¹²⁰ Tsuchida, *et al.*, *J Antibiot (Tokyo)*, **1995**, *48*, 1110-4.

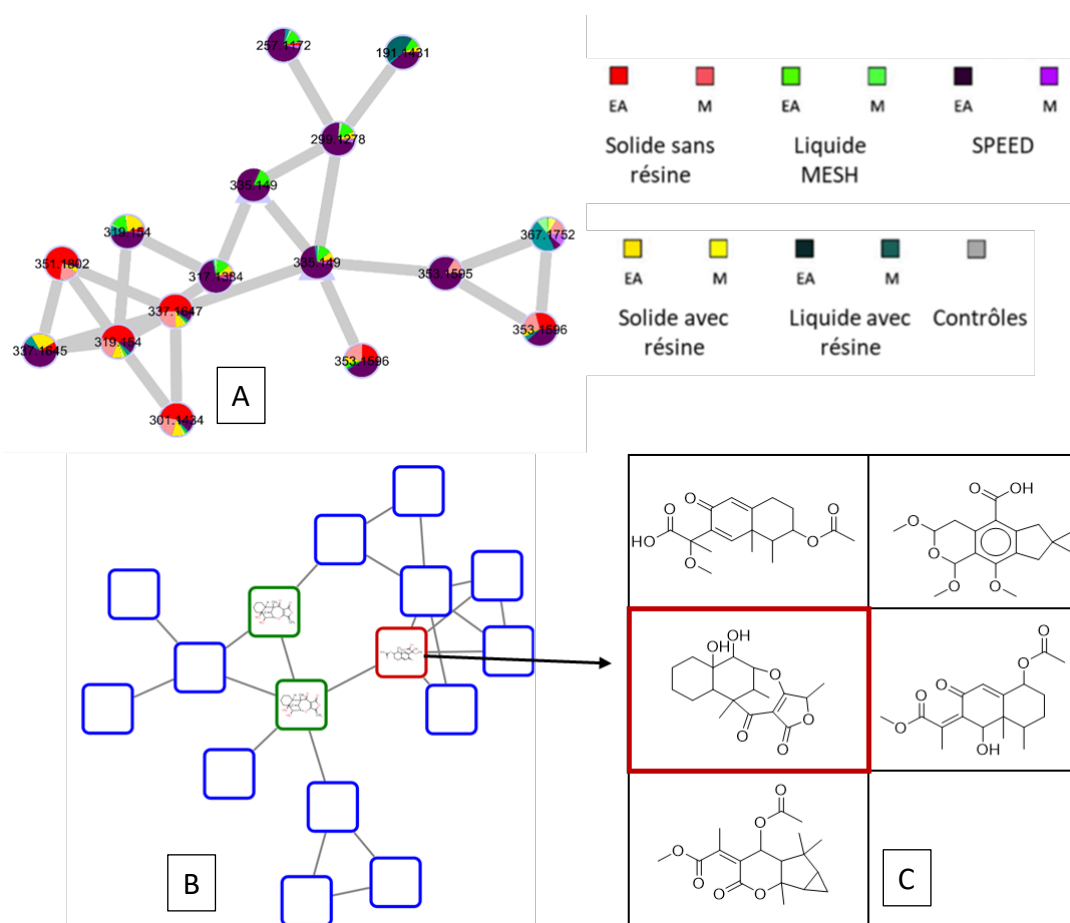


Figure 52. **[A]** Cluster de la tétrodécamycine et ses analogues. **[B]** Cluster de la tétrodécamycine annoté par NAP. Les structures des nœuds ont été visualisées à l'aide du logiciel Cytoscape® en utilisant l'outil ChemViz2. Le nœud en vert représente l'annotation expérimentale émanant du GNPS (tétrodécamycine). **[C]** Les cinq meilleures structures candidates du nœud encerclé en rouge proposées par NAP en utilisant le « fusion scoring ».

Une molécule à $m/z = 353,1596$ $[M+H]^+$ sans annotation dans le même cluster a été détectée (**Figure 52A**). Nous avons supposé que cette molécule représente un nouvel analogue de la tétrodécamycine (composé **1**).

Une différence de 17 Da entre ces deux molécules indique que la molécule à $m/z = 353,1596$ possède un groupement hydroxyle supplémentaire. Sa formule brute ($C_{18}H_{24}O_7$) a pu être générée par MassHunter® à partir de ces données HR-ESIMS ($[M+H]^+ = 353,1603$) (**Figure 53**).

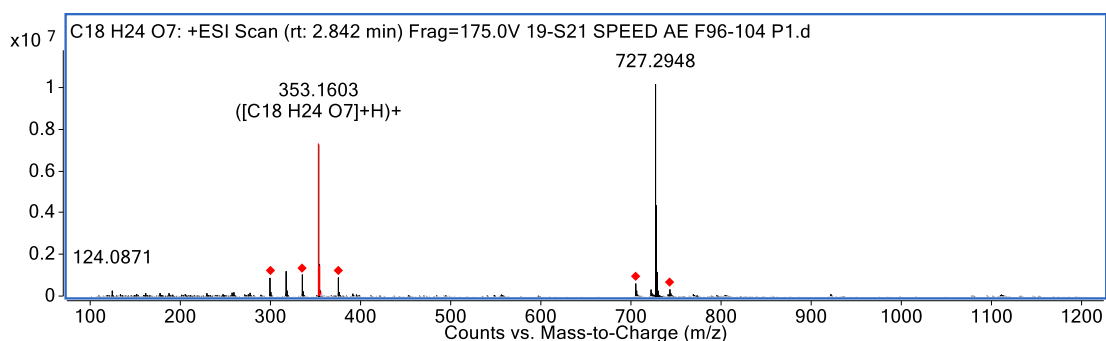


Figure 53. Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **1**

Les spectres RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C de ce composé sont similaires à ceux de la tétrodécamycine. La différence principale entre les spectres RMN ^1H se traduit par l'apparition du signal du méthyle en position 5 à $\delta_{\text{H}} = 1,63$ ppm sous la forme d'un singulet (**Figure 54**).

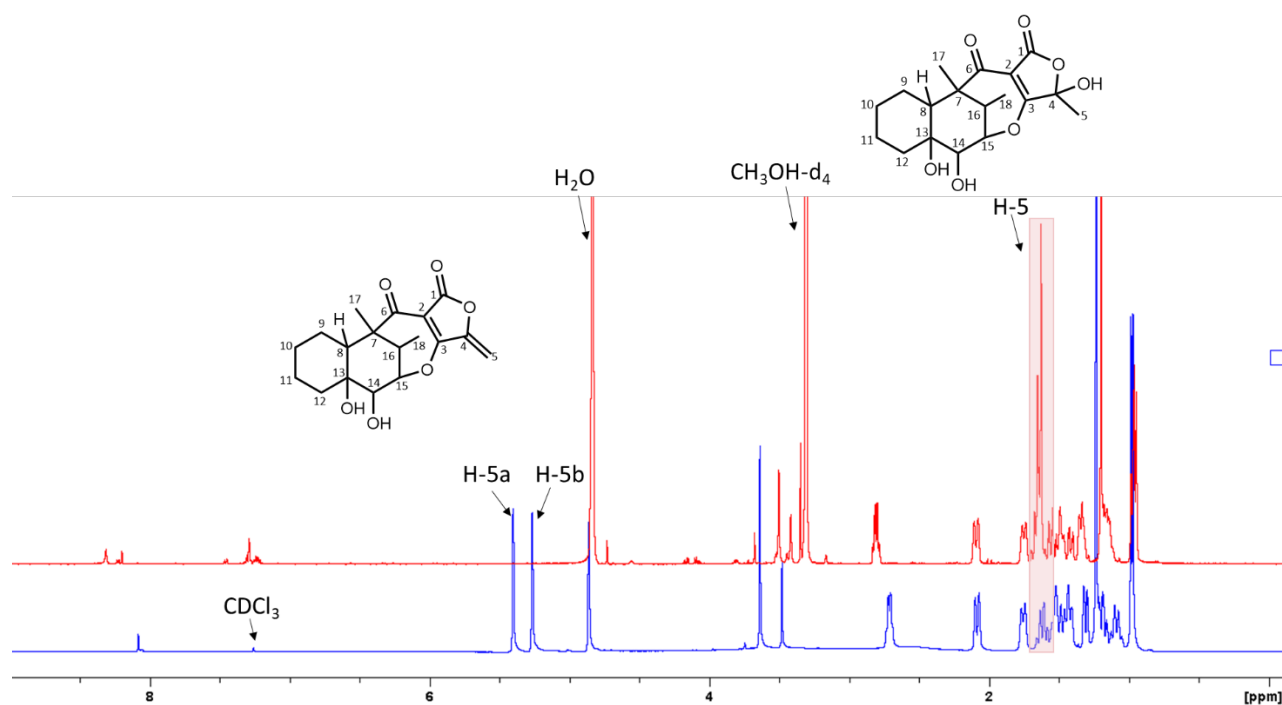


Figure 54 : Superposition des spectres RMN ^1H de la tétrodécamycine (bleu, 500MHz, CDCl_3) et du composé **1** (rouge, 500MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Ce composé, 4-hydroxydihydro-tétrodécamycine, a été décrit récemment à partir de *Streptomyces* sp. HU051¹²¹, une souche isolée d'un échantillon de sol des monts Huangshan dans la province de l'Anhui.

¹²¹ Liu, et al., *Bioorganic Chemistry*, **2022**, 119, 105573.

4.3 Formation spontanée des dimères vinylocyclobutanes de la tétrodécamycine

Pendant la procédure de purification, nous avons isolé deux nouvelles molécules : la **spirobistétrodécamycine A** (composé **2**) et la **spirobistétrodécamycine B** (composé **3**). Ce sont les premiers dimères de type « vinylocyclobutanes » de la tétrodécamycine, isolés de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21.

Puisque les deux molécules présentent un cyclobutane qui relie les deux entités de tétrodécamycine, nous nous sommes interrogés sur l'origine naturelle ou artéfactuelle de ces deux molécules. Ces deux composés sont-ils des produits de condensation spontanée de la tétrodécamycine par la lumière¹²² ?

4.3.1 Purification des deux dimères de la tétrodécamycine

Une analyse CL-SM d'un échantillon de tétrodécamycine exposé à la lumière naturelle a révélé la présence de nouveaux produits (**Figure 55**).

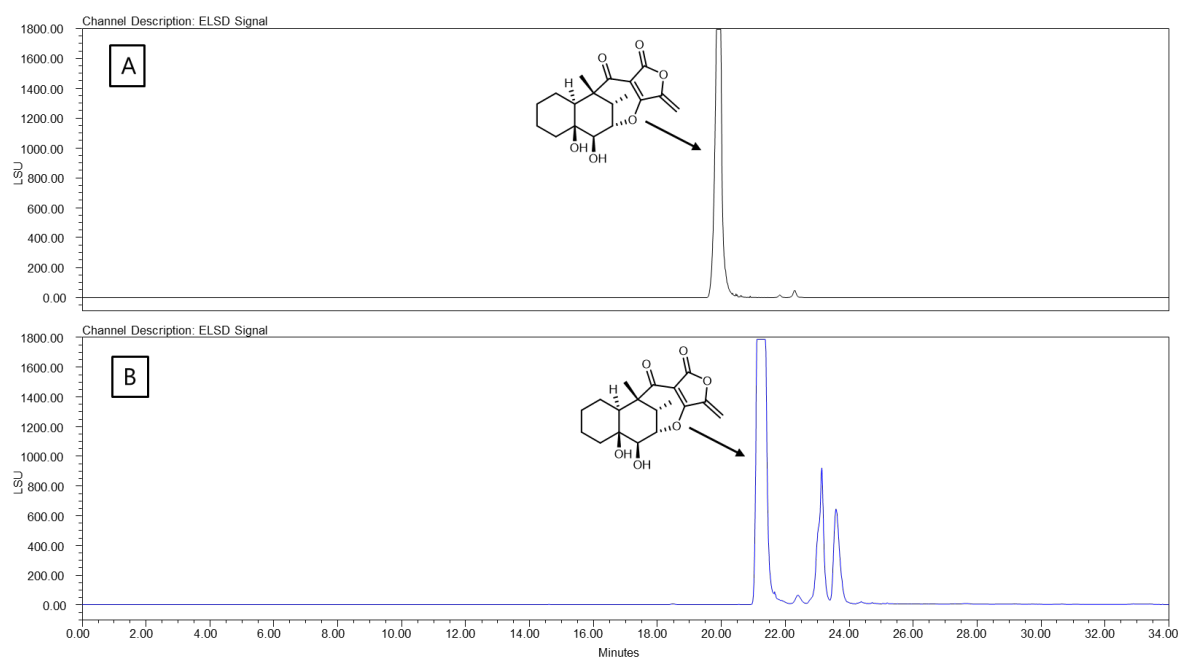


Figure 55: Apparition de nouveaux produits dans la fraction contenant de la tétrodécamycine. [A] Profil CLHP-DEDL analytique de cette fraction (date d'analyse : 08/12/2020). [B] Profil CLHP- DEDL préparative de la même fraction avec l'apparition des nouveaux produits (date d'analyse : 22/03/2021). Il y a un décalage au niveau du temps de rétention en raison de la date d'analyse et de l'appareil (CLHP analytique en haut et semi-préparative en bas)

¹²² Liu, *et al.*, *Natural Product Reports*, **2021**, 38, 1469-1505.

- Élucidation structurale du composé **2**

La spirobistétrodécamycine A (**2**) a été obtenue sous la forme d'un solide blanc amorphe. Les analyses de masse haute résolution en mode positif de cette molécule relève un ion moléculaire à $m/z = 669,2906$ $[M+H]^+$, correspondant à la formule brute $C_{36}H_{44}O_{12}$ et révèle la présence de quinze insaturations (**Figure 56**).

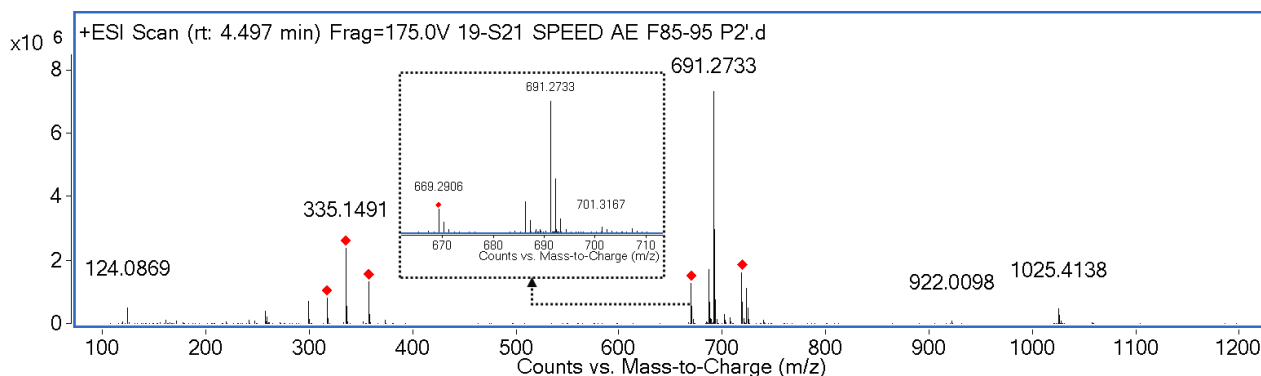


Figure 56. Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **2**

En explorant les spectres RMN¹²³ du ¹H et du ¹³C de ce composé, nous n'avons détecté que la moitié des signaux de proton et de carbone attendus. De plus, nous avons noté que ces signaux étaient similaires à ceux de la tétradécamycine (**Figure 57**).

La différence principale entre les spectres RMN de ces deux molécules est le changement du signal des protons du méthylène en position 5 et le changement du déplacement du carbone quaternaire en position 4 ($\delta_C = 86,9$ ppm). Ces protons sont non équivalents et sont représentés par deux doublets dans la tétradécamycine ($\delta_H = 5,26$; $5,40$, $\delta_C = 97,0$ ppm) tandis qu'ils deviennent équivalents dans la spirobistétrodécamycine A. Nous avons observé un singulet pour ces protons ($\delta_H = 2,64$, $\delta_C = 25,8$ ppm) (**Figure 57**).

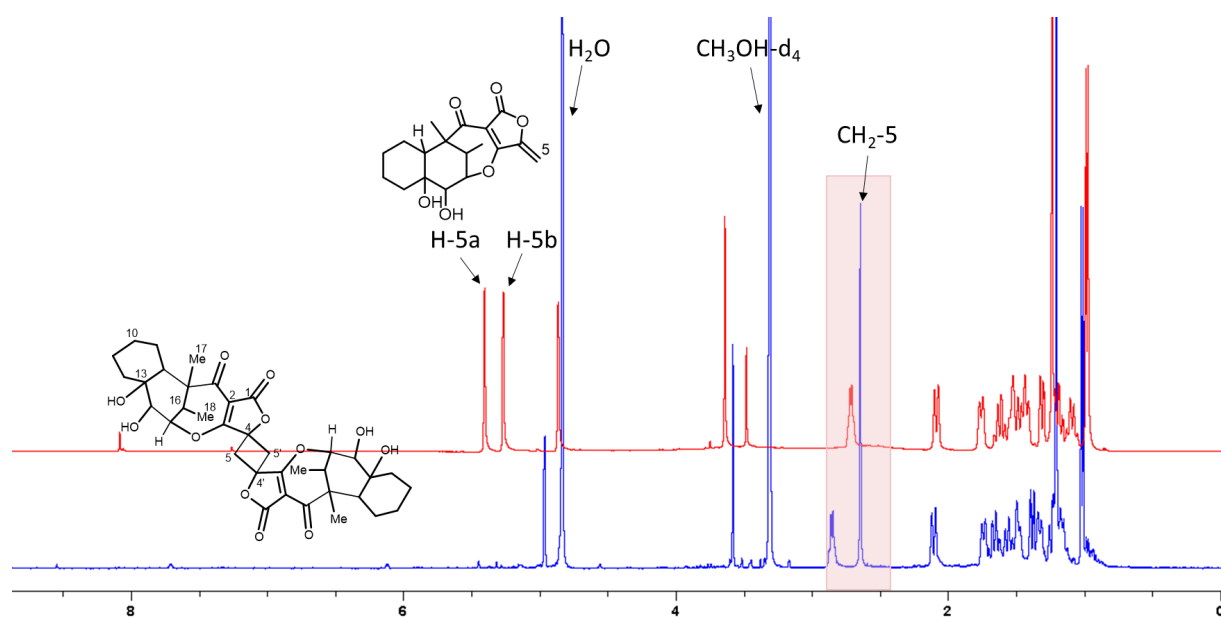
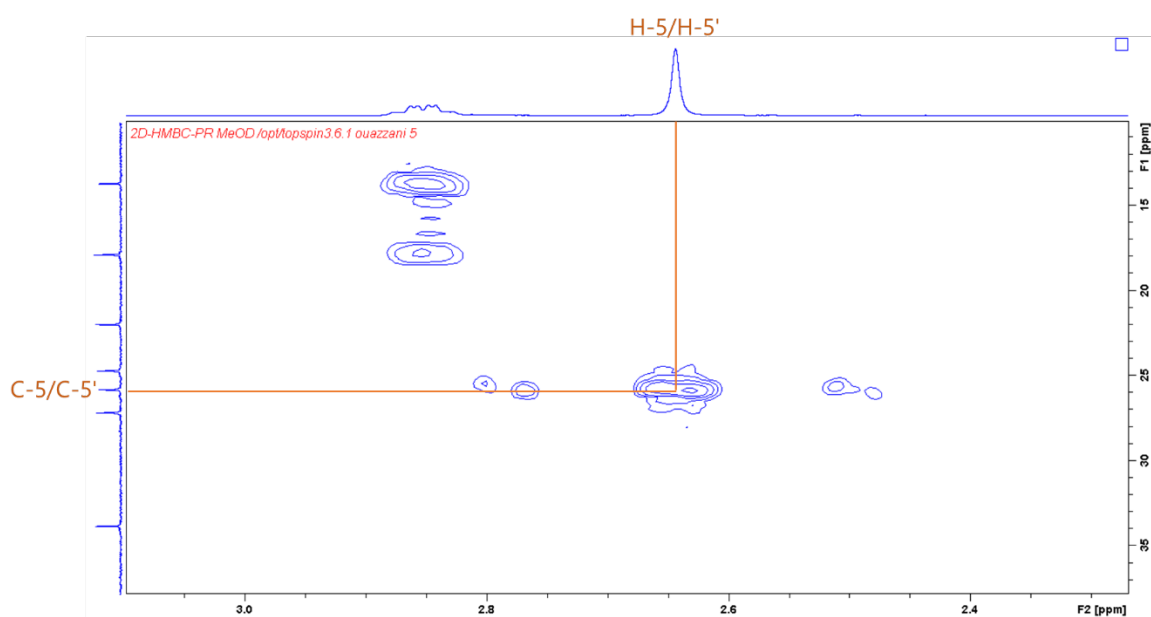


Figure 57 : Superposition des spectres RMN ^1H de la tétrodécamycine (rouge, 500 MHz, CDCl_3) et du composé **2** (bleu, 500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

De plus, une étrange corrélation ^1H - ^{13}C HMBC¹²⁴ du proton H-5 à son carbone C-5 a attiré notre attention. En inspectant attentivement cette corrélation, nous avons finalement découvert qu'elle vient des corrélations entre les proton H-5/H-5' et les carbones C-5/C-5' (**Figure 58**). Ces observations nous ont permis de conclure que ce composé est un homodimère *spiro* $\Delta^{\alpha,\beta}$ -buténolide de la tétrodécamycine.



¹²⁴ Heteronuclear Multiple Bond Correlation

Figure 58. Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC pour le composé **2** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

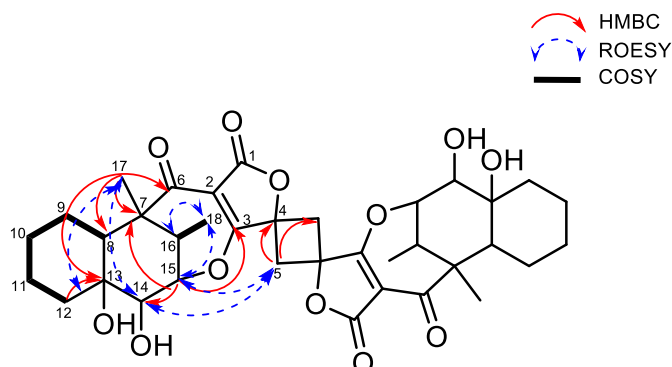


Figure 59. Corrélations COSY¹²⁵, ROESY¹²⁶ et HMBC du composé **2** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN du proton ^1H , du carbone ^{13}C , de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 1** suivant :

Tableau 1 : Déplacements chimiques des protons (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) et des carbones (125 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) du composé **2**

Position	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{C} (ppm)	HMBC
1/1'	-	168,6	-
2/2'	-	101,6	-
3/3'	-	178,8	-
4/4'	-	86,9	-
5/5'	2,64 (2H, s)	25,8	C-3, 4, 5'/ C-3', 4', 5
6/6'	-	196,9	-
7/7'	-	54,5	-
8/8'	1,38 (1H, dd, $J = 12,2, 4,2$ Hz)	44,1	C-6, 7, 9, 13, 14, 17/ C-6', 7', 9', 13', 14', 17'
9/9'	1,33 (1H, m) 1,66 (1H, dd, $J = 12,4, 3,1$ Hz)	24,7	C-17, 13 C-8/ C-17', 13' C-8'
10/10'	1,16 (1H, m) 1,74 (1H, br d, $J = 12,4$ Hz)	27,1	-
11/11'	1,48 (1H, m) 1,57 (1H, m)	21,9	-
12/12'	1,23 (1H, m)	40,3	C-11

¹²⁵ COrelated Spectroscopy

¹²⁶ Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy

	2,11 (1H, d, $J = 14$ Hz)		C-8, 10, 13/ C-11' C-8', 10', 13'
13/13'	-	69,6	-
14/14'	3,58 (1H, br s)	80,1	C-12, 15, 16, 18/ C-12', 15', 16', 18'
15/15'	4,96 (1H, br d, $J = 2,8$ Hz)	95,4	C-3, 7, 14/ C-3', 7', 14'
16/16'	2,85 (1H, qd, $J = 7,5, 2,9$ Hz)	33,8	C-6, 7, 17, 18/ C-6', 7', 17', 18'
17/17'	1,21 (3H, s)	17,9	C-6, 7, 8, 16/ C-6', 7', 8', 16'
18/18'	1,01 (3H, d, $J = 7,4$ Hz)	13,7	C-7, 15, 16/ C-7', 15', 16'

Il existe deux régio-isomères possibles pour les dimères possédant un cycle à quatre chaînons : cyclobutane 1,2-disubstitué et 1,3-disubstitué¹²⁷.

En se penchant sur le mécanisme de dimérisation de la tétrodécamycine, les différents diastéréoisomères de deux dimères ont été proposés (**Figure 60**). Comme les protons CH₂ en position 5 et 5' apparaissent sous forme d'un singulet ($\delta_{\text{H}} = 2,64$ ppm) au lieu d'un multiplet, le régio-isomère de type cyclobutane 1,3-disubstitué (**A**) (**Figure 60**) a été retenu pour le composé **2**.

¹²⁷ Poplata, *et al.*, *Chemical Reviews*, **2016**, 116, 9748-815.

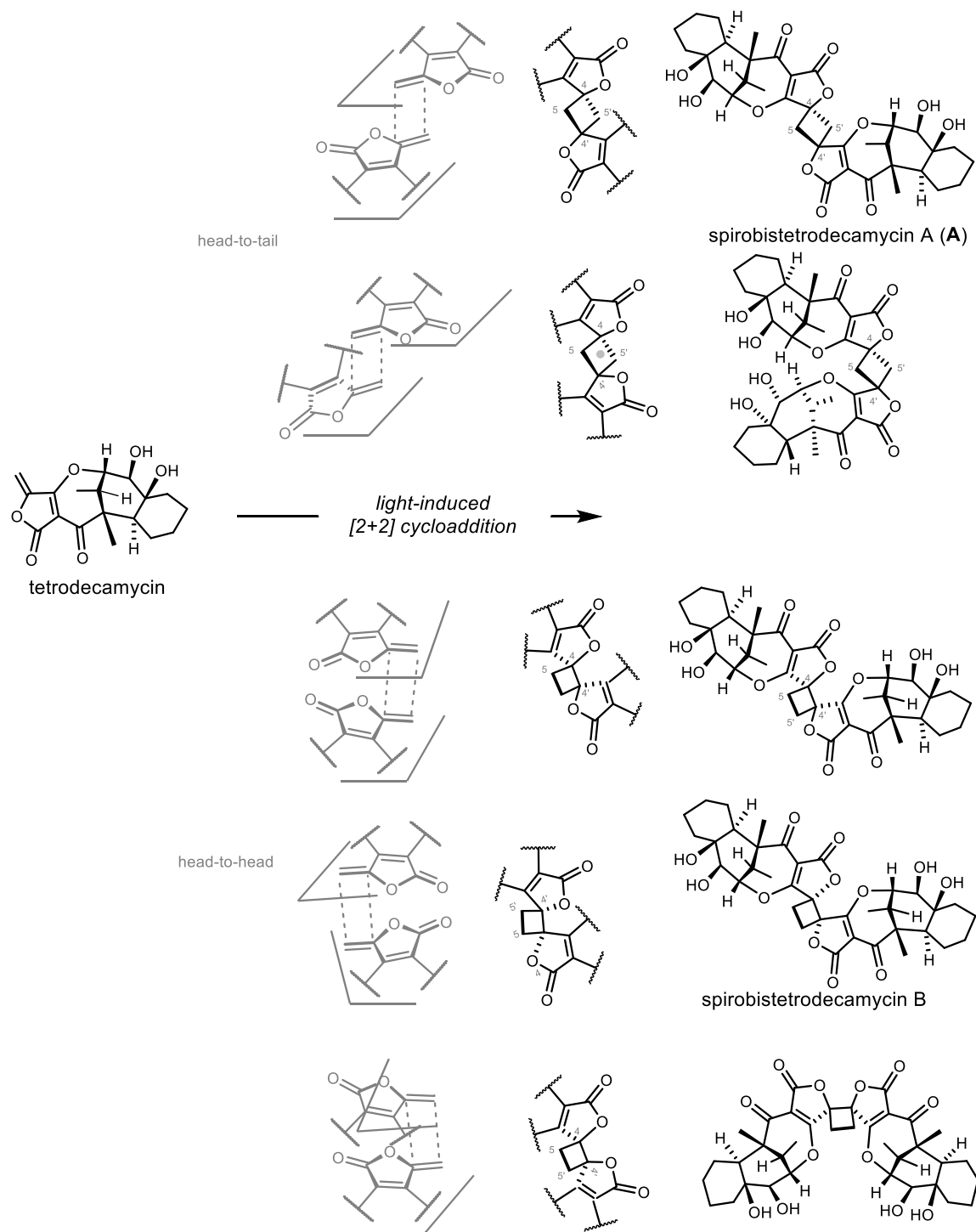


Figure 60 : Les différents diastéréoisomères possibles résultant de l'homodimérisation de la tétradécamycine formés par la réaction de photocycloaddition [2+2]

- **Élucidation structurale du composé 3**

Le composé **3**, la spirobistétradécamycine B, a été obtenu sous forme cristalline blanche. Les analyses de masse haute résolution en mode positif de cette molécule relève un ion moléculaire à $m/z = 669,2910$ $[M+H]^+$, correspondant à la formule brute

$C_{36}H_{44}O_{12}$ et révèle la présence de quinze insaturations (**Figure 61**).

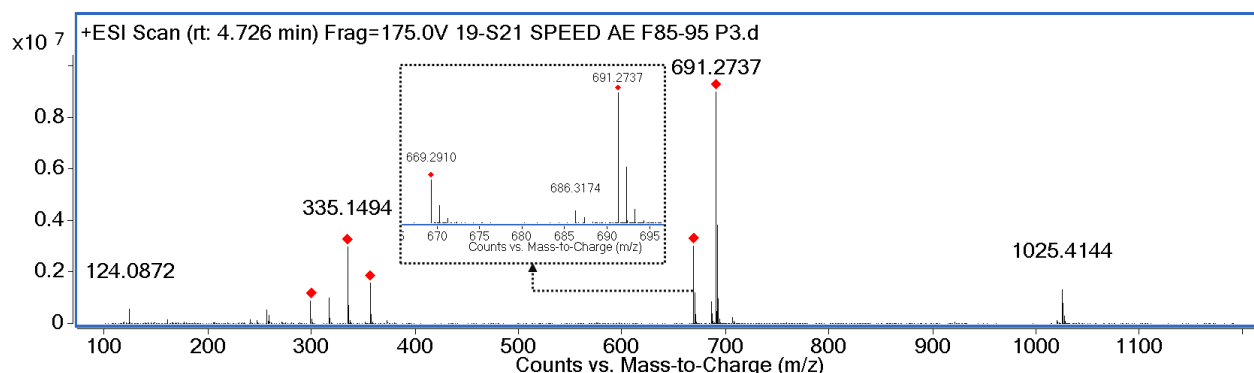


Figure 61. Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **3**

Ses données RMN du proton 1H et du carbone ^{13}C ont également montré la moitié des signaux protons et carbones attendus. Cela suggérerait que ce composé pourrait être un deuxième homodimère de la tétrodécamycine.

Cependant, la multiplicité des protons méthyléniques en position 5 et 5' ($\delta_H = 2,62 ; 2,67$, $\delta_C = 25,5$ ppm) apparaissant sous forme de multiplet, contrairement à la forme singulet chez la spirobistérodécamycine A ($\delta_H = 2,64$, $\delta_C = 25,8$) (**Figure 62**).

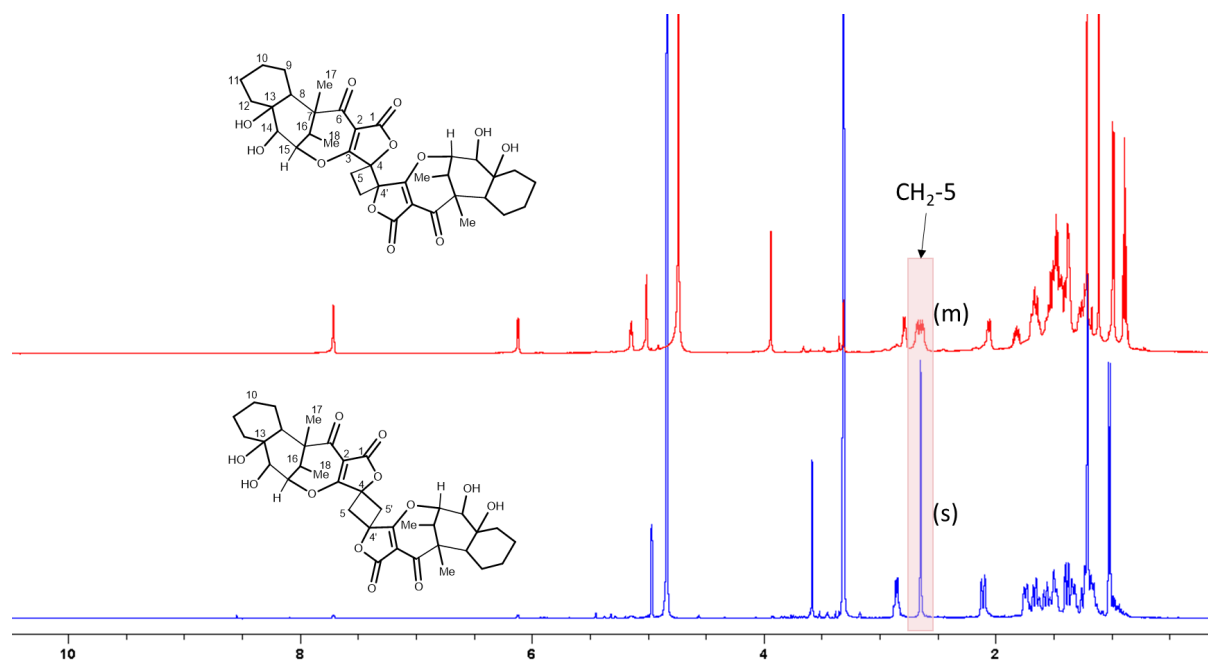


Figure 62. Superposition des spectres RMN 1H du composé **2** (bleu, 500 MHz, CH_3OH-d_4) et du composé **3** (rouge, 600 MHz, CH_3OH-d_4)

Nous avons retrouvé la même corrélation ^1H - ^{13}C HMBC des protons H-5/H-5' et des carbones C-5/C-5' dans le composé **3** (Figure 63). Cela permet de confirmer que ce composé est le deuxième homodimère de la tétrodécamycine.

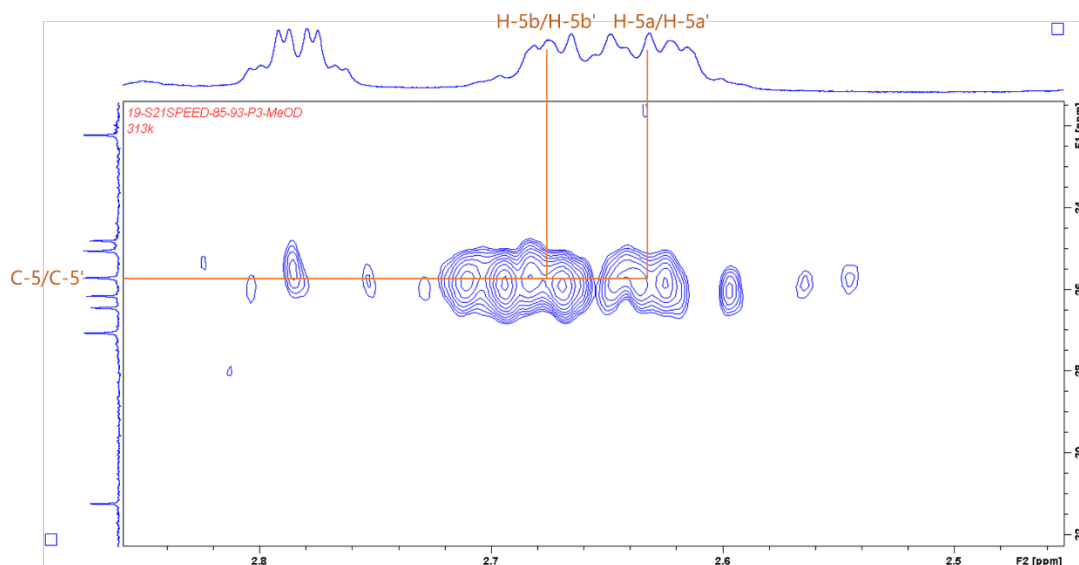


Figure 63 : Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC des protons H-5/H-5' et des carbones C-5/C-5' pour le composé **3** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

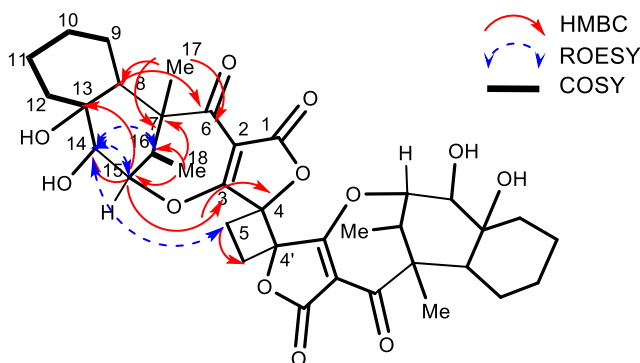


Figure 64. Corrélations COSY, ROESY et HMBC du composé **3** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN du proton ^1H , du carbone ^{13}C , de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 2** ci-dessous :

Tableau 2. Déplacements chimiques des protons (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) et des carbones (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) du composé **3**

Position	δH , mult, J in Hz	δC (ppm)	HMBC
1/1'	-	168,4	-
2/2'	-	101,1	-
3/3'	-	179,1	-
4/4'	-	87,4	-
5/5'	2,62 (1H, m) 2,67 (1H, m)	25,7	C-3, 4, 5'/C-3', 4', 5
6/6'	-	197,4	-
7/7'	-	54,8	-
8/8'	1,39 (1H, m)	44,7	C-6, 7, 9, 13, 14, 17/ C-6', 7', 9', 13', 14', 17'
9/9'	1,27 (1H, m) 1,65 (1H, m)	24,9	- C-10/ - C-10'
10/10'	1,37 (1H, m) 1,47 (1H, m)	26,0	-
11/11'	1,22 (1H, m) 1,68 (1H, m)	26,9	- C-8/ - C-8'
12/12'	1,55 (1H, m) 2,06 (1H, d, $J = 10,5$ Hz)	40,1	- C-8, 11, 13/ - C-8', 11', 13'
13/13'	-	69,4	-
14/14'	3,93 (1H, s)	78,9	C-12, 15, 16, 18/ C-12', 15', 16', 18'
15/15'	5,01 (1H, d, $J = 2,7$ Hz)	96,1	C-3, 7, 13, 14, 18/ C-3', 7', 13', 14', 18'
16/16'	2,78 (1H, qd, $J = 7,4, 2,7$ Hz)	33,8	C-6, 7, 17, 18/ C-6', 7', 17', 18'
17/17'	1,21 (3H, s)	17,8	C-6, 7, 8, 16/ C-6', 7', 8', 16'
18/18'	0,98 (3H, d, $J = 7,4$ Hz)	13,6	C-7, 15, 16/ C-7', 15', 16'

Ce composé a été obtenu sous forme de cristaux par évaporation du solvant (eau et acétonitrile). Ces cristaux ont été ensuite analysés par une expérience de diffraction des rayons X. Cette expérience a confirmé la structure et la configuration relative de ce composé : 4S*, 7R*, 8S*, 13S*, 14R*, 15S*, 16S*, 4'S*, 7'R*, 8'S*, 13'S*, 14'R*, 15'S*, 16S* (**Figure 65**).

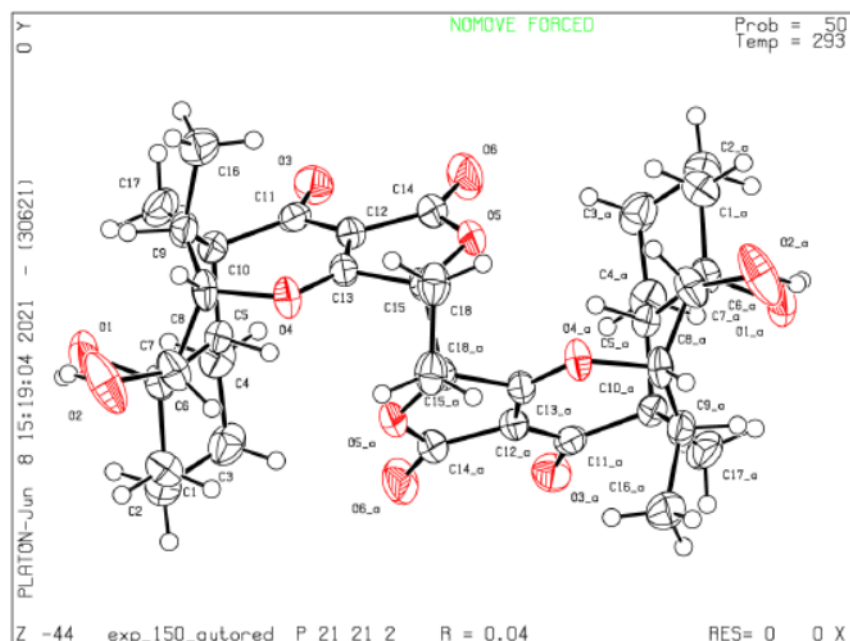


Figure 65. Représentation ORTEP de la spirobistétrôdêcamycine B par diffraction des rayons X

La configuration absolue du composé a été résolue en comparant les spectres de dichroïsme circulaire expérimentaux et simulés par calcul DFT (**Figure 66**).

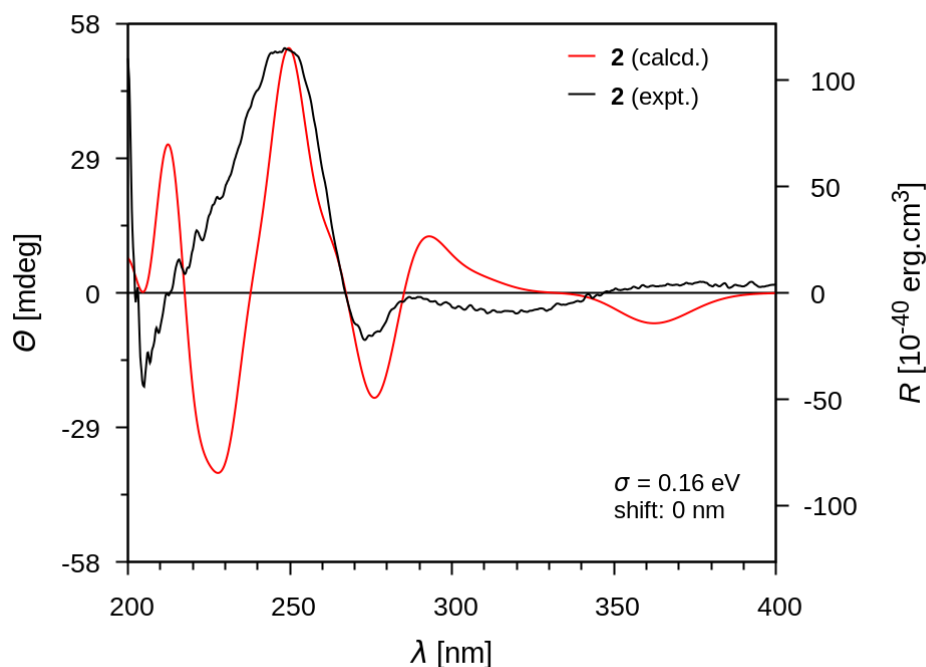


Figure 66. Spectre ECD de spirobistétrôdêcamycine B

4.3.2 L'expérience de photocycloaddition [2+2] de la tétrôdêcamycine

Afin de vérifier notre hypothèse sur la photocycloaddition [2+2] des spirobistétrodécamycines A et B, nous avons réalisé une expérience d'irradiation de la tétrodécamycine à l'aide d'une lampe UV artificielle.

Pour réaliser cette expérience, le monomère tétrodécamycine a été irradié à l'état solide et liquide.

Pour la forme liquide, la tétrodécamycine a été solubilisée dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) et puis préparée sous deux conditions différentes : avec catalyseur (triflate de cuivre (I)) et sans.

Pour la forme solide, la tétrodécamycine a tout d'abord été solubilisée dans le dichlorométhane puis laissée évaporer afin d'obtenir la forme solide du produit.

Ces trois échantillons ont été ensuite irradiés par une lampe UV artificielle pendant 15 heures (**Figure 67**).

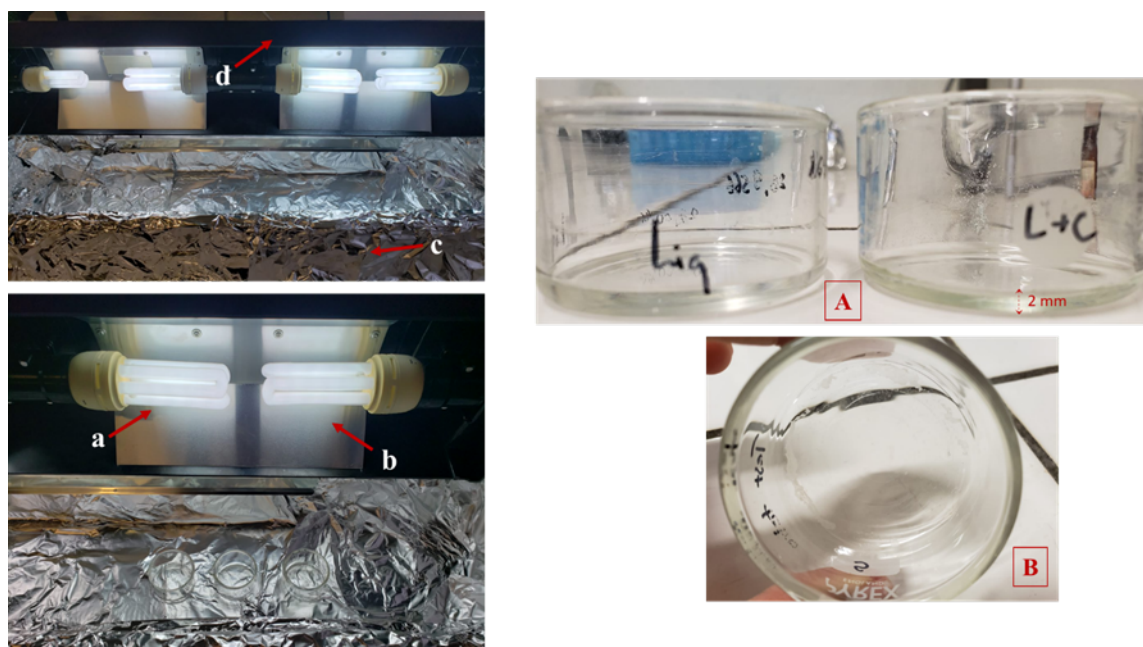


Figure 67. Photos de l'expérience photocatalyse et de la lampe UV
a- Ampoule ReptiSun 10.0 ZOOMED® UV-B (10%) 26W **b-** réflecteur aluminium
c- compartiment protégé par des feuilles d'aluminium
d- Support de la lampe Exo Terra® Compact Top
[A] une fine couche de 2 mm de la solution de tétrodécamycine avec et sans catalyseur **[B]** le monomère à l'état solide

Après avoir été irradiés pendant 15 heures, ces échantillons (deux liquides avec et sans catalyseur et une solide) ont été repris à nouveau dans le méthanol puis analysés par CLUP-SM/SM.

Nous avons observé l'apparition des deux dimères en différentes proportions dans ces trois conditions. De plus, dans la condition solide, un troisième isomère a pu

être détecté (**Figure 67D-E-F**), probablement l'un des diastéréoisomères indiqués dans la **Figure 68**.

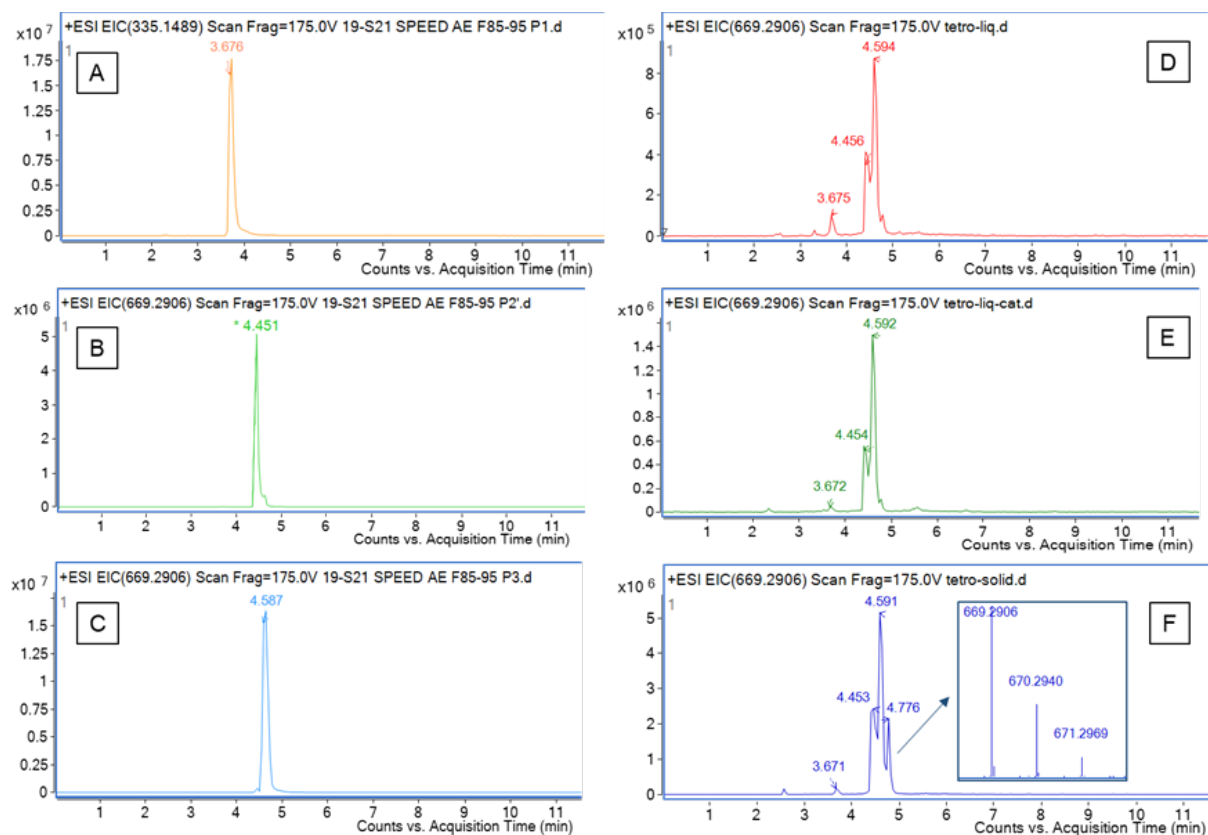


Figure 68. EIC de la tétrodécamycine (m/z 335,1489) et des spirobistétrodécamycines A et B (m/z 669,2906) : **[A]** **[B]** et **[C]** la tétrodécamycine et les deux dimères comme contrôles ; **[D]** résultat de l'expérience d'irradiation de la tétrodécamycine à l'état liquide par la lumière UV; **[E]** irradiation de la tétrodécamycine par la lampe UV en présence un catalyseur ; **[F]** irradiation à la lumière UV de la tétrodécamycine à l'état solide avec formation du troisième produit (encadré rouge), qui est probablement une autre forme isomère des spirobistétrodécamycines A et B

Cette expérience nous a permis de vérifier la formation spontanée des spirobistétrodécamycines A et B par la lumière à partir de la tétrodécamycine. La spirobistétrodécamycine A a été formée par le mécanisme photocycloaddition « [2+2] tête-à-queue (*head-to-tail*) » alors que la spirobistétrodécamycine B a été formée par le mécanisme « [2+2] tête-à-tête (*head-to-head*) »¹²⁸ (**Figure 60**).

¹²⁸ Poplata, et al., *Chemical Reviews*, **2016**, *116*, 9748-815.

4.4 Isolement des antimycines

Annotation du cluster des antimycines

- **Cluster des antimycines annoté par le GNPS**

Un *cluster* des antimycines a été détecté dans le réseau moléculaire (**Figure 69**). Les molécules annotées appartiennent à la famille des antimycines possédant un cycle à neuf chaînons. Il existe 29 molécules d'antimycines décrites jusqu'à présent¹²⁹.

L'identification de ces molécules ne pouvait pas reposer uniquement sur la recherche des formules brutes dans les bases de données car il existe un grand nombre d'isomère dans cette famille de produits naturels. Par exemple, les molécules antimycines A1a/A1b, A12, A13 et A19 ont la même formule brute ($C_{28}H_{40}N_2O_9$). La recherche des molécules non-annotées du réseau moléculaire dans les bases de données DNP® et la littérature indiquant que les molécules à $m/z = 479,2025$ et $479,2026$ correspondent à l'antimycine A6a/A6b et l'antimycine A18. L'antimycine A5a/A5b pour les molécules à $m/z = 493,2181$ et $493,2182$ et les ions à $m/z = 563,2964$, $563,2965$ et $563,2966$ correspondent à l'antimycine A10a/A10b, A14 et A15.

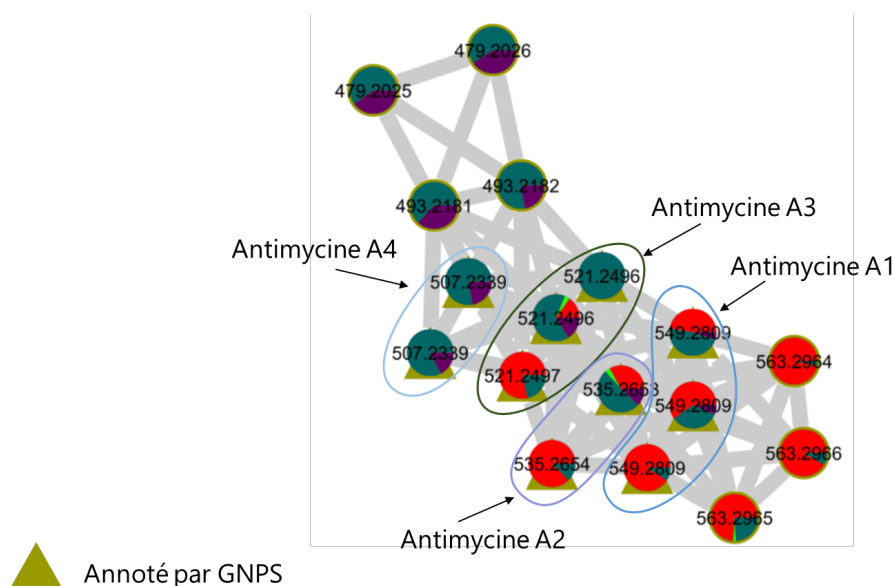


Figure 69 : Cluster des antimycines annoté par GNPS

- **Cluster des antimycines annoté par l'isolement et l'identification structurale.**

Les molécules d'antimycines ont été isolées et élucidées structurellement par les analyses de RMN. Leur *cluster* a été de nouveau annoté (**Figure 70**).

¹²⁹ Liu, *et al.*, *Natural Product Reports*, **2016**, 33, 1146-65.

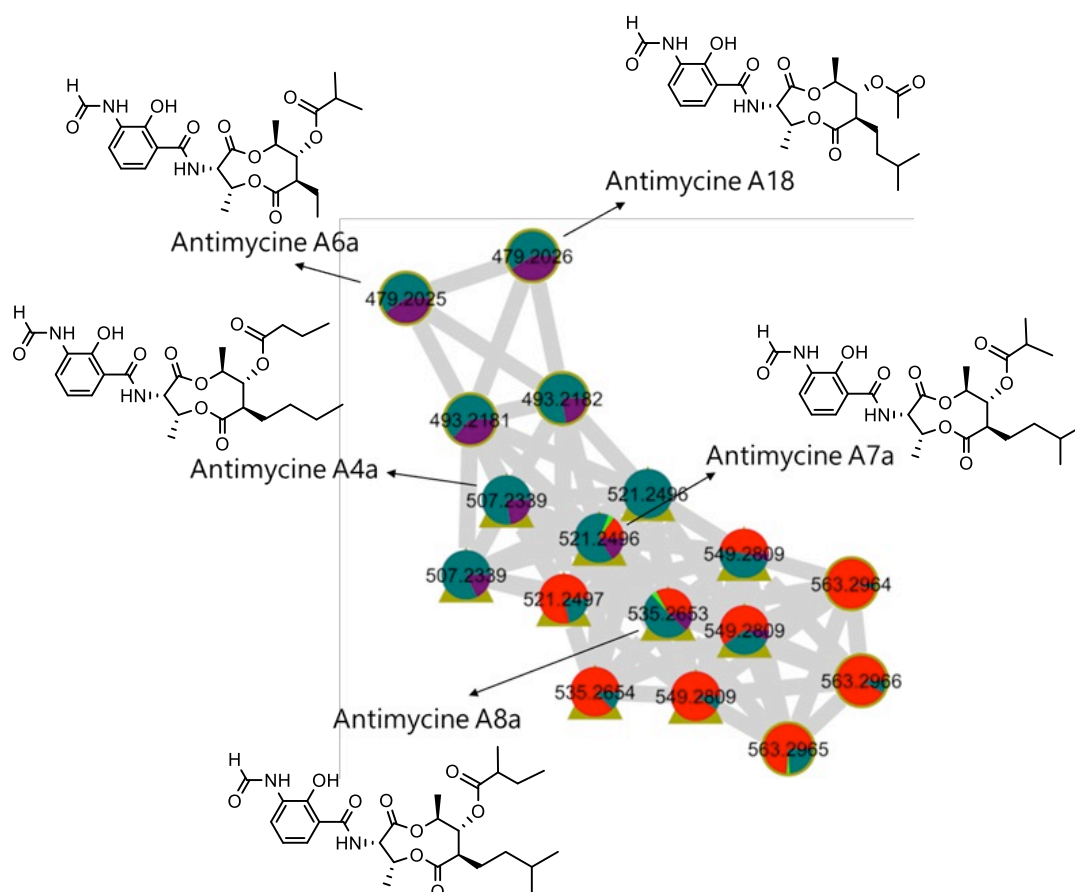


Figure 70 : Annotation du *cluster* d'antimycines par l'isolement et identification structurale.

L'antimycine A18 ($m/z = 479,2026 [M+H]^+$) est la première molécule de la famille des antimycines possédant un groupe « acétoxy » en position C-8. Cette molécule a été découverte à partir de *Streptomyces albidoflavus*, un endophyte isolé des feuilles du palétuvier *Bruguiera gymnorhiza*¹³⁰. La structure de la molécule a été confirmée par comparaison des données du spectre RMN ¹H obtenu expérimentalement avec celles rapportées dans la littérature (**Figure 71**).

¹³⁰ Yan, et al., *J Antibiot (Tokyo)*, **2010**, 63, 259-61.

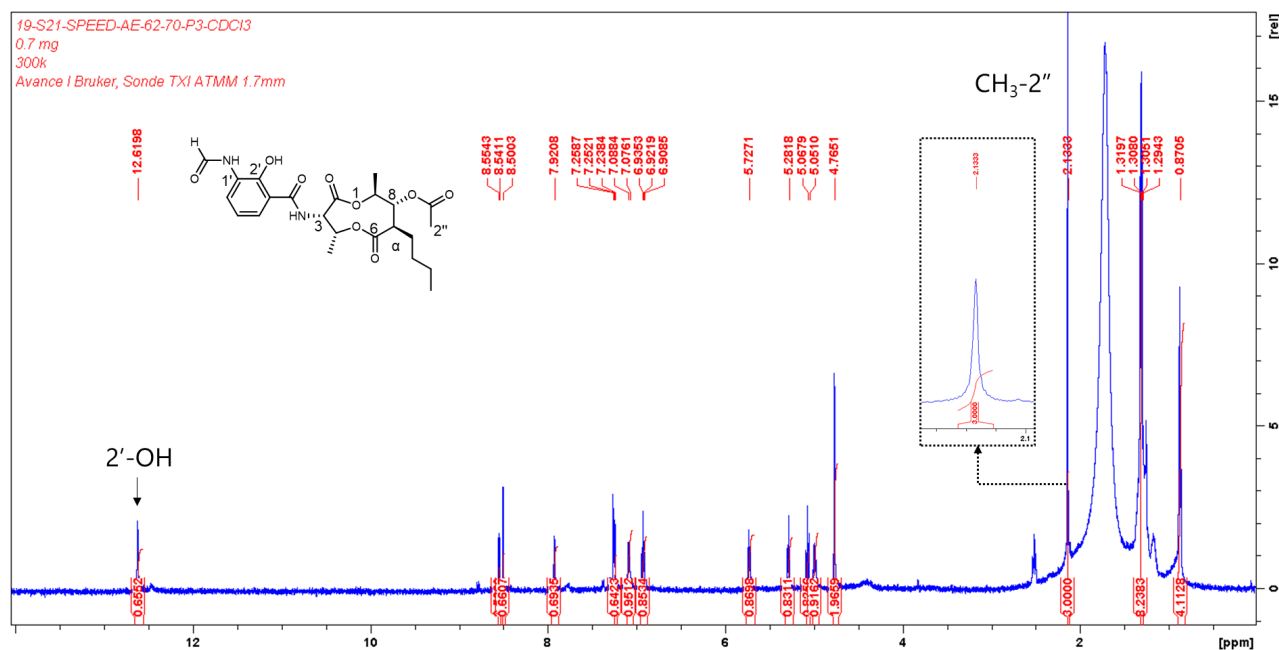


Figure 71 : Spectre RMN ¹H de l'antimycine A18 (600 MHz, CDCl₃)

- Troisième antimycine possédant un groupement acétoxy en C-8

Dans le cluster des antimycines, l'ion à $m/z = 493,2182$ [M+H]⁺ est directement connecté à celui de l'antimycine A18 ($m/z = 479,2026$ [M+H]⁺) avec une différence de masse de 14,0156 Da (**Figure 69**), suggérant la présence d'un méthylène supplémentaire.

Les spectres RMN ¹H de ce composé est similaire à celui de l'antimycine A18. La différence principale se traduit par le changement du signal du méthyle à $\delta_H = 0,86$ ppm. Les signaux des protons de ce méthyle intègrent pour trois protons et se présentent sous la forme d'un triplet dans l'antimycine A18, suggérant qu'ils sont à proximité d'un méthylène. Dans la molécule à $m/z = 493,2182$, nous avons observé deux méthyles attachés directement à un méthine *via* les signaux RMN à $\delta_H = 0,85$ ppm (doublet) et $\delta_H = 0,86$ ppm (doublet) (**Figure 72**). Ce composé représente le troisième composé de la famille des antimycines possédant un groupement acétoxy en position C-8 après les antimycines A18 et A20¹³¹. Cependant, à cause d'une faible quantité de produit isolé, nous n'avons pas pu acquérir les résultats des analyses RMN ¹³C et 2D.

¹³¹ Xu, et al., *J Antibiot (Tokyo)*, **2011**, 64, 661-665.

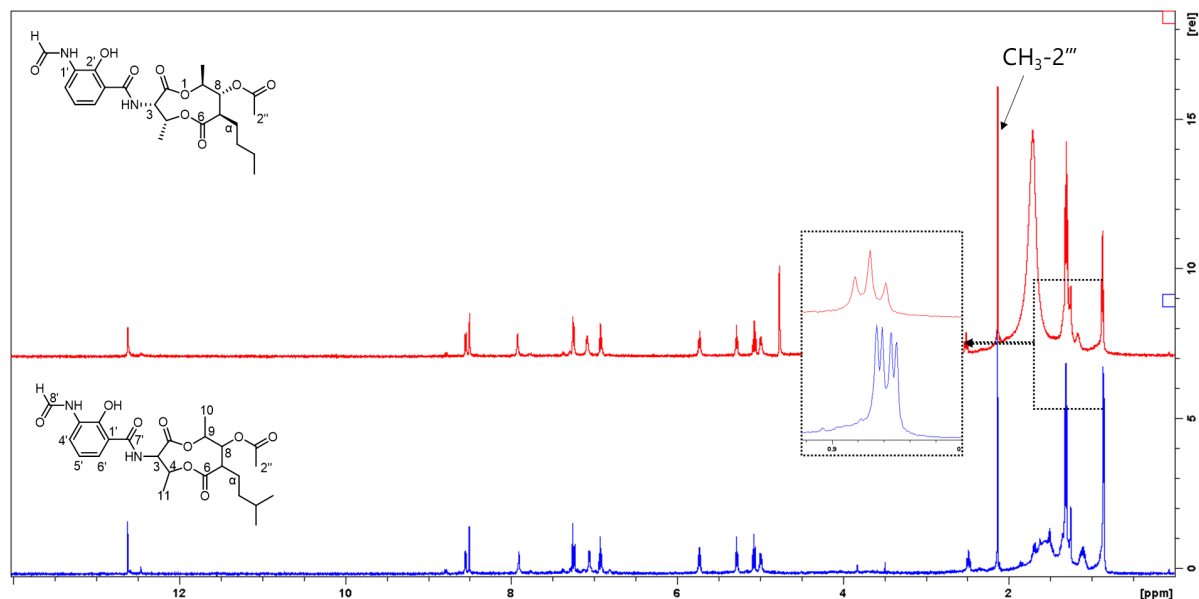


Figure 72 : Superposition des spectres RMN ^1H de l'antimycine A18 (rouge, 600 MHz, CDCl_3) et de la molécule à $m/z = 493,2182$ (bleu, 600 MHz, CDCl_3)

- Première antimycine possédant un groupement hydroxyle sur la chaîne latérale

En isolant les molécules de la famille des antimycines, nous avons obtenu un nouvel analogue d'antimycine (composé **4** (**Figure 73**)). Le spectre HR-ESIMS en mode positif a montré un ion moléculaire à $m/z = 481,2192$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, correspondant à la formule brute $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9$ (**Figure 74**).

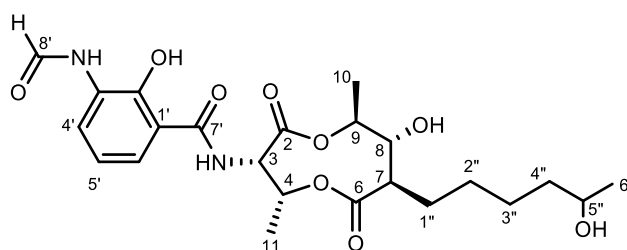


Figure 73 : Structure du composé **4**

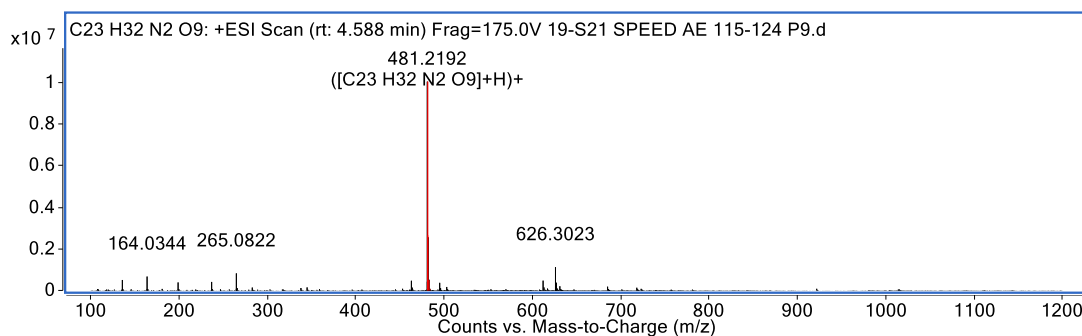


Figure 74. Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **4**

Le spectre RMN du proton de ce composé montre qu'il appartient à la famille des depsipeptides de type antimycine.

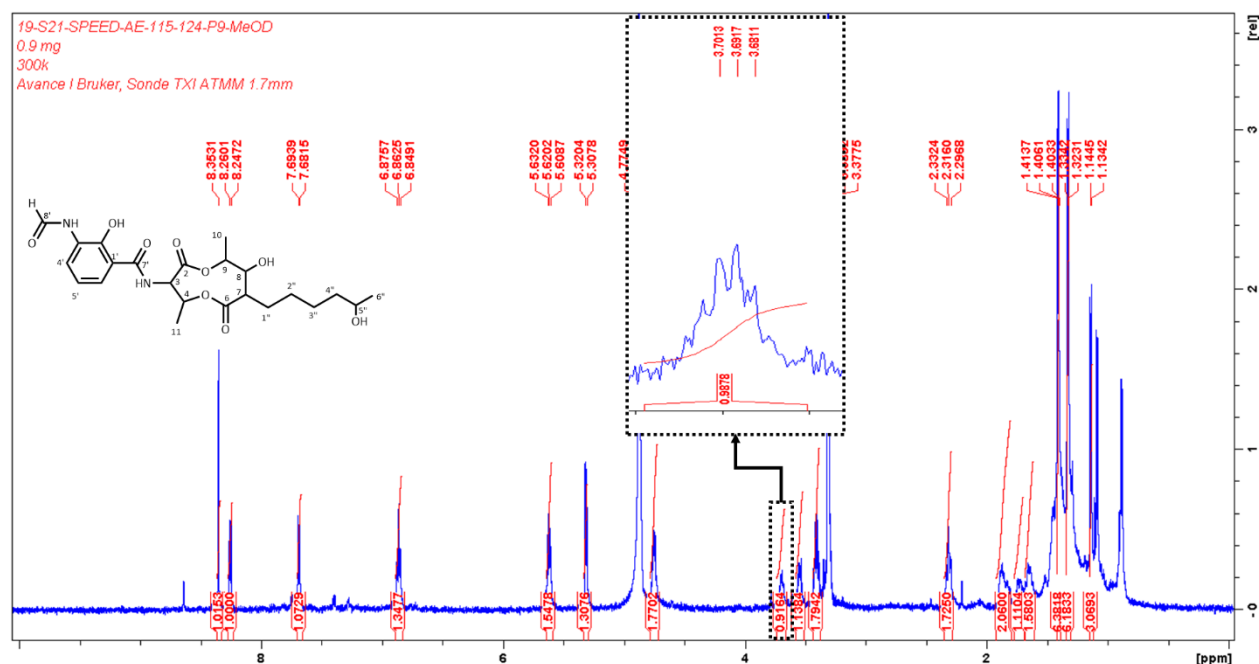


Figure 75 : Spectre RMN ^1H du composé **4** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

La seule différence entre ce composé et les autres antimycines est la présence d'une fonction hydroxyle en C-5'' sur la chaîne aliphatique. Cette différence a été démontrée par le signal RMN du proton ^1H à $\delta_{\text{H}} = 3,70$ ppm qui correspond à un proton oxyméthine (H-5'') (**Figure 75**).

Le proton du méthyle (H-6'') à $\delta_{\text{H}} = 1,14$ ppm se présente sous forme de doublet, nous pouvons en déduire qu'il est à côté d'un groupement CH. De plus, les corrélations HMBC de ce méthyle CH_3 (H-6'') à C4'' et C-5'' nous ont permis de confirmer qu'il est à côté du C-5'' porteur de l'hydroxyle (**Figure 76**).

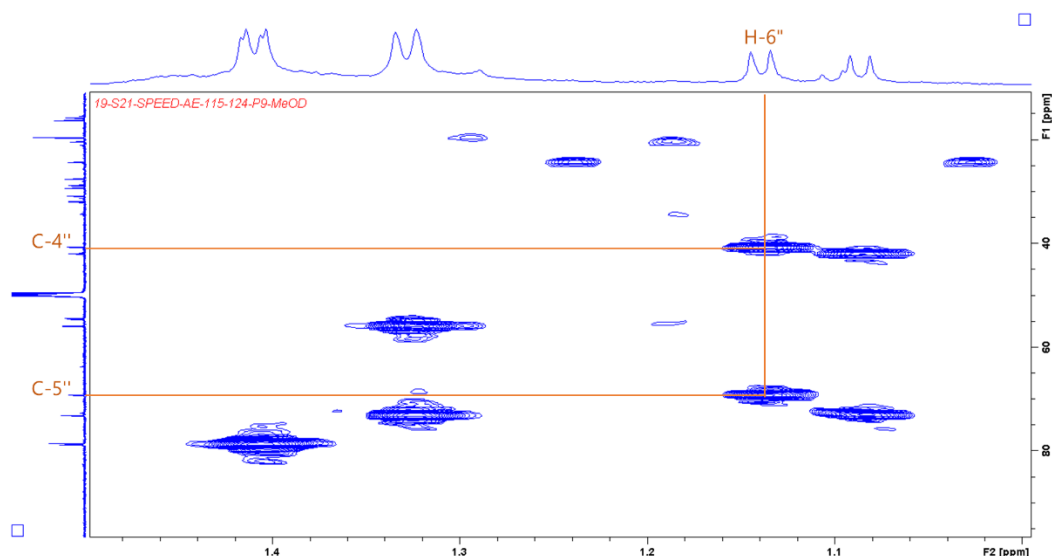


Figure 76 : Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC pour le composé **4** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

La configuration absolue du composé **4** n'a pas été déterminée. Jusqu'à présent, il n'existe qu'un seul type de configuration décrite pour toutes les antimycines connues¹³². Sa configuration relative a été déduite par l'étude des corrélations ROESY. Les corrélations entre H-3 ($\delta_{\text{H}} = 5,31$ ppm) et H-4 ($\delta_{\text{H}} = 5,62$ ppm) et H-7 ($\delta_{\text{H}} = 2,30$ ppm) et H-9 ($\delta_{\text{H}} = 4,75$ ppm) confirme la configuration décrite dans la littérature. Cependant, la configuration absolue du carbone C-5'' ($\delta_{\text{C}} = 69,3$ ppm) reste à définir. Le pouvoir rotatoire du composé **4** a été mesuré, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +5$ (c 0,1, MeOH), confirmant qu'il n'est pas racémique.

¹³² Wang, *et al.*, *Natural Product Research*, **2017**, 31, 1819-1824.

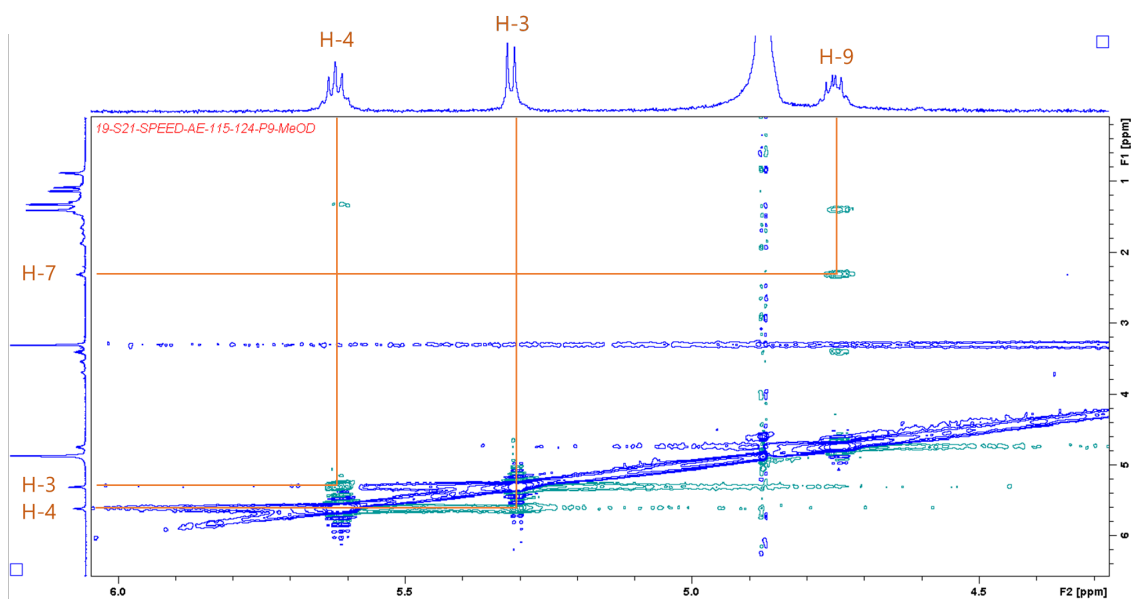


Figure 77 : Détails des corrélations ROESY pour le composé **4** (600 MHz, CH₃OH-d₄).

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN du proton ¹H, du carbone ¹³C, de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 3** suivant :

Tableau 3 Déplacements chimiques des protons (600 MHz, CH₃OH-d₄) et des carbones du composé **4** (150 MHz, CH₃OH-d₄)

Position	δ_H , mult, J in Hz	δ_C (ppm)	HMBC
2	-	172,1	-
3	5,31 (1H, d, $J = 7,5$ Hz)	55,9	2, 4, 11
4	5,62 (1H, qu, $J = 6,9$ Hz)	73,2	2, 6, 11
6	-	177,3	-
7	2,30 (1H, t, $J = 9,9$ Hz)	54,6	-
8	3,40 (1H, q, $J = 8,9$ Hz)	78,8	7, 9
9	4,75 (1H, m)	78,6	8
10	1,41 (3H, d, $J = 6,3$ Hz)	19,6	8, 9
11	1,33 (3H, d, $J = 6,6$ Hz)	16,3	3, 4
1'	-	117,2	-
2'	-	154,5	-
3'	-	129,5	-
4'	8,25 (1H, d, $J = 7,7$ Hz)	127,1	2', 5'
5'	6,86 (1H, t, $J = 7,9$ Hz)	125,3	1', 3'
6'	7,68 (1H, d, $J = 7,4$ Hz)	119,7	2', 4', 7'
7'	-	172,0	-
8'	8,35 (1H, s)	162,9	3'

1''	1,73 (1H, m) 1,83 (1H, m)	28,9	-
2''	1,65 (1H, m) 1,88 (1H, m)	30,9	-
3''	1,31 (2H, m)	29,4	-
4''	1,45 (2H, m)	40,7	-
5''	3,70 (1H, m)	69,3	-
6''	1,14 (3H, d, $J = 6,2$ Hz)	24,4	5'', 4''

Les analyses des spectres RMN du composé **4** confirment qu'il appartient à la famille d'antimycine possédant un squelette d'un cycle dilactone à neuf carbones relié à un acide 3-formamidosalicyclique par une liaison amide¹³³.

- Exploration ciblée de l'espace chimique de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 en utilisant une sonde chimique

5.1 Condition optimale pour incuber la sonde avec la souche dans son milieu de culture

Afin de cibler les molécules de type polyacétates, la sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide a été choisie (**Figure 78**).

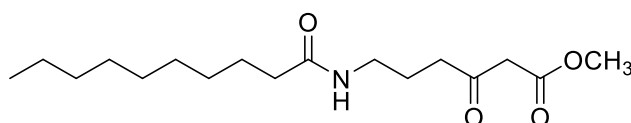


Figure 78 : la sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide

Cette sonde n'est pas soluble dans l'eau qui est le principal constituant du milieu de culture. Par conséquent, elle a été solubilisée dans différents solvants afin de déterminer le meilleur solvant adapté à son incubation avec la souche (**Figure 79**).

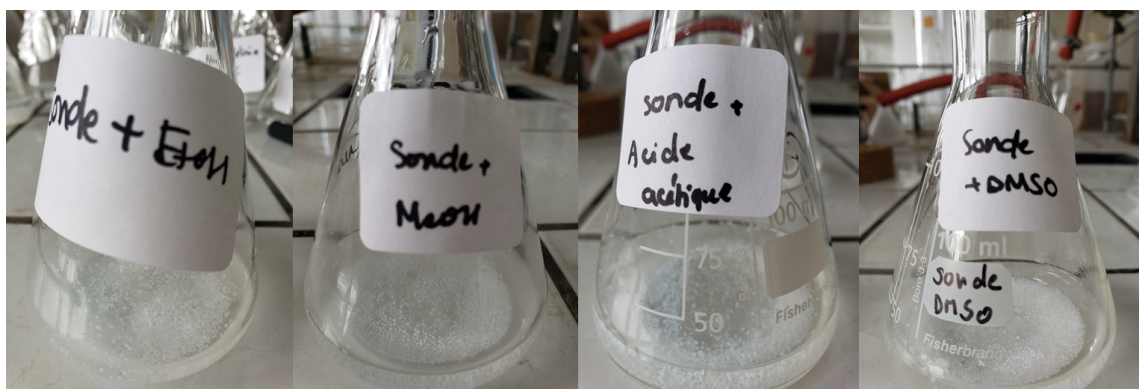


Figure 79 : La sonde solubilisée dans divers solvants a été ajoutée dans les

¹³³ Liu, et al., *Natural Product Reports*, 2016, 33, 1146-65.

Erlenmeyers de 100 mL contenant 20 mL d'eau et 1 g de la résine

Ces expériences ont montré que le méthanol et l'éthanol sont les solvants les plus adaptés à l'étude d'incubation de sonde avec la souche car ils permettent de bien solubiliser la sonde et de ne pas endommager la résine XAD-16 Amberlite®. De plus, ils ne sont pas toxiques à la souche à une faible concentration.

5.2 Incubation de la sonde avec la souche

Plusieurs conditions d'incubation de la sonde en présence de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 ont été réalisées. Après 13 jours de culture, le filtrat de chaque condition a été extrait par acétate d'éthyle et ces extraits ont ensuite été analysés en CLHP-UV-DEDL (voir [Protocole d'incubation de la sonde N-\(4,6-dioxoheptyl\) décanamide avec la souche](#)). Un réseau moléculaire des extraits de différentes conditions d'incubation a été réalisé.

Nous avons observé l'apparition d'un produit dans l'extrait d'acétate d'éthyle de la condition L-J0-AJ¹³⁴ (**Figure 80A**). L'analyse du réseau moléculaire des différentes conditions d'incubation de la sonde a permis de retrouver cette molécule dans un cluster sans aucune annotation. De plus, cet ion est « monocouleur », donc cela signifie qu'il a été produit uniquement dans cette condition d'incubation (**Figure 80B**).

¹³⁴ Condition de culture liquide sans résine, la souche a étéensemencée le même jour que l'incubation avec la sonde et celle-ci a été ajoutée tous les trois jours jusqu'à la fin de la culture.

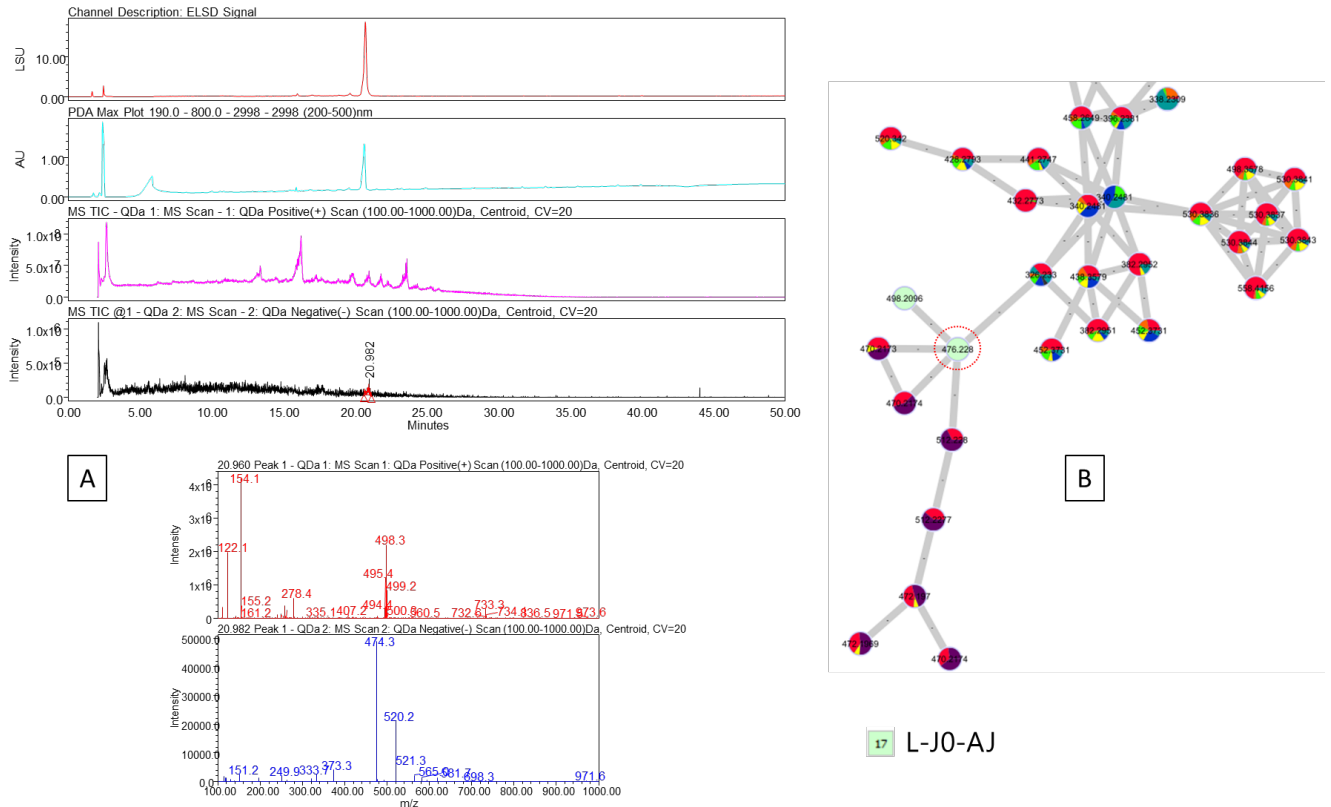


Figure 80 : [A] Résultat d'analyse en CLHP-UV-DEDL de la condition L-J0-AJ montre l'apparition d'une nouvelle molécule à Tr = 20,9 min ; [B] Cette molécule à $m/z = 476,228$ (entourée en rouge) a été retrouvée dans un cluster non annoté du réseau moléculaire des différentes conditions d'incubation de la sonde.

Cette condition de culture est la plus adaptée pour l'incubation de la sonde introduite directement dans la culture de la souche. Un composé a été détecté lors de cette condition d'incubation. Une grande culture à grande échelle de cette condition a été envisagée afin d'isoler le composé d'intérêt. Cependant, cela nécessite une grande quantité de la sonde (200 mg pour 1 L de culture). La synthèse de la sonde en plus grande quantité est en attente.

- Étude du génome de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21

Le séquençage génomique de la souche 19-S21 nous a permis d'utiliser l'outil antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>). Ainsi, 24 clusters de gènes de biosynthèses relatifs à des métabolites spécialisés ont été relevés. Trois des 24 clusters n'ont pas d'annotation (**Figure 81**) (paramètre de niveau de détection : relaxée).

Region	Type	From	To	Most similar known cluster	Similarity
Region 1	NRPS	136,189	176,890	streptobactin	76%
Region 2	terpene, NRPS-like, NRPS	279,278	355,096	valinomycin / montanastatin	13%
Region 3	NRPS, T1PKS	509,133	556,661	SGR PTMs	100%
Region 4	terpene	592,862	618,017	hopene	69%
Region 5	RiPP-like	684,317	691,864		
Region 6	RiPP-like	1,107,820	1,117,926		
Region 7	NRPS	1,358,266	1,416,879	desotamide	27%
Region 8	siderophore	1,521,266	1,534,691	ficellomycin	5%
Region 9	terpene	1,784,805	1,805,210	geosmin	100%
Region 10	terpene	2,123,219	2,143,278	julichrome Q3-3 / julichrome Q3-5	25%
Region 11	LAP, thiopeptide	2,633,667	2,666,140		
Region 12	lanthipeptide-class-iii	2,952,652	2,975,237	SAL-2242	100%
Region 13	NRPS	3,746,914	3,792,791	gobichelin A / gobichelin B	27%
Region 14	lassopeptide	3,924,470	3,946,757	kanamycin	1%
Region 15	NRPS	4,042,211	4,146,805	surugamide A / surugamide D	95%
Region 16	siderophore	4,912,771	4,924,591	desferrioxamin B	100%
Region 17	ectoine	5,836,173	5,846,571	ectoine	100%
Region 18	NRPS	6,413,072	6,457,046	oxalomycin B	6%
Region 19	T1PKS	6,472,110	6,565,861	meoabyssomicin / abyssomicin	46%
Region 20	NRPS-like	6,612,399	6,655,628	indigoidine	80%
Region 21	RiPP-like, terpene	6,675,902	6,706,058	isorenieratene	62%
Region 22	T3PKS	6,808,108	6,849,205	herboxidiene	12%
Region 23	T1PKS, NRPS-like	6,854,552	7,008,016	candidicin	95%
Region 24	T1PKS, NRPS, NRPS-like	7,008,489	7,125,368	antimycin	100%

Figure 81 : Résultat d'antiSMASH des clusters de gènes de biosynthèse de la *Streptomyces albidoflavus* 19-S21.

En utilisant antiSMASH, nous avons pu détecter les *clusters* de gènes impliqués dans la biosynthèse des molécules isolés tels que les antimycines avec 100 % de similarité (**Figure 81**).

Nous avons également trouvé les *clusters* des gènes de biosynthèse des molécules observées dans le réseau moléculaire comme la surugamide et le desferrioxamine (**Figure 47** et **Figure 81**). Cela signifie qu'il y a une corrélation entre l'approche métabolomique et l'approche génomique.

Un *cluster* de gènes de biosynthèse de la méoabyssomicine/abyssomicine a été détecté avec 46 % de similarité. Ces deux molécules appartiennent à la classe des composés de type « spirotétrones », y compris la tétrodécamycine¹³⁵, suggérant que ce *cluster* de gènes pourrait être celui responsable de la biosynthèse de la tétrodécamycine. Cependant, cette hypothèse nécessite la confirmation d'un expert en approche génomique.

- Conclusion du chapitre et analyses critiques

Au cours de ces travaux, nous avons employé une stratégie de priorisation fondée sur le réseau moléculaire afin de cibler les micro-organismes potentiellement intéressants. Parmi les souches priorisées de l'échantillon 19, la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 a été l'objet d'un modèle d'étude.

L'indisponibilité de la tétrodécamycine dans les bases de données du GNPS

¹³⁵ Vieweg, et al., *Natural Product Reports*, **2014**, 31, 1554-84.

nous a conduits à l'isoler et à la caractériser structuralement, ce qui représente un point faible de notre stratégie de priorisation car nous avons isolé un produit connu. Cependant, nous avons réussi à obtenir de bons résultats avec cette souche en appliquant une nouvelle technologie de culture SPEED. Grâce à cette technique de culture, nous avons obtenu la tétrodécamycine en très grande quantité et une grande diversité chimique à partir d'une seule condition de culture de cette unique souche.

Nous avons pu également découvrir un nouvel analogue appartenant à la classe des antimycines (composé **4**). Cependant, en raison de la faible quantité du composé isolé, nous n'avons pas réussi à déterminer sa configuration absolue.

Au cours de la procédure de purification des produits, nous avons obtenu deux nouveaux composés, les spirobistétrodécamycines A et B. Ce sont les premiers dimères de la tétrodécamycine décrits contenant le motif vinylcyclobutane. Afin de vérifier l'origine naturelle de ces deux dimères, nous avons réalisé une expérience photocycloaddition [2+2]. Cependant, comme la souche a été isolée à partir d'un échantillon des matras de Kopara peu profond où l'intensité du rayonnement solaire est suffisamment élevée pour engendrer une réaction de photocycloaddition [2+2]. Par conséquent, la « biosynthèse » des spirobistétrodécamycines A et B de la souche dans son habitat naturel ne peut pas être totalement exclue.

Nous souhaiterions évaluer l'activité biologique des molécules isolées sur différentes cibles afin de leur trouver une application potentielle. Les deux dimères ont été, en premier lieu, testés sur les trois bactéries : *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis* mais ils ne présentent pas d'activité antibiotique.

La technique des réseaux moléculaires présente plusieurs avantages dans la dérégulation et la priorisation. Cependant, il est nécessaire d'étudier au cas par cas les différentes familles de molécules. Par exemple, nous avons observé que les molécules de la famille des antimycines sont souvent des isomères. Par conséquent, nous aurions pu passer à côté de nouveaux potentiels analogues si nous ne les avons pas purifiés.

L'isolement guidé en utilisant de la sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide présente un résultat très encourageant : la présence d'un composé dans une seule condition d'incubation de la sonde. Ce composé est probablement un intermédiaire de biosynthèse d'un polyacétate greffé à la sonde. Une grande échelle de culture de cette condition est nécessaire pour isoler ce produit. Cela nécessite la synthèse de la sonde en plus grande quantité.

III.2 ÉTUDE DES MICRO-ORGANISMES PRIORISÉE DE L'ÉCHANTILLON 20

- Amélioration des critères de priorisation des micro-organismes de l'échantillon 20

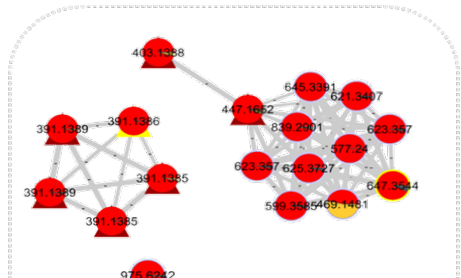
Pour les micro-organismes de l'échantillon 20, nous avons également utilisé la stratégie de priorisation fondée sur les réseaux moléculaires. Cependant, à la suite de l'expérience de priorisation des micro-organismes de l'échantillon 19, nous avons amélioré nos critères de priorisation. Les micro-organismes de l'échantillon 20 ont été choisis en se basant sur les critères de l'activité biologique et l'originalité structurale des produits en combinant deux outils d'annotations *in silico* (ISDB¹³⁶ et NAP¹³⁷).

La **Figure 82** montre le réseau moléculaire global des extraits d'acétate d'éthyle de 21 micro-organismes de l'échantillon 20 cultivés en condition liquide et solide. Quelques exemples de *clusters* intéressants provenant des souches priorisées ont été montrés dans cette figure. À l'aide du réseau moléculaire obtenu, nous avons priorisé quatre souches de l'échantillon 20 dont deux champignons (*Hypocrea lixii* 20-S1 et *Emericellopsis microspora* 20-S19) et deux actinomycètes (*Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13 et *Streptomyces badius* 20-S20)¹³⁸. Les études chimiques de ces deux champignons et de l'actinomycète 20-S13 seront détaillées dans les parties suivantes.

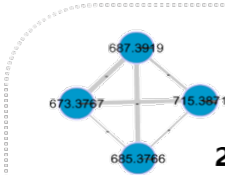
¹³⁶ Allard, *et al.*, *Analytical chemistry*, **2016**, *88*, 3317-23.

¹³⁷ da Silva, *et al.*, *PLoS computational biology*, **2018**, *14*, e1006089.

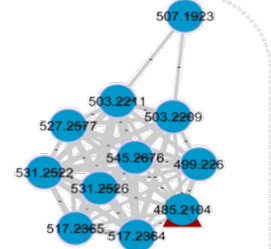
¹³⁸ Nous n'avons pas la taxinomie des souches pendant l'étape de priorisation. Les micro-organismes ont été rassemblés en fonction de leur morphologie. La taxinomie des souches a été obtenue à la fin de ma thèse.



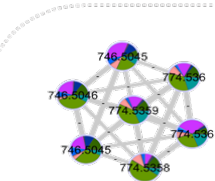
20-S1
E.C (1)
M.L (1.1)
B.S (0.7)



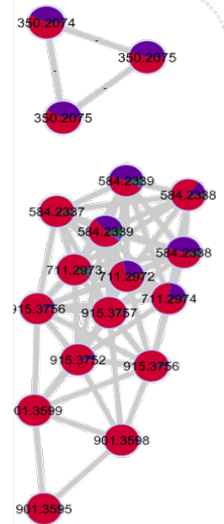
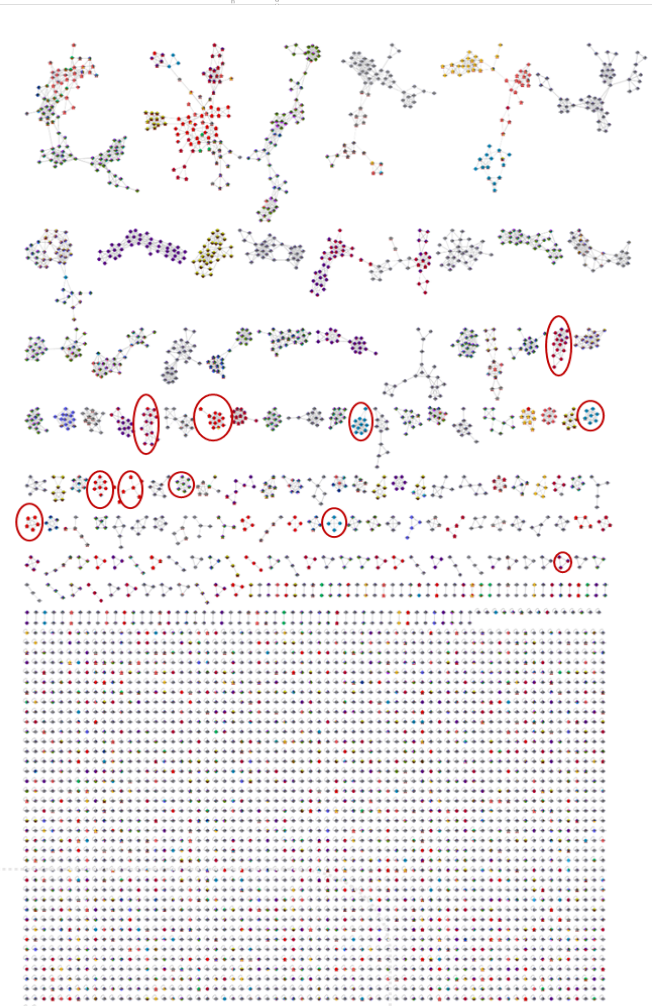
20-S20
E.C (-)
M.L (1.9)
B.S (0.9)



20-S19
E.C (-)
M.L (0.9)
B.S (0.9)



20-S13
E.C (0.9)
M.L (1.6)
B.S (1.7)



1 20-S1
5 20-S13

15 20-S19
23 20-S20

Contrôles : gentamycine (1.7) pour ML, BS
chloramphénicol (1.8) pour EC

Figure 82 : Le réseau moléculaire global des micro-organismes de l'échantillon 20 et quelques clusters intéressants sont représentés. Les extraits des micro-organismes ont été testés sur ces trois bactéries : *Escherichia coli* (EC), *Bacillus subtilis* (BS), *Micrococcus luteus* (MI). Les diamètres d'inhibition des extraits ont été mesurés et comparée à ceux des témoins : gentamycine pour *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* et chloramphénicol pour *Escherichia coli* (les diamètres d'inhibition des extraits sont également décrites dans cette figure).

- Étude approfondie des micro-organismes de l'échantillon 20

Toutes les souches priorisées ont été cultivées à une grande échelle (voir la partie ([Culture à « petite échelle » et « grande échelle »](#))) et à différentes conditions de culture décrites ci-dessous :

- Culture en milieu solide (**SSF** avec ou sans les résines Amberlite® XAD-16)
- Culture en milieu liquide (**LSF** avec les résines Amberlite® XAD-16)
- Condition SPEED
- Condition « résine post-culture »

Un réseau moléculaire pour chaque souche comprenant les extraits acétate d'éthyle de différentes conditions de culture a été construit.

2.1 Étude chimique du champignon *Hypocrea lixii* 20-S1

2.1.1 Déréplication efficace du réseau moléculaire

La souche *Hypocrea lixii* est la forme téléomorphe¹³⁹ de *Trichoderma harzianum* selon Chaverri *et al.*¹⁴⁰ Les cultures des ascospores¹⁴¹ de ces deux souches montrent la même morphologie. En cherchant des molécules décrites chez *Hypocrea lixii* dans le DNP®, aucun résultat n'a été trouvé. 67 molécules ont été décrites dans le DNP® comme étant produites par les champignons du genre *Hypocrea*.

En utilisant la stratégie de déréplication basée sur l'utilisation du réseau moléculaire, nous avons pu annoter rapidement les molécules de la famille des azaphilones de la souche *Hypocrea lixii* 20-S1.

Le réseau moléculaire et les outils d'annotation *in silico* (NAP¹⁴² et ISDB¹⁴³)

¹³⁹ Un stade de reproduction sexuée dans le cycle de vie d'un champignon.

¹⁴⁰ Chaverri and Samuels, *Mycological Progress*, **2002**, 1, 283-286.

¹⁴¹ Les spores issues de la reproduction sexuée chez les Ascomycètes

¹⁴² da Silva, *et al.*, *PLoS Computational Biology*, **2018**, 14, e1006089.

¹⁴³ Allard, *et al.*, *Analytical Chemistry*, **2016**, 88, 3317-23.

nous ont permis d'annoter le composé majoritaire ($m/z = 345,1326$) de l'extrait acétate d'éthyle de la culture solide de cette souche en présence de résine (**SSF**¹⁴⁴). Cependant, ces deux outils d'annotation n'ont pas proposé les mêmes molécules (**Figure 83**). Afin de confirmer l'annotation de ces deux outils, l'isolement du produit a été réalisé.

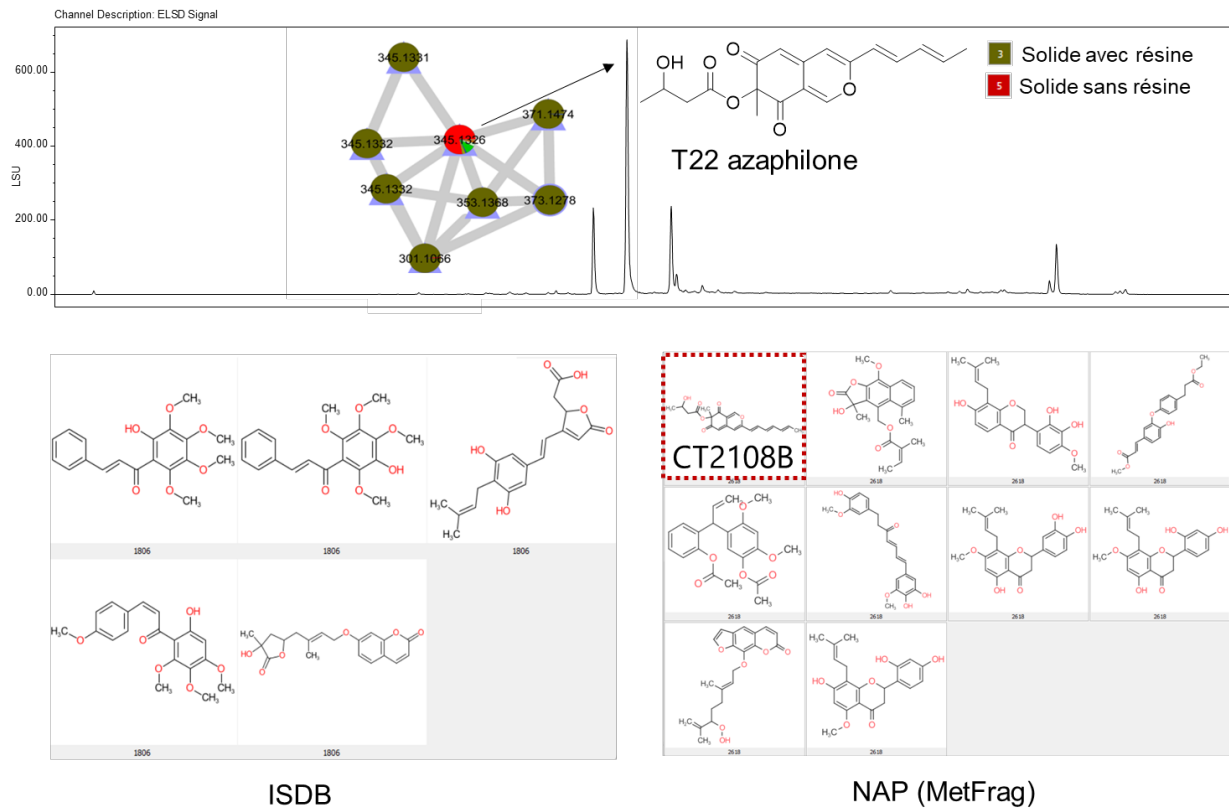


Figure 83 : Chromatogramme DEDL de l'extrait brut de la souche 20-S1 cultivé en milieu gélosé en présence de la résine (en haut) avec la molécule majoritaire $m/z = 345,1326$ et les structures proposées par les outils d'annotation *in silico* NAP (à droite) et ISDB (à gauche) pour cette molécule. Ces deux outils ne proposent pas les mêmes structures.

2.1.2 Identification du composé majoritaire ($m/z = 345,1326$) de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la condition **SSF**

Afin d'isoler et de confirmer l'identité de la molécule à $m/z = 345,1326$, l'extrait à l'acétate d'éthyle de la condition de culture **SSF** a été fractionné en utilisant la chromatographie flash. La purification de cette molécule a été réalisée par CLHP semi-préparative en phase inverse. En utilisant MassHunter®, nous avons généré la formule brute de cette molécule ($C_{19}H_{20}O_6$) à partir de sa masse haute résolution ($[M+H]^+ =$

¹⁴⁴ *Solid State Fermentation*

345,1339) (**Figure 84**).

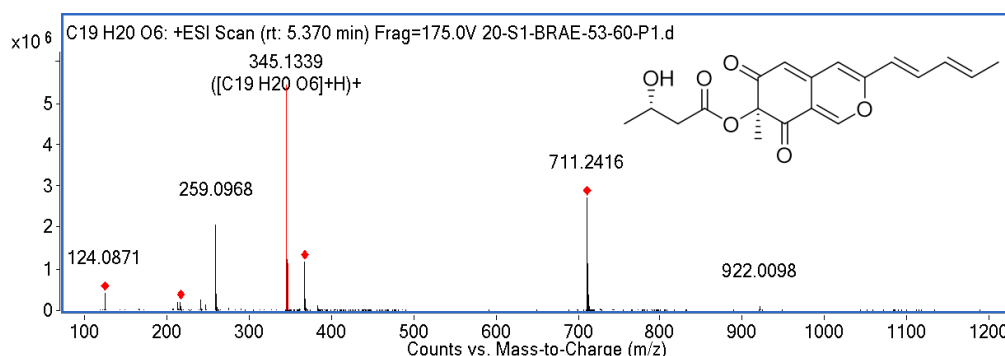


Figure 84. Spectre HR-ESIMS en mode positif de la molécule à $m/z = 345,1339$

Le produit a été identifié comme étant la T22 azaphilone (**Figure 83**) en comparant ses données de RMN ^1H et ^{13}C avec celles dans la littérature. Cette molécule a été isolée à partir de la souche *Trichoderma harzianum* T22¹⁴⁵. Comme discuté précédemment, *Hypocrea lixii* est une forme télémorphe de *Trichoderma harzianum*, donc l'isolement de la T22 azaphilone est cohérent avec la taxinomie de la souche *Hypocrea lixii* 20-S1.

Dans le réseau moléculaire annoté par NAP, le composé CT2108B, une molécule de la famille des azaphilones produite par *Penicillium solitum*, a également été annotée¹⁴⁶, ce qui montre que NAP a réussi à proposer une structure similaire à la molécule $m/z = 345,1326$ en question (**Figure 83**).

2.1.3 Comment optimiser la détection des composés minoritaires en utilisant les réseaux moléculaires ?

En raison du défaut de sélection des précurseurs au moment des fragmentations SM/SM, certaines molécules minoritaires n'ont pas pu être détectées dans le réseau moléculaire des extraits bruts. Un réseau combinant les fractions et les extraits bruts de la condition de culture **SSF** a donc été réalisé (**Figure 85**).

Trois nouveaux composés (**5-7**) ont été isolés à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la culture **SSF** du champignon 20-S1. Parmi ces 3 molécules, une n'a pas été observée dans le réseau (la molécule à $m/z = 263,1278$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) car elle ne représente qu'une très faible quantité de l'extrait. Les trois composés **5-7** ont été isolés et caractérisés.

¹⁴⁵ Vinale, et al., *Letters in Applied Microbiology*, **2006**, 43, 143-8.

¹⁴⁶ Laakso, et al., *J Nat Prod*, **2003**, 66, 1041-6.

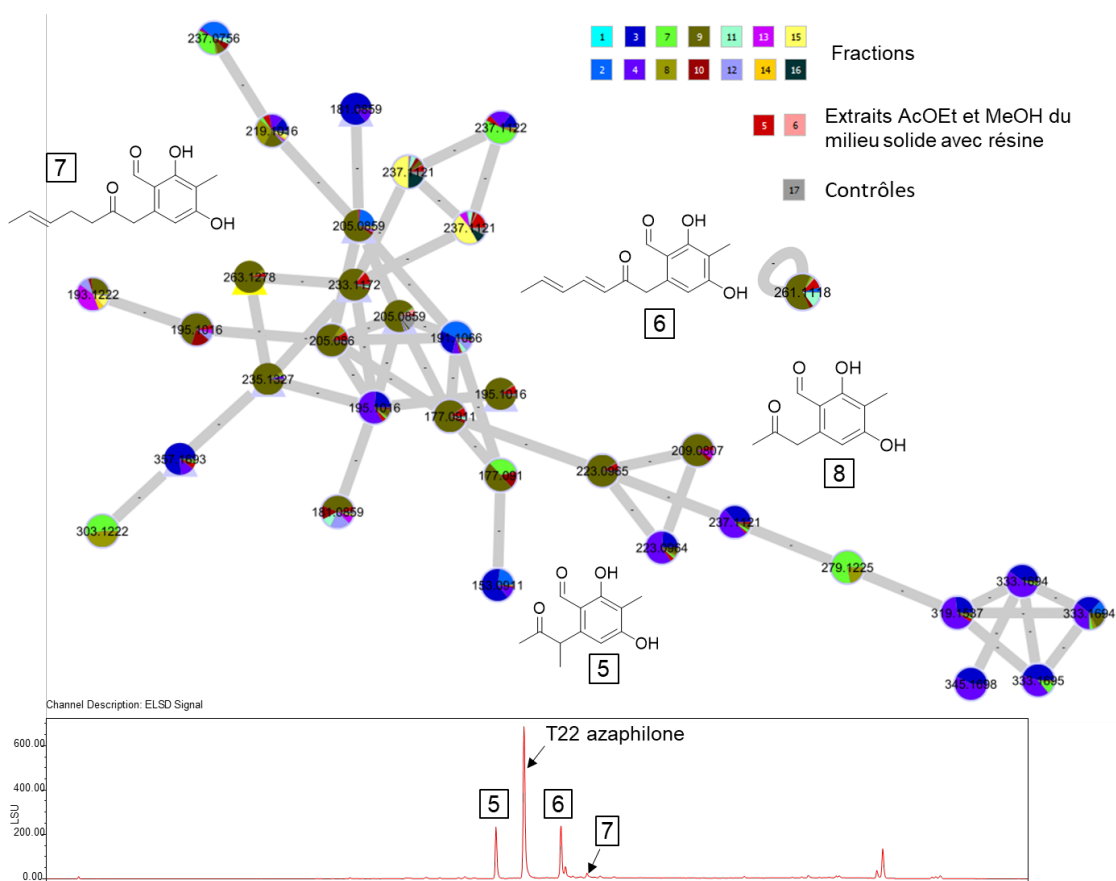


Figure 85 : Le réseau moléculaire des extraits bruts (acétate d'éthyle et méthanol) de la culture gélosée avec les résines et les fractions de flash chromatographie (en haut). En bas, quatre composés ont été mis en évidence dans le chromatogramme LC-DEDL de l'extrait à l'acétate d'éthyle du milieu solide avec résine : le composé majoritaire T22 azaphilone a été décrit précédemment et 3 nouveaux composés sont détectés (5, 6, et 7).

2.1.4 Éluclidation structurale du composé 5

Les analyses de masse haute résolution du composé 5 réalisées par *Electrospray* en mode positif (ESI^+) montrent un ion à $m/z = 223,0968$ [$\text{M}+\text{H}^+$]. La formule brute correspondante est $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (valeur calculée 223,0965) et révèle la présence de six insaturations (**Figure 86**, **Figure 87**).

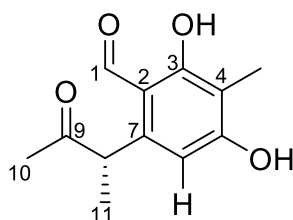


Figure 86 : Structure du composé 5

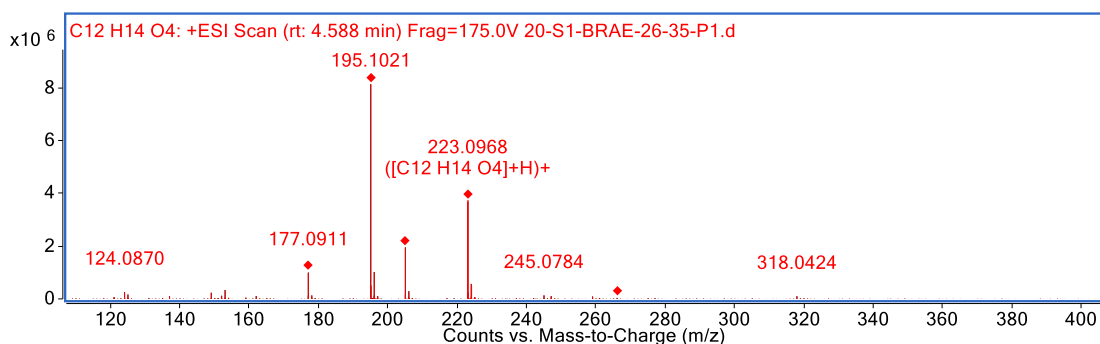


Figure 87 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **5**

La structure de ce composé a été élucidée par l'étude de ses spectres RMN. Nous avons observé dans le spectre RMN ^1H du composé la présence d'un proton déblindé à $\delta_{\text{H}} = 10,14$ ppm et trois méthyles à $\delta_{\text{H}} = 1,37$; $2,01$ et $2,07$ ppm (**Figure 88**). Comme l'analyse RMN a été réalisée dans le $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$, le proton à $\delta_{\text{H}} = 10,14$ ppm a été plus aisément attribué à un groupement aldéhyde plutôt qu'à un proton échangeable de type alcool.

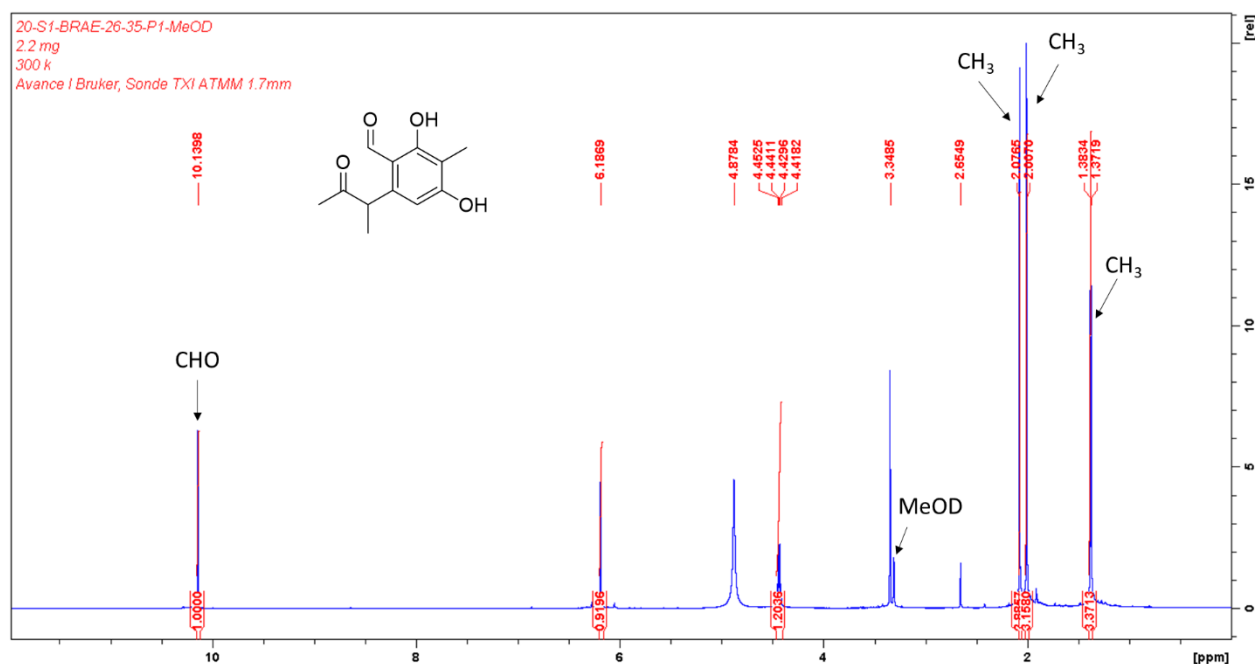


Figure 88 : Spectre RMN ^1H du composé **5** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Nous avons observé un méthine déblindé à $\delta_{\text{H}} = 4,43$ ppm (H-8) présent sous forme quadruplet, suggérant qu'il est à côté d'un méthyle et d'un groupement électroattracteur. Les corrélations $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC entre ce proton ($\delta_{\text{H}} = 4,43$ ppm) et les carbones du méthyle à $\delta_{\text{C}} = 18,5$ ppm (C-11) et de la cétone $\delta_{\text{C}} = 210,1$ ppm (C-9) confirment la position du proton H-8 (**Figure 89**).

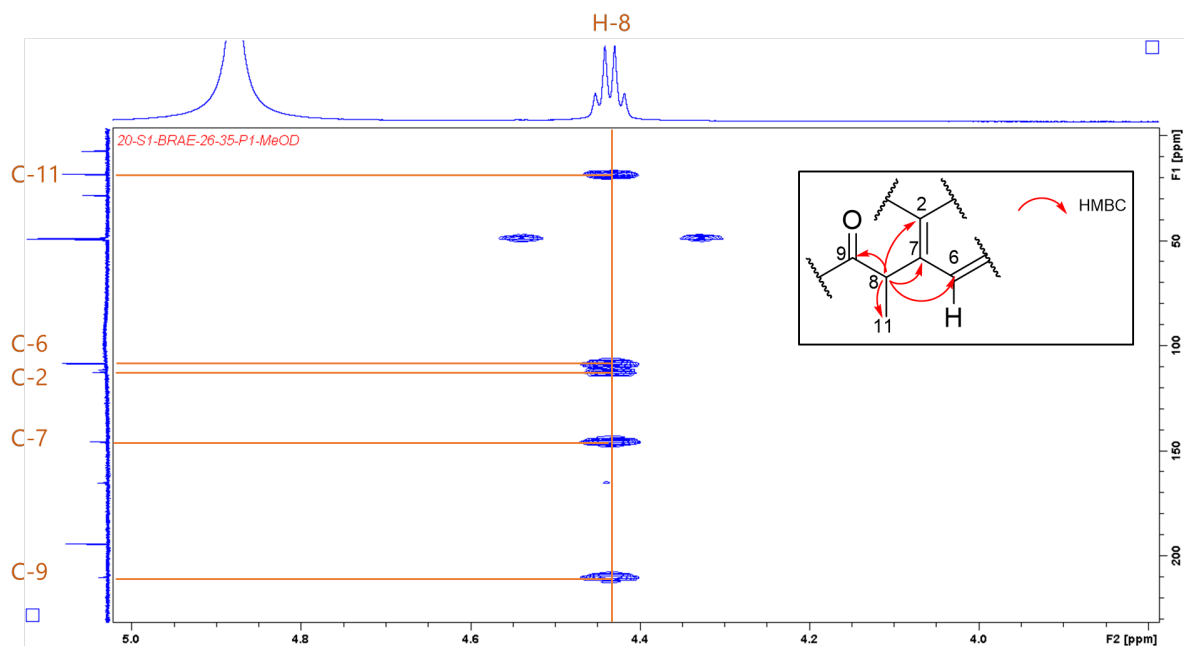


Figure 89 : Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC du proton H-8 pour le composé **5** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Une corrélation ^1H - ^{13}C HMBC entre le proton du méthyle ($\delta_{\text{H}} = 2,07$ ppm, singulet) et le carbone de la cétone ($\delta_{\text{C}} = 210,1$ ppm) nous a permis de relier la sous-structure du composé **5** (**Figure 90**).

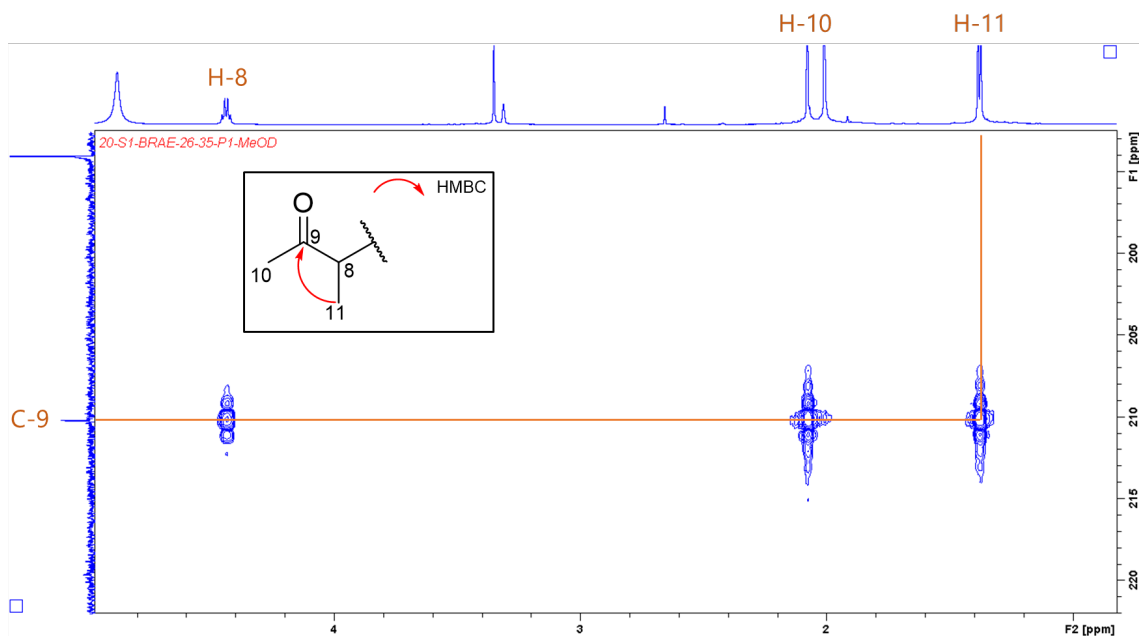


Figure 90 : Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC du carbone C-9 pour le composé **5** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

En ^1H - ^{13}C HMBC du composé **5**, le proton aldéhydique ($\delta_{\text{H}} = 10,15$ ppm) corrèle avec les carbones C-2 quaternaire ($\delta_{\text{C}} = 112,6$ ppm), C-3 porteur de l'hydroxyle ($\delta_{\text{C}} = 165,1$ ppm), C-7 quaternaire ($\delta_{\text{C}} = 145,6$ ppm) et C-4 porteur du méthyle ($\delta_{\text{C}} = 111,4$ ppm). Ces corrélations nous ont permis de rattacher le carbone d'aldéhyde C-1 au C-2 quaternaire de la molécule (**Figure 91**).

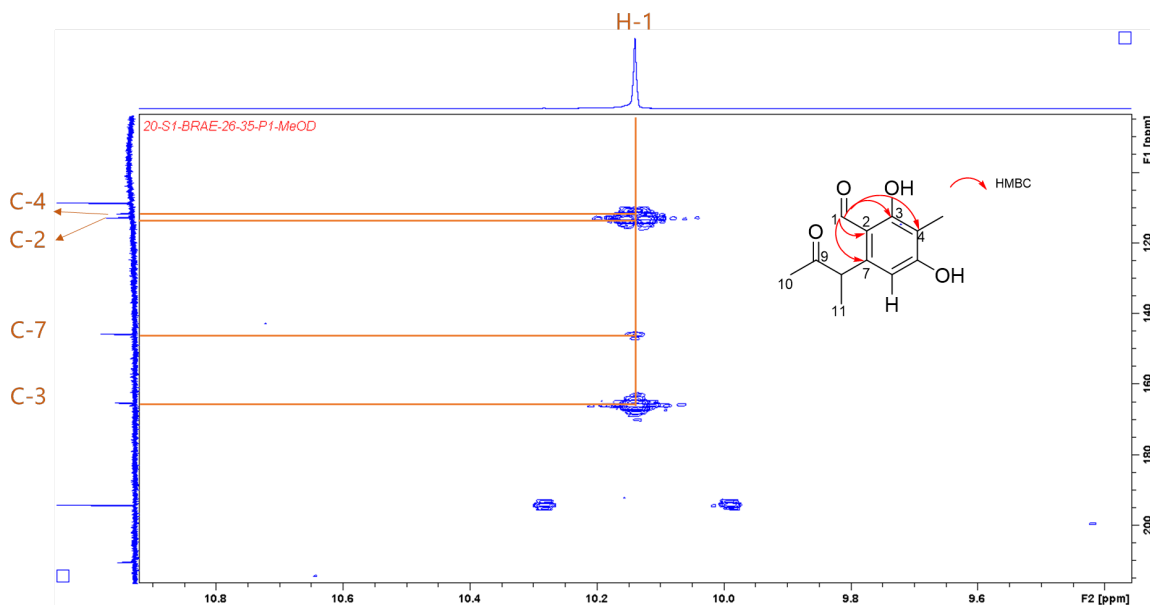


Figure 91 : Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC du proton aldéhydique H-1 pour le composé **5** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Le proton à $\delta_{\text{H}} = 6,18$ ppm, sous forme singulet montre la présence d'un proton aromatique qui n'a pas de protons voisins. Ce proton est corrélé au carbone C-5 porteur de l'hydroxyle ($\delta_{\text{C}} = 165,1$ ppm), C-7 quaternaire ($\delta_{\text{C}} = 145,6$ ppm) en HMBC. Par conséquent, nous l'avons attribué la position 6 (**Figure 92**).

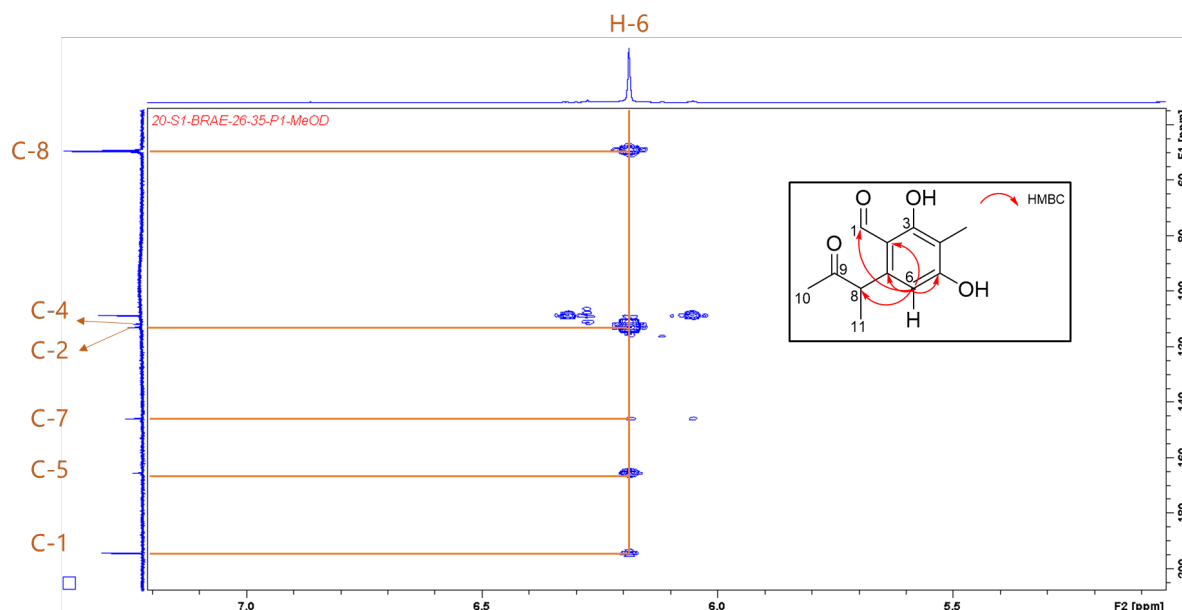


Figure 92 : Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC du proton H-6 pour le composé **5** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN du proton ^1H , du carbone ^{13}C , de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 4** suivant :

Tableau 4 : Déplacements chimiques des protons (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) et des carbones (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) du composé **5**

Position	δ_{H} , mult, J in Hz	δ_{C} (ppm)	HMBC
1	10,15 (1H, s)	194,1	C-2, 3, 7
2	-	112,6	-
3	-	165,1	-
4	-	111,4	-
5	-	165,1	-
6	6,18 (1H, s)	108,3	C-1, 2, 4, 5, 7, 8
7	-	145,6	-
8	4,43 (1H, q, $J = 7,2$ Hz)	48,6	C-2, 6, 7, 9, 11
9	-	210,1	C-8, 10, 11
10	2,07 (3H, s)	28,5	C-8, 9
11	1,37 (3H, d, $J = 6,9$ Hz)	18,5	C-7, 8, 9
12	2,01 (3H, s)	7,1	C-3, 4, 5

- Stéréochimie du composé **5**

Comme le composé **5** présente un carbone asymétrique (C-3), son pouvoir rotatoire a été mesuré, $[\alpha]_{\text{D}}^{25,0} = +37$ (c 0.1, CH_3OH). Il n'est donc pas sous sa forme racémique. Par conséquent, il est nécessaire de simuler les deux configurations possibles de ce carbone et de comparer les spectres obtenus à ceux de dichroïsme

circulaire expérimental afin de déterminer sa configuration absolue.

Dans la littérature, la configuration de la molécule rédoxcitrinine, analogue du composé **5**, a été déterminée en se basant sur l'origine biosynthétique du produit. Les auteurs supposent que la rédoxcitrinine et la citrinine sont des produits dérivés des intermédiaires biosynthétiques communs ou similaires. Par conséquent, la configuration (S) du carbone C-3 sont conservées pour ces molécules¹⁴⁷. Donc, il est probable que la configuration du composé **5** soit également (S).

- Existe-t-il un lien entre le composé **5** et les précurseurs de la voie de biosynthèse des azaphilones ?

En cherchant la structure du composé **5** dans les bases de données DNP® et SciFinder®, deux structures similaires ont été proposées : (i) le 2,4-dihydroxy-3-méthyl-6-(2-oxopropyl)benzaldéhyde (DHMBA) et (ii) la rédoxcitrinine (**Figure 93**). Ces molécules diffèrent par la présence ou l'absence des méthyles en position 6 et 8.

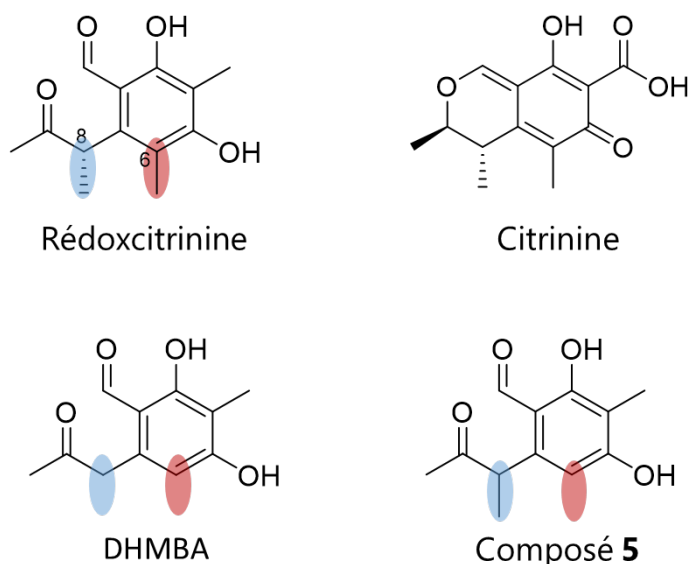


Figure 93 : Structures du composé **5**, de la DHMBA et de la rédoxcitrinine et de la citrinine

La rédoxcitrinine est un précurseur biogénétique de la citrinine¹⁴⁸ (**Figure 93**). La citrinine est une mycotoxine polyacétique produite par des champignons appartenant aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Monascus*. La voie de la citrinine est une des cinq principales voies de biosynthèse des azaphilones¹⁴⁹. Les azaphilones

¹⁴⁷ Zhang, *et al.*, *J Microbiol Biotechnol*, **2007**, 17, 865-7.

¹⁴⁸ Zhang, *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, 17, 865-867.

¹⁴⁹ Pavesi, *et al.*, *Natural Product Reports*, **2021**, 38, 1058-1071.

sont des polyacétates fongiques possédant un noyau bicyclique pyranoquinone fortement oxygéné (**Figure 94**)¹⁵⁰.

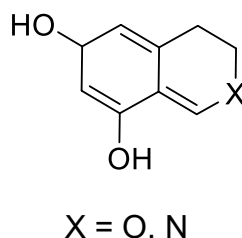


Figure 94 : Squelette générique des azaphilones

Le DHMBA est un polyacétate antibactérien¹⁵¹ isolé récemment d'*Aspergillus nidulans*. Le DHMBA est le produit des NR-PKS par incorporation d'un S-adénosylméthionine et quatre malonyl-coenzyme A. NR-PKS est une des catégories des PKS de type I itératives fongiques (NR = non-réductrice). Les produits de ces enzymes sont souvent des précurseurs des voies de biosynthèse des molécules complexes et fortement bioactives¹⁵². DHMBA a été ensuite libéré par l'enzyme réductase, ce qui explique la présence de la fonction aldéhydique¹⁵³. Jusqu'en 2006, le DHMBA n'était connu qu'en tant qu'intermédiaire de la voie de synthèse chimique des azaphilones¹⁵⁴.

Ce composé (DHMBA) a également été isolé à partir de l'extrait venant de la culture **SSF** de la souche *Hypocrea lixii* 20-S1 (composé **8**). Il était dans le même *cluster* que les composés **5**, **6**, **7** (**Figure 96**).

- **Hypothèse de la biosynthèse du composé 5**

Les informations précédentes suggèrent que le composé **5** pourrait-être un précurseur impliqué dans la voie de biosynthèse des azaphilones (**Figure 95**).

¹⁵⁰ Gao, *et al.*, *Chemical Reviews*, **2013**, 113, 4755-811.

¹⁵¹ Gerke, *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*, **2012**, 78, 8234-44.

¹⁵² Cox and Skellam, 1.09 - *Fungal Non-Reducing Polyketide Synthases*, **2020**, 266-312.

¹⁵³ Ahuja, *et al.*, *J Am Chem Soc*, **2012**, 134, 8212-21.

¹⁵⁴ Suzuki, *et al.*, *J. Heterocycl. Chem.*, **2001**, 38, 1409-1418.

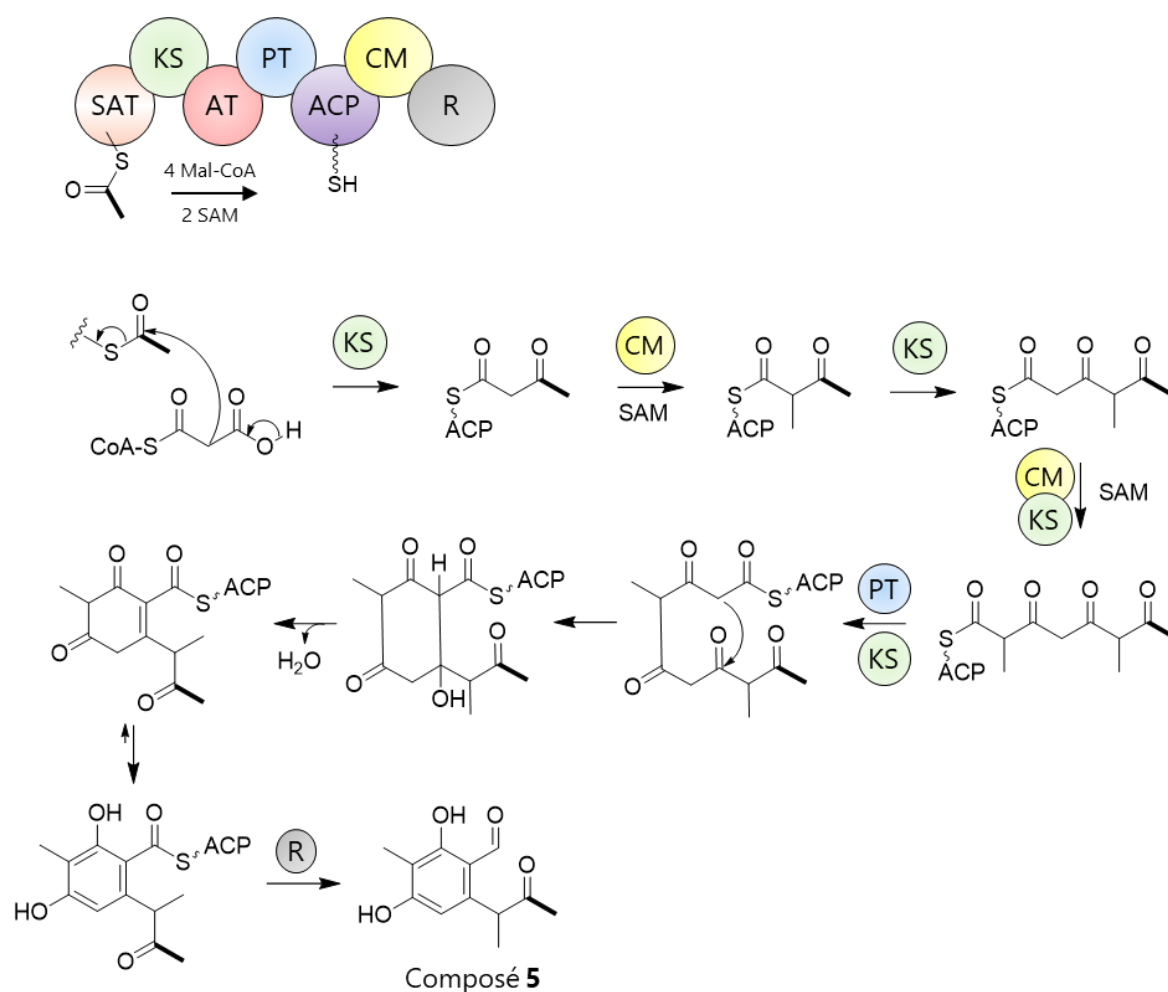


Figure 95 : Hypothèse de la biosynthèse du composé **5** (SAT : *starter unit-ACP transacylase*, KS = *ketosynthase*, AT = *acyltransférase*, PT = *product template*, ACP = *acyl carrier protein*, CM = *C-méthyltransférase*, R = *réductase*). La voie de biosynthèse du composé **5** est similaire à celle de la rédoxcititrine¹⁵⁵.

2.1.5 Éluclation structurale du composé **6**

La superposition des spectres RMN du proton ^1H des composés **5** et **6** montre une similitude structurale, confirmant que ces composés sont des analogues structuraux (**Figure 96**).

¹⁵⁵ Storm, *et al.*, *Cell Chemical Biology*, **2017**, 24, 316-325.

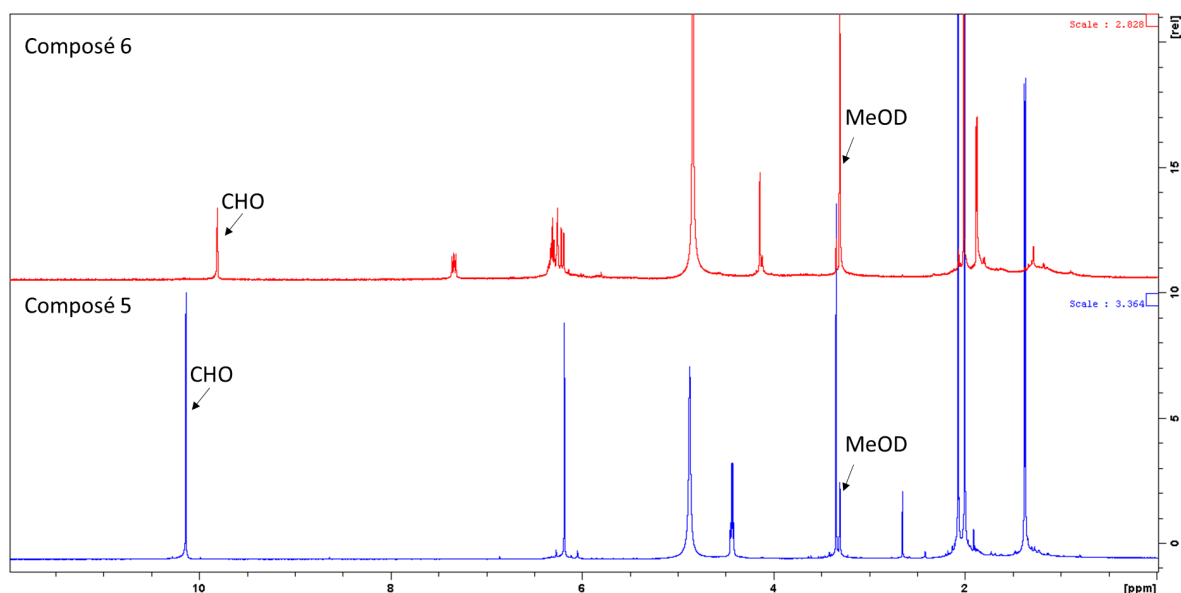


Figure 96 : Superposition des spectres RMN ¹H du proton des composés **5** (bleu, 600 MHz, CH₃OH-d₄) et **6** (rouge, 600 MHz, CH₃OH-d₄)

Le composé **6** est représenté en tant que nœud isolé alors qu'il a une structure similaire à celle du composé **5** (**Figure 85**). Nous avons ensuite vérifié le spectre de fragmentation de ces deux composés. Leurs spectres SM/SM ne représentent que deux fragments en commun, ce qui explique pourquoi ils ne sont pas retrouvés dans le même cluster (**Figure 97**). Donc, l'étude du réseau moléculaire nécessite une inspection manuelle des données de manière importante.

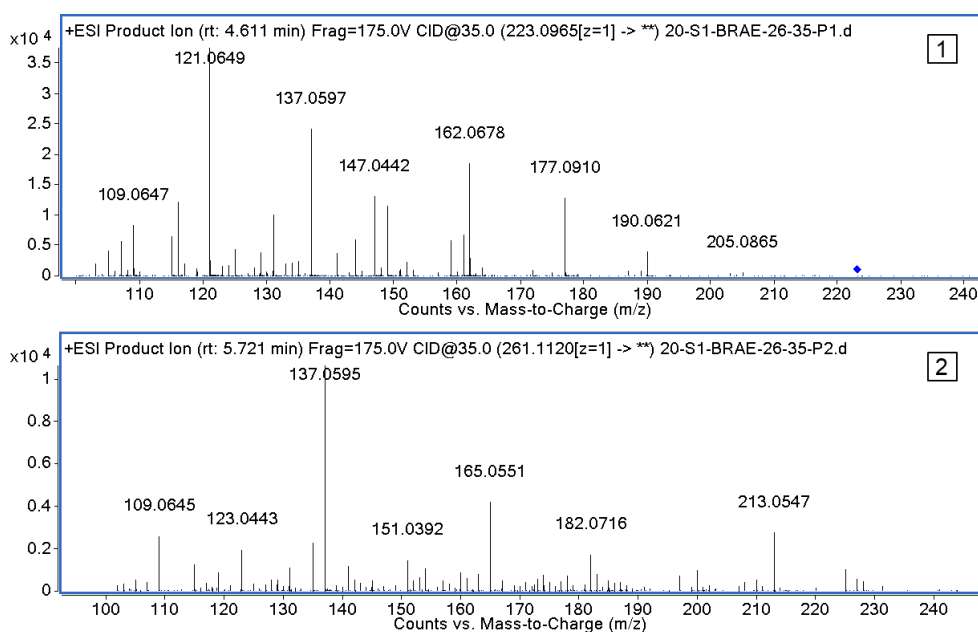


Figure 97 : Spectres de fragmentation SM/SM des composés **5** (en haut) et **6** (en bas)

Les analyses de masse haute résolution du composé **6** réalisées par *Electrospray* en mode positif (ESI⁺) montrent un ion à $m/z = 261,1121$ [M+H⁺]. La formule brute correspondante est C₁₅H₁₆O₄ (valeur calculée 261,1121) et révèle la présence de huit insaturations (**Figure 98**, **Figure 99**).

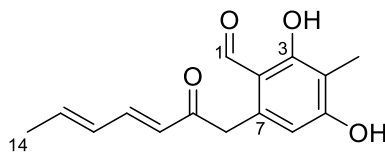


Figure 98 : Structure du composé **6**

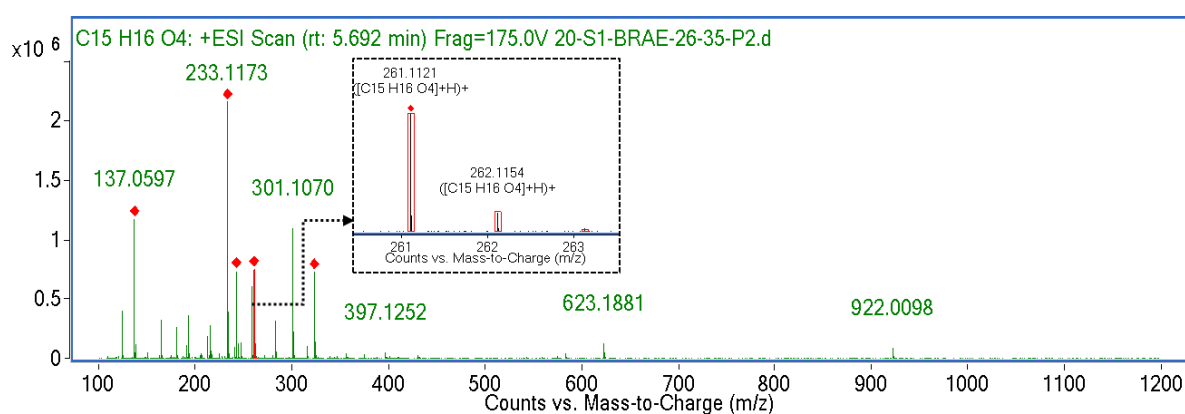


Figure 99 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **6**

La structure de ce composé a été élucidée par l'étude de ses spectres RMN. Le spectre RMN du proton de ce composé indique des signaux similaires à ceux du composé **5** (un aldéhyde à 9,81 ppm et deux méthyles à 1,88 et 2,01 ppm). Le méthyle à 2,07 ppm est absent dans le spectre de proton du composé **6**, suggérant qu'il y a une modification au niveau de la chaîne latérale.

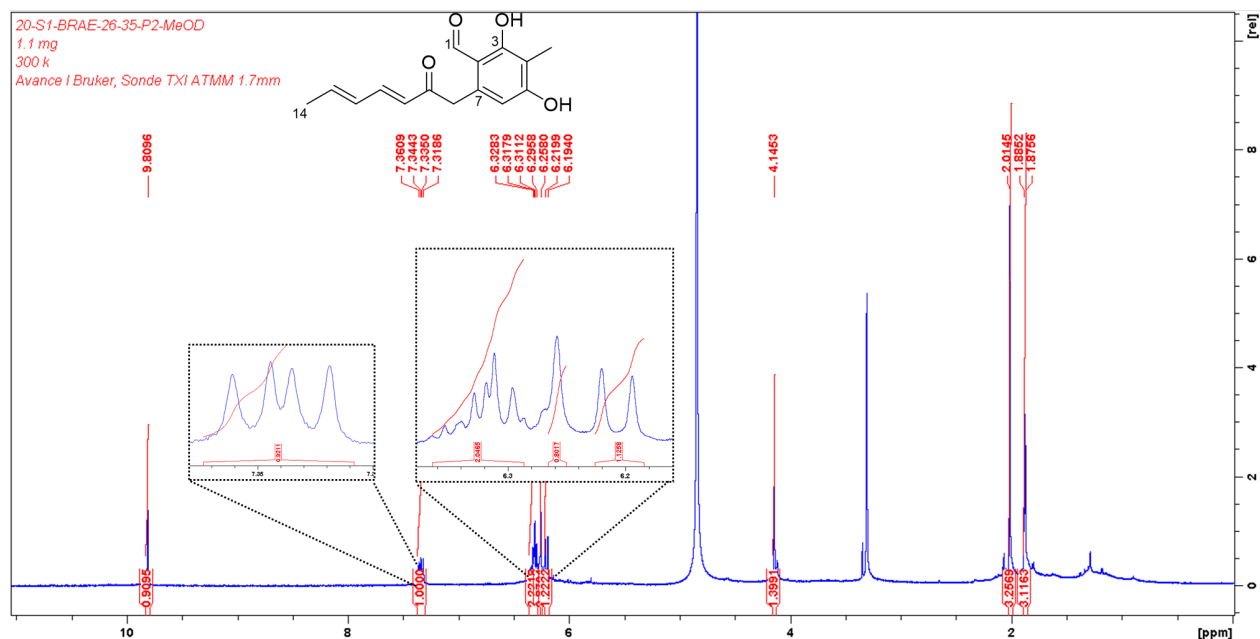


Figure 100 : Spectre RMN ^1H du composé **6** avec l'agrandissement des signaux à $\delta_{\text{H}} = 7,34$ ppm et δ_{H} entre 6,19 et 6,36 ppm (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

L'agrandissement de la zone des signaux de protons entre 6,19 et 6,36 ppm montre la présence du proton aromatique à $\delta_{\text{H}} = 6,25$ ppm (H-6) sous forme d'un singulet, suggérant qu'il n'a pas de protons voisins (**Figure 100**). Les signaux du cycle aromatique et ses substitutions sont similaires à ceux du composé **5** (un méthyle en singulet à $\delta_{\text{H}} = 2,01$ ppm et un proton aromatique en singulet à $\delta_{\text{H}} = 6,25$ ppm).

Le signal du proton à $\delta_{\text{H}} = 7,34$ ppm (H-11) apparaît sous forme d'un doublet de doublet, suggérant qu'il corrèle avec deux protons non équivalents. Les corrélations observés en ^1H - ^1H COSY montrent que le proton à $\delta_{\text{H}} = 7,34$ ppm corrèle avec les protons à $\delta_{\text{H}} = 6,21$, 6,29 et 6,30 ppm (H-10, 12, 13). Les déplacements chimiques de ces signaux suggèrent la présence d'un système conjugué (**Figure 101**)

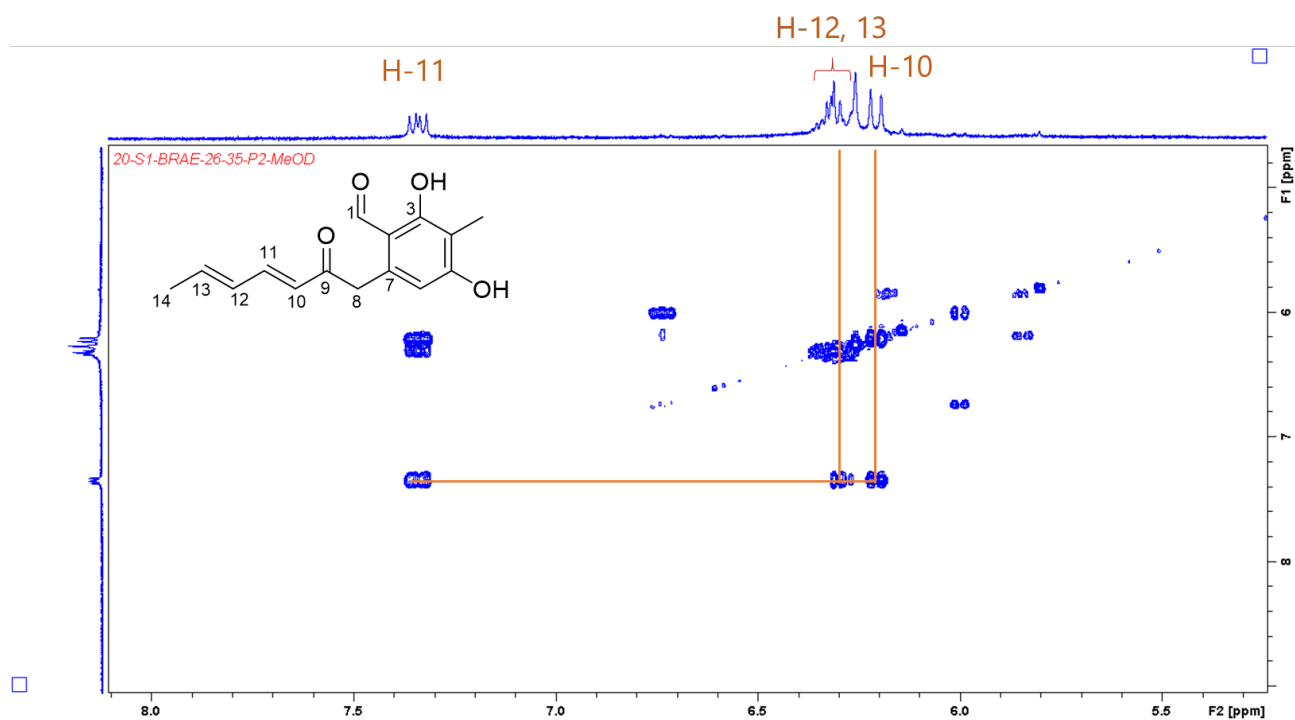


Figure 101 : Détails des corrélations ^1H - ^1H COSY pour le composé **6** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

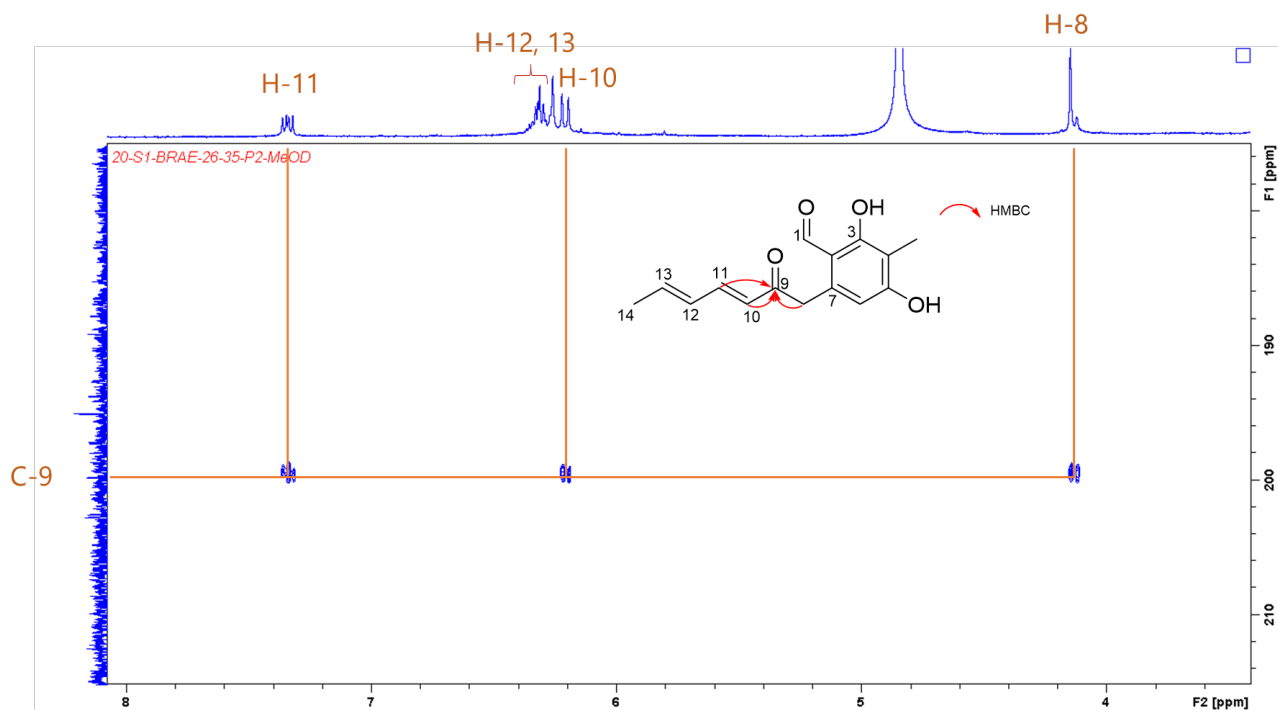


Figure 102 : Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC pour le composé **6** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Comme décrit précédemment, la superposition des spectres RMN ^1H des

composés **5** et **6** montre l'absence d'un méthyle dans le composé **6** (**Figure 96**). Ce méthyle est lié au carbone C-8 dans le composé **5** (CH_3 , $\delta_{\text{H}} = 1,37$ ppm, H-11). En absence de ce méthyle, les protons du méthylène H-8 à $\delta_{\text{H}} = 4.14$ ppm apparaissent donc en singulet (**Figure 102**).

La multiplicité des protons (H-10 : doublet et H-11 : doublet de doublet) et les corrélations des protons H-8, 10, 11, 12 et 13 avec le carbone de la cétone C-9 à $\delta_{\text{C}} = 199,5$ ppm nous ont permis de construire la chaîne latérale du composé **6** (**Figure 103**). La constante de couplage de 15,7 Hz entre H-10 et H-11 indique une configuration *trans* pour la double liaison C-10/C-11. Les protons reliés aux carbones C-12/C-13 de la double liaison sont sous forme de multiplet dans le spectre RMN ^1H (**Figure 100**).

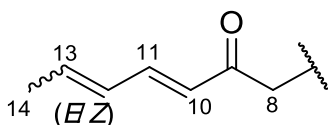
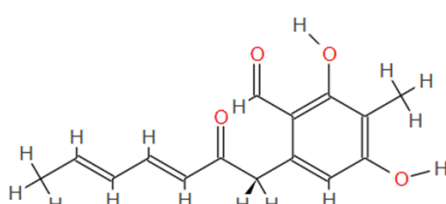


Figure 103 : Sous-structure de la molécule **6**

La configuration de cette double liaison a donc été établie par la prédiction du spectre RMN ^{13}C des deux possibilités (*E* ou *Z*) à l'aide de l'outil nmrdb (<https://www.nmrdb.org/>)¹⁵⁶. Cette prédiction montre que les déplacements chimiques des carbones de la double liaison en configuration *trans* sont plus déblindés que ceux en configuration *cis* (**Figure 104**).

¹⁵⁶ Banfi and Patiny, *CHIMIA*, **2008**, 62, 280.

Chemical structure with hydrogen exploded	List of signals		
	Assignment	Delta	Nb atoms
		113.7	1
		139.4	1
		111.3	1
		157.5	1
		110.31	1
		164.7	1
		191.9	1
		45	1
		197.8	1
		129.5	1
		144.1	1
		8.6	1
		131	1
	133.3	1	
	18.2	1	

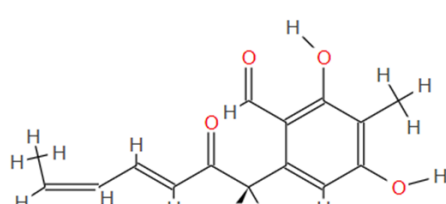
Chemical structure with hydrogen exploded	List of signals		
	Assignment	Delta	Nb atoms
		113.7	1
		139.4	1
		111.3	1
		157.5	1
		110.31	1
		164.7	1
		191.9	1
		45	1
		197.8	1
		129.5	1
		128	1
		8.6	1
		127.44	1
	124.98	1	
	14.35	1	

Figure 104 : Déplacements chimiques de RMN ^{13}C prédits pour les structures (1*E*,3*E*)-1,3-pentadiène (en haut) et (1*E*,3*Z*)-1,3-pentadiène (en bas) du composé **6** (C-10/C-11 et C-12/C-13) (<https://www.nmrdb.org/>)

Pour avoir un argument plus solide sur la configuration *trans* de la double liaison C-12/C-13, les données RMN des molécules possédant le motif (1*E*,3*E*)-1,3-pentadiène ont été cherchés dans la base de données du DNP®. Parmi les résultats obtenus, la structure de l'indigotide C (**Figure 105**) a attiré notre attention.

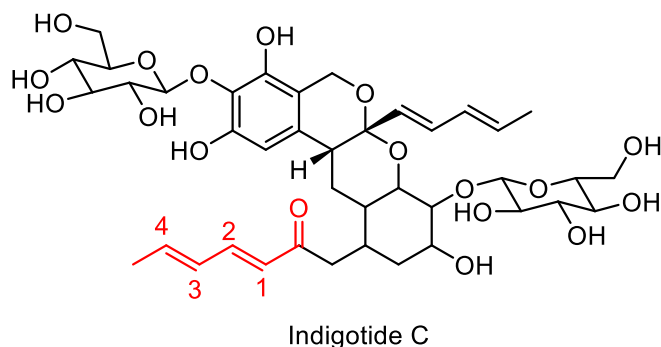


Figure 105 : Structure de l'indigotide C avec le motif (1*E*,3*E*)-1,3-pentadiène en rouge

La comparaison des déplacements chimiques des carbones de ce motif à ceux du composé **6** et de l'indigotide C confirme bien une configuration *trans* pour la double liaison C-12/C-13 (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Déplacements chimiques des carbones du motif (1*E*,3*E*)-1,3-pentadiène de l'indigotide C (150 MHz, CH₃OH-d₄)¹⁵⁷ et du composé **6** (150 MHz, CH₃OH-d₄)

Indigotide C	δ_c (ppm)	Molécule 6	δ_c (ppm)
C-1	127,3	C-10	127,6
C-2	145,8	C-11	145,8
C-3	131,5	C-12	131,2
C-4	142,8	C-13	142,8

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN ¹H et ¹³C, de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 6** ci-dessous.

Tableau 6 : Déplacements chimiques des protons (600 MHz, CH₃OH-d₄) et des carbones (150 MHz, CH₃OH-d₄) du composé **6**

Position	δ_H , mult, J in Hz	δ_c (ppm)	HMBC
1	9,83 (1H, s)	194,8	C-2, 3, 4
2	-	113,9	-
3	-	165,3	-
4	-	111,5	-
5	-	164,2	-
6	6,25 (1H, s)	111,6	C-2, 4, 5
7	-	139,1	-
8	4,14 (2H, s)	44,2	C-2, 6, 7, 9
9	-	199,5	-
10	6,21 (1H, d, J = 15,7 Hz)	127,6	C-9, 13
11	7,33 (1H, dd, J = 15,7; 9,6 Hz)	145,8	C-9, 12, 13

¹⁵⁷ Asai, et al., *Organic Letters*, **2012**, 14, 2006-2009.

12	6,29 (1H, m)	131,2	-
13	6,30 (1H, m)	142,8	C-11, 14
14	1,88 (3H, d, $J = 5,7$ Hz)	18,7	C-12, 13
15	2,01 (3H, s)	7,01	C-3, 4, 5

2.1.6 Éluclidation structurale du composé 7

Les analyses de masse haute résolution du composé **7** réalisées par electrospray en mode positif (ESI⁺) montrent un ion à $m/z = 263,1278$ [M+H⁺]. La formule brute correspondante est C₁₅H₁₈O₄ (valeur calculée 263,1278) et révèle la présence de sept insaturations (**Figure 106**).

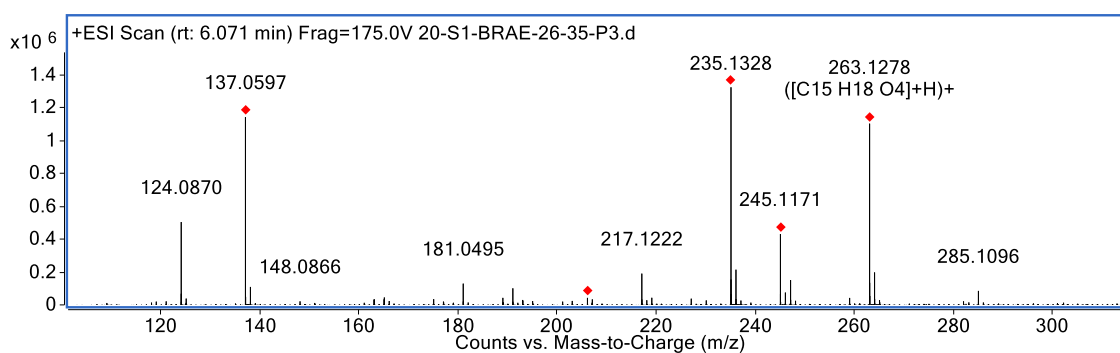


Figure 106 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **7**.

Le spectre RMN ¹H du composé **7** est similaire à celui du composé **6**, nous avons observé seulement le changement au niveau de la chaîne latérale (**Figure 107**).

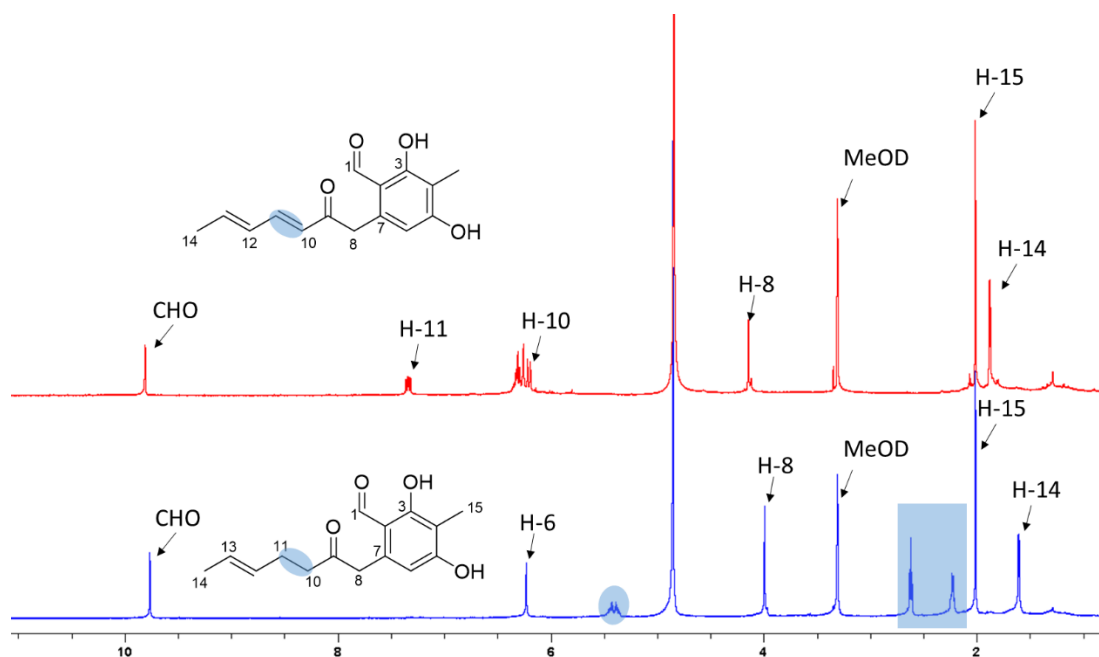


Figure 107 : Superposition des spectres RMN ^1H des composés **6** (rouge, 600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) et **7** (bleu, 600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

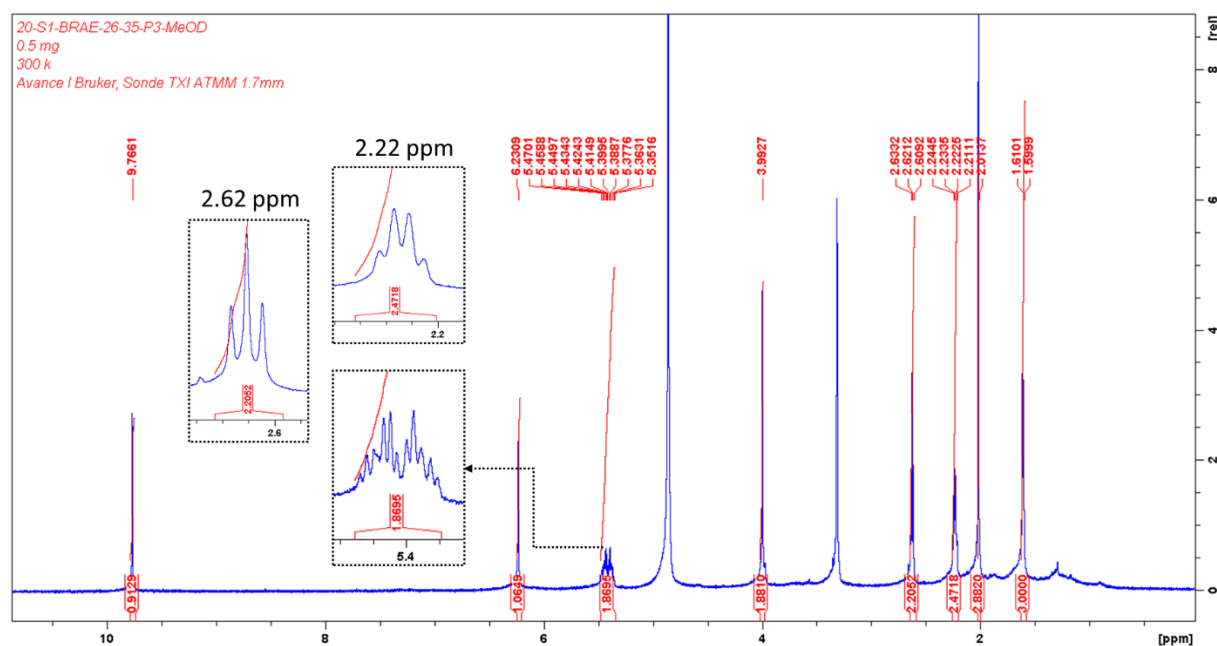


Figure 108 : Spectre RMN ^1H du composé **7** avec agrandissements des multiplets associés aux protons à $\delta_{\text{H}} = 2,22, 2,62, 5,38$ et $5,44$ ppm (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Le proton du méthylène à $\delta_{\text{H}} = 2,62$ ppm (H-10) est sous la forme d'un triplet, suggérant qu'il est à côté d'un autre méthylène (H-11) (**Figure 108**). Le proton H-11 corrèle avec les protons H-12 et H-14. Les protons H-13 et H-14 présentent des taches de corrélation en COSY (**Figure 109**).

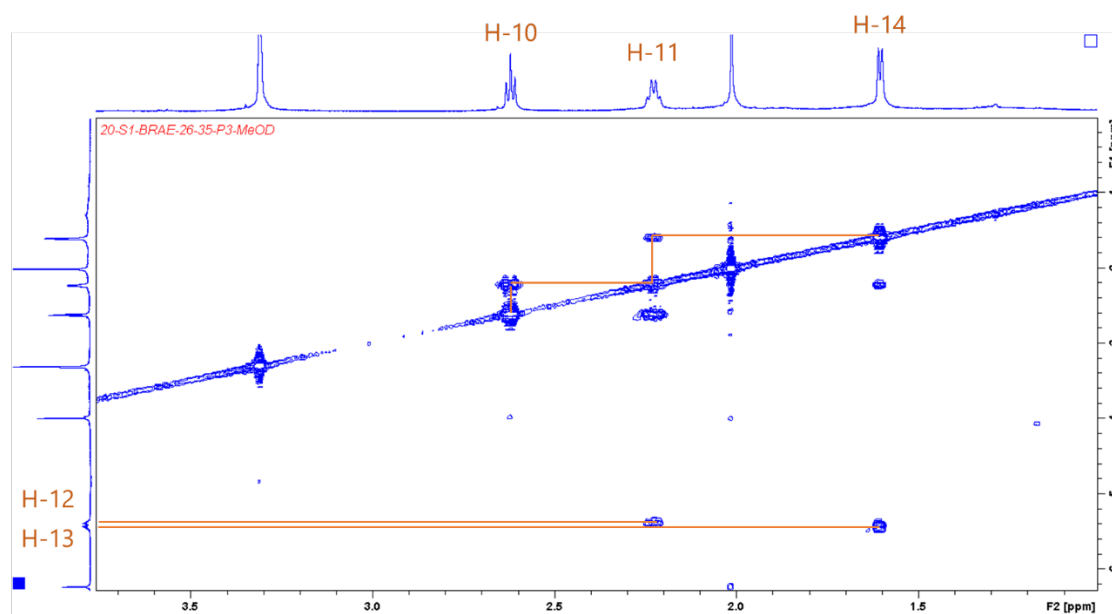


Figure 109 : Détails des corrélations du spectre ^1H - ^1H COSY pour le composé **7** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Ces observations nous ont permis de construire la chaîne latérale de la molécule. La constante de couplage de 15,5 Hz entre les protons H-12 et H-13 (**Figure 110**) a permis d'attribuer la configuration *trans* pour la double liaison C-12/C-13.

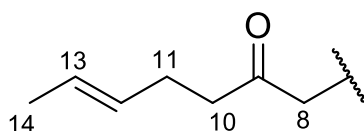


Figure 110 : Chaîne latérale du composé **7**

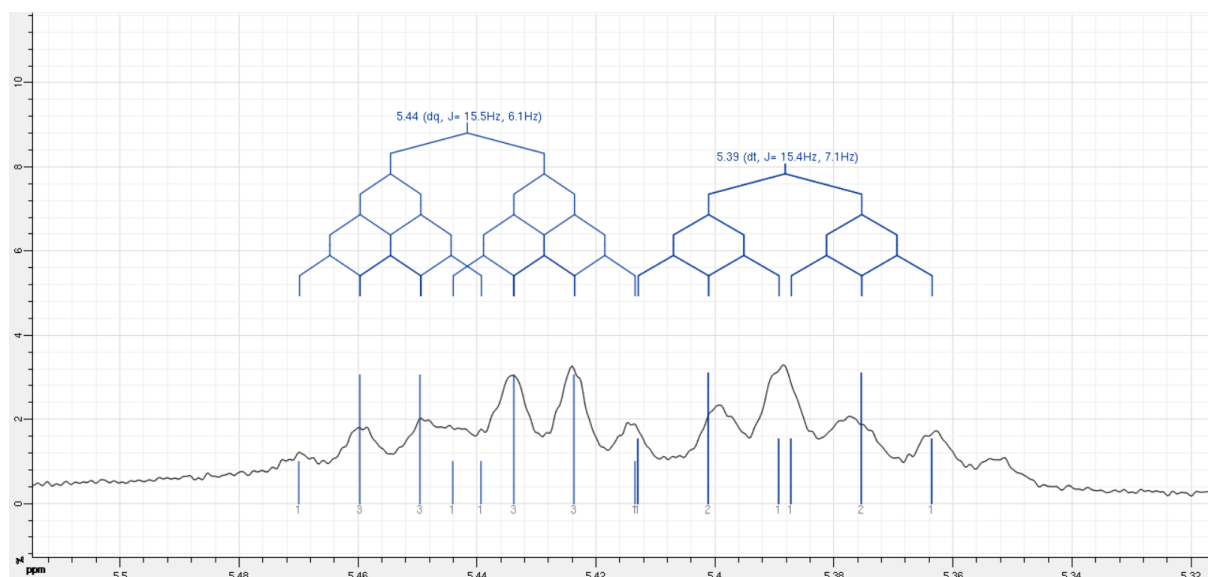


Figure 111 : La multiplicité et la constante de couplage de deux protons H-12 et H-13 déterminés par NMRnotebook (600 MHz, CH₃OH-d₄)

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN du proton ¹H, du carbone ¹³C, de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 7** ci-dessous.

Tableau 7. Déplacements chimiques des protons (600 MHz, CH₃OH-d₄) et des carbones (150 MHz, CH₃OH-d₄) du composé **7**

Position	δ_H , mult, J in Hz	δ_C (ppm)	HMBC
1	9,76 (1H, s)	194,9	C-2, 3, 4
2	-	111,6	-
3	-	164,9	-
4	-	113,5	-
5	-	165,0	-
6	6,23 (1H, s)	111,8	C-2, 4, 5, 8
7	-	139,1	-
8	3,99 (2H, s)	46,7	C-2, 7, 9
9	-	209,2	-
10	2,62 (2H, t, J = 7,1 Hz)	43,0	C-9, 11, 12
11	2,22 (2H, q, J = 7,0 Hz)	27,9	C-9, 10, 12, 13
12	5,39 (1H, dt, J = 15,4; 7,1 Hz)	130,8	C-11, 14
13	5,44 (1H, dq, J = 15,5; 6,1 Hz)	127,2	C-11, 14
14	1,60 (3H, d, J = 6,1 Hz)	18,1	C-12, 13
15	2,01 (3H, s)	7,05	C-3, 4, 5

Ces nouveaux composés **5**, **6**, **7** sont des produits des enzymes NR-PKS fongiques de la voie de biosynthèse des polyacétates avec l'incorporation de différents substrats de départ. Les produits de ces enzymes servent des précurseurs pour synthétiser des produits plus complexes qui sont probablement des azaphilones dans notre cas (voir [Existe-t-il un lien entre le composé 5 et les précurseurs de la voie de](#)

[biosynthèse des azaphilones ?](#)). L'isolement de ces produits confirme l'intérêt de l'utilisation de la résine car celle-ci permet de capter les intermédiaires de biosynthèse relargués par la souche tout au long de sa culture.

2.2 Étude chimique du champignon *Emericellopsis microspora* 20-S19

2.2.1 Un réseau moléculaire parfait existe-t-il ?

En étudiant le réseau moléculaire de la souche *Emericellopsis microspora* 20-S19, nous avons observé un cluster contenant des ions à $m/z = 350,2075$ $[M+H]^+$, qui n'ont pas été annotés par le GNPS, ni par NAP (**Figure 112**). Nous avons décidé de les chercher dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de la culture liquide en présence de résine (*LSF*¹⁵⁸).

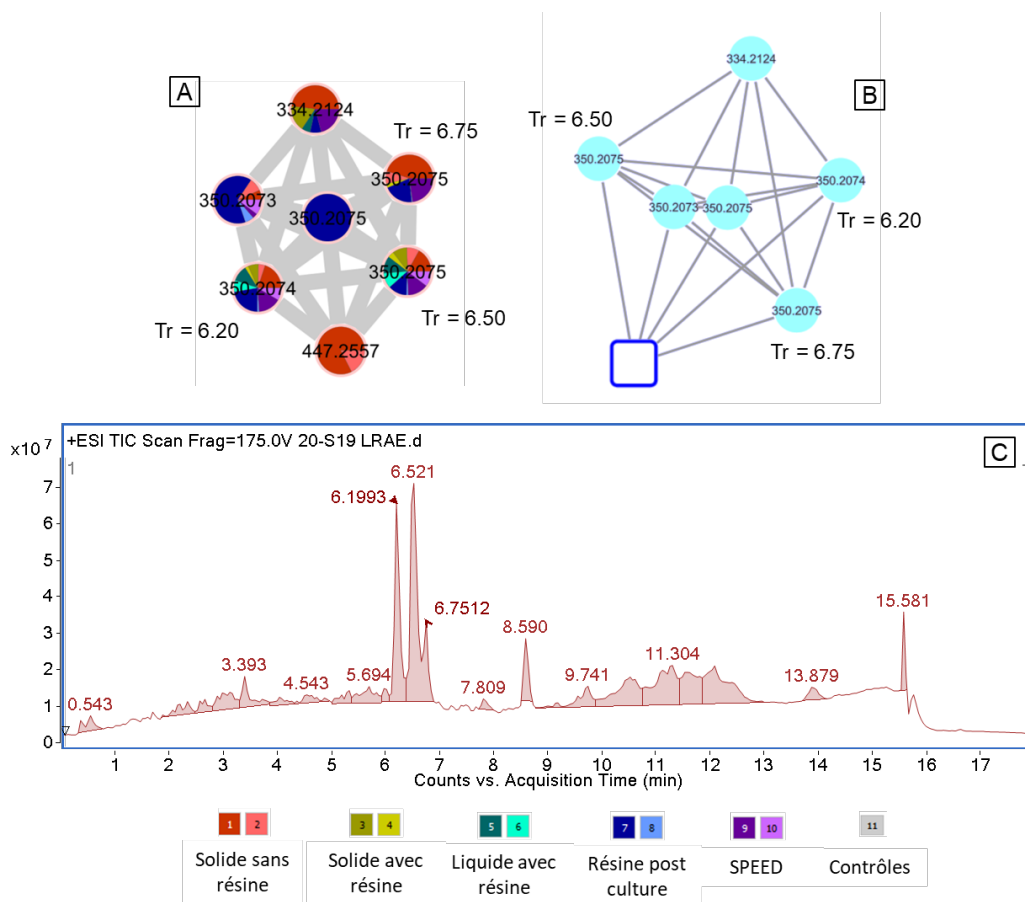


Figure 112 : **[A]** le cluster des ions à $m/z = 350,2075$ dans le réseau moléculaire des extraits bruts aux différentes conditions de culture de la souche 20-S19. **[B]** le même cluster du réseau moléculaire annoté par NAP ; aucune annotation proposée par NAP et GNPS. **[C]** Le chromatogramme LC-MS (ESI⁺) de l'extrait acétate d'éthyle de la souche cultivée en milieu liquide avec la résine.

Les ions à $m/z = 350,2075$ sont majoritaires dans l'extrait et sont élués entre 6,19 et 6,75 min. Ces trois produits ont été ciblés puis isolés. En analysant leurs spectres de masse, nous avons observé la présence d'ions dichargés $[M+2H]^{2+}$ pour

¹⁵⁸ *Liquid State Fermentation*

chacune des trois molécules (**Figure 113**). Les ions $[M+H]^+$ n'ont pas pu être observés car la fenêtre d'acquisition des « scans » en SM a été réglée entre les m/z 100 et 1200.

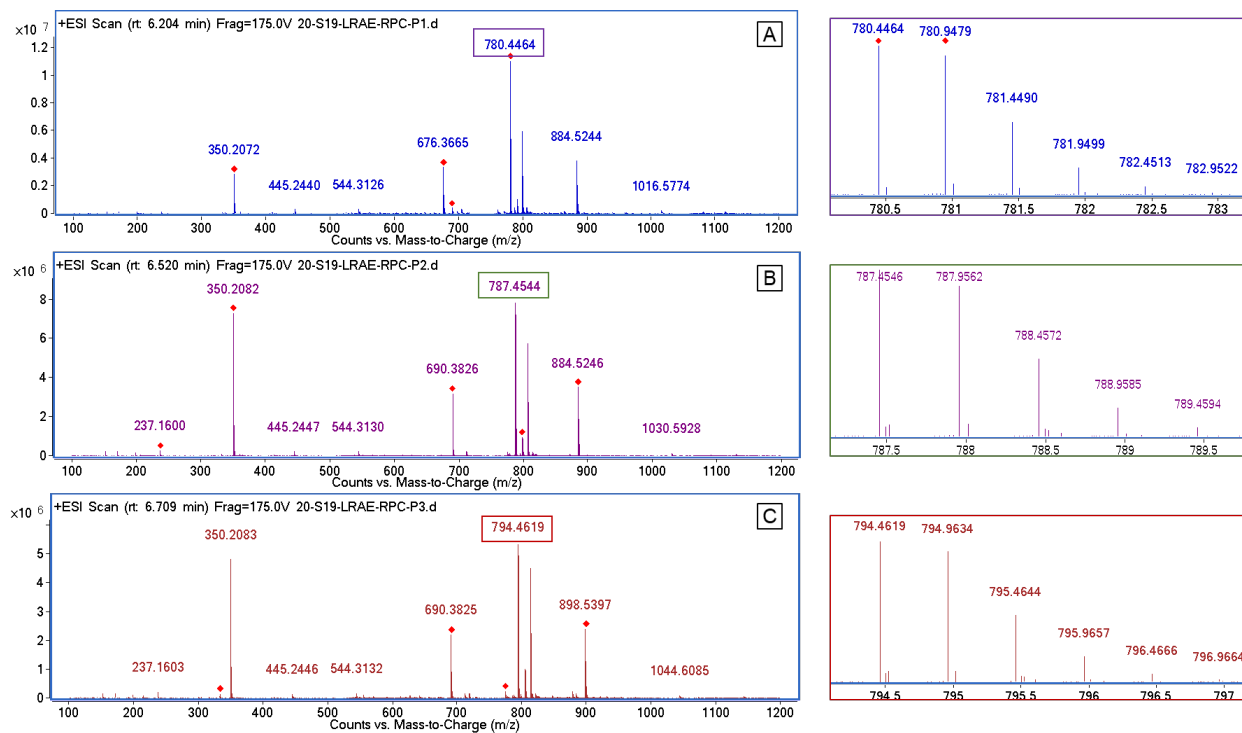


Figure 113 : les spectres de masses des ions observés dans le *cluster* des ions à $m/z = 350,2075$. **[A]**, **[B]**, **[C]** les ions dichargés ont été observés (à droite : l'agrandissement du massif isotopique de ces ions).

2.2.2 Optimisation des paramètres d'acquisition

En élargissant la fenêtre d'acquisition des « scans » en SM (une gamme de m/z entre 100 et 3000), les ions $[M+H]^+$ ont pu être observés (**Figure 114**). Les ions à $m/z = 350,2075$ sont, en fait, des fragments de source de l'ion parent.

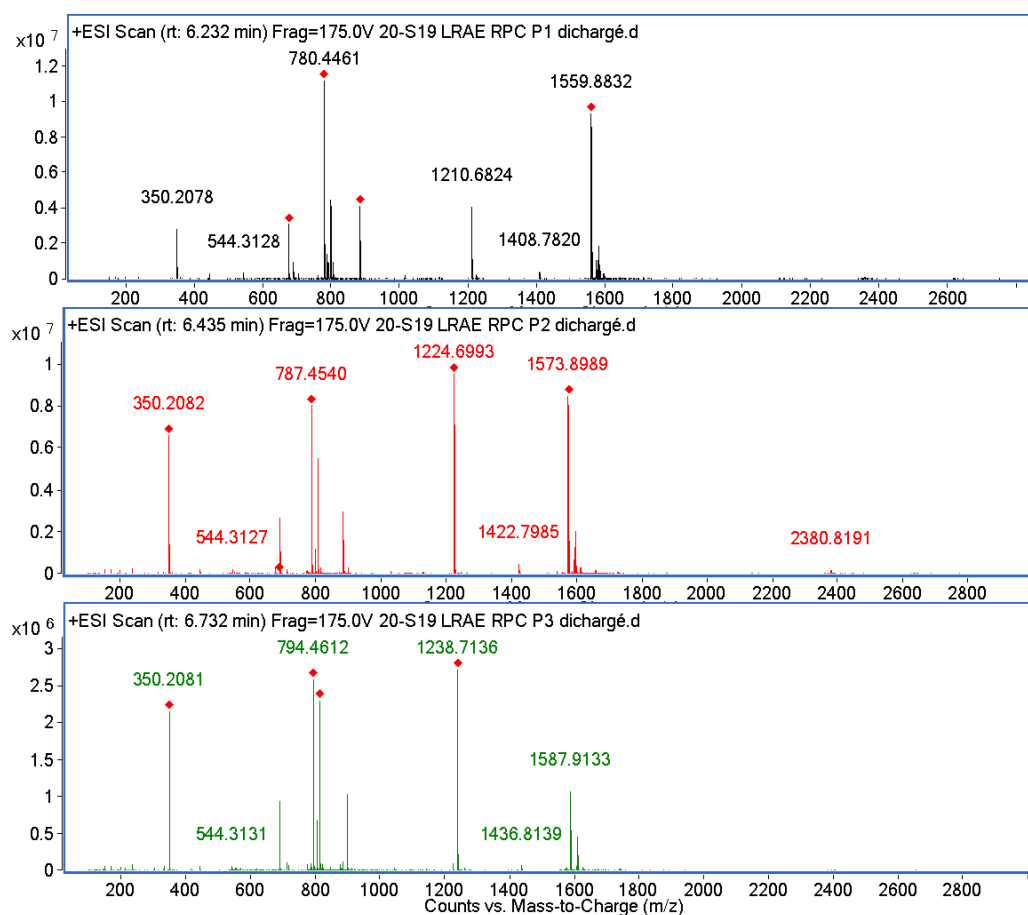


Figure 114 : les spectres de masses des ions observés dans le cluster des ions à $m/z = 350,2075$ avec l'augmentation de la fenêtre d'acquisition des « scans ». Les ions $[M+H]^+$ ont finalement pu être observés.

2.2.3 Identification des composés dans le cluster des ions à $m/z = 350,2075$

Les spectres SM/SM et les spectres RMN 1H et ^{13}C de ces trois produits sont similaires à ceux des molécules de la famille des éméricines, des peptaibols de 15 acides aminés, produits par le champignon *Acremonium tubakii* W. Gams¹⁵⁹ et de deux champignons appartenant au genre *Emericellopsis* (*Emericellopsis microspora* et *Emericellopsis minima*).^{160,161} Ces données sont cohérentes avec le profil des métabolites de notre souche *Emericellopsis microspora* 20-S19.

La formule brute du composé **8** ($m/z = 1559,8832 [M+H]^+$) correspond à $C_{77}H_{118}N_{16}O_{19}$ (valeur calculée = 1559,8832). Les spectres RMN 1H et ^{13}C sont similaires à ceux publiés dans la littérature pour l'éméricine III (**Figure 115**)¹⁶².

Les formules brutes du composé **9** ($m/z = 1573,8989, [M+H]^+$) et **10** ($m/z = 1587,9133, [M+H]^+$) correspondent à $C_{77}H_{120}N_{16}O_{19}$ (valeur calculée = 1573,8988) et à

¹⁵⁹ Wu, *et al.*, *J Nat Prod*, **2021**, *84*, 1113-1126.

¹⁶⁰ Inostroza, *et al.*, *Natural Product Research*, **2018**, *32*, 1361-1364.

¹⁶¹ Argoudelis and Johnson, *J Antibiot (Tokyo)*, **1974**, *27*, 274-82.

¹⁶² Slomczynska, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, *114*, 4095-4106.

$C_{77}H_{122}N_{16}O_{19}$ (valeur calculée = 1573,9145), respectivement.

En analysant les données de masse et les spectres RMN 1H et ^{13}C de ces deux produits, ces derniers ont été identifiés comme étant les éméricimine V et VI, respectivement (**Figure 115**). La littérature fait état d'une forte activité cytotoxique sur les embryons de poisson zèbre pour ces composés. De plus, l'éméricimine V a montré une activité modeste contre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine¹⁶³.

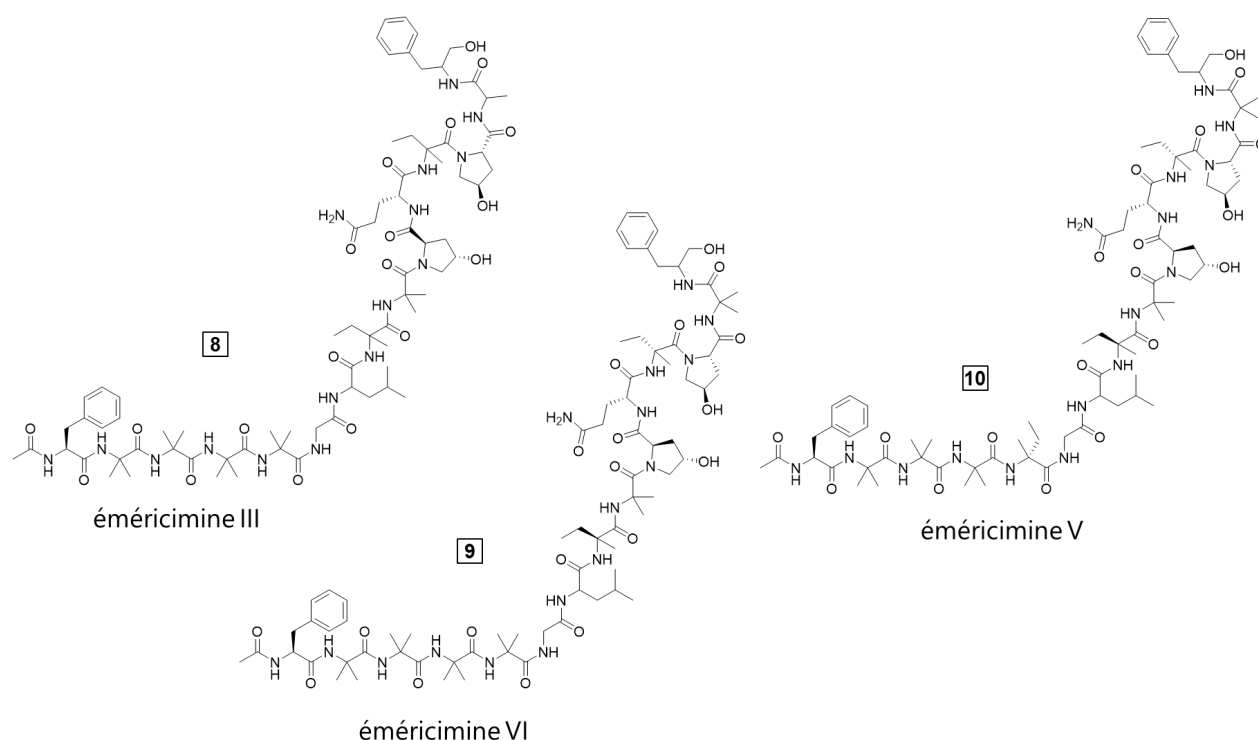


Figure 115 : Structures des molécules de famille des éméricimines.

Le ciblage et l'isolement de ces trois molécules révèle certains écueils liés à la construction et l'exploitation d'un réseau moléculaire pour élaborer une décision d'isolement d'une molécule. En effet, la sélection de fragments de source comme ions précurseurs ainsi que la sélection de la bonne fenêtre d'acquisition spectrale sont des limitations qui peuvent conduire à des conclusions erronées sans un regard expert.

2.2.1 Détection et identification du produit majoritaire sans annotation de l'extrait brut de la culture *LSF*

Le composé **11**, un des composés majoritaires, a été détecté dans le

¹⁶³ Wu, et al., *J Nat Prod*, **2021**, *84*, 1113-1126.

chromatogramme TIC de l'extrait brut de la culture **LSF**. Ce produit ($m/z = 269,2111$, $[M+H]^+$) est présent sous forme d'un nœud isolé et sans annotation dans le réseau moléculaire (**Figure 116**). L'exploitation des données HR-ESIMS révèle la formule brute $C_{16}H_{28}O_3$, associée à trois insaturations. En associant la formule brute ainsi que la source biologique ("*Emericellopsis microspora*") de la molécule dans la base de données DNP®, aucun résultat n'a été obtenu. Ce produit a été ensuite isolé afin de déterminer sa structure.

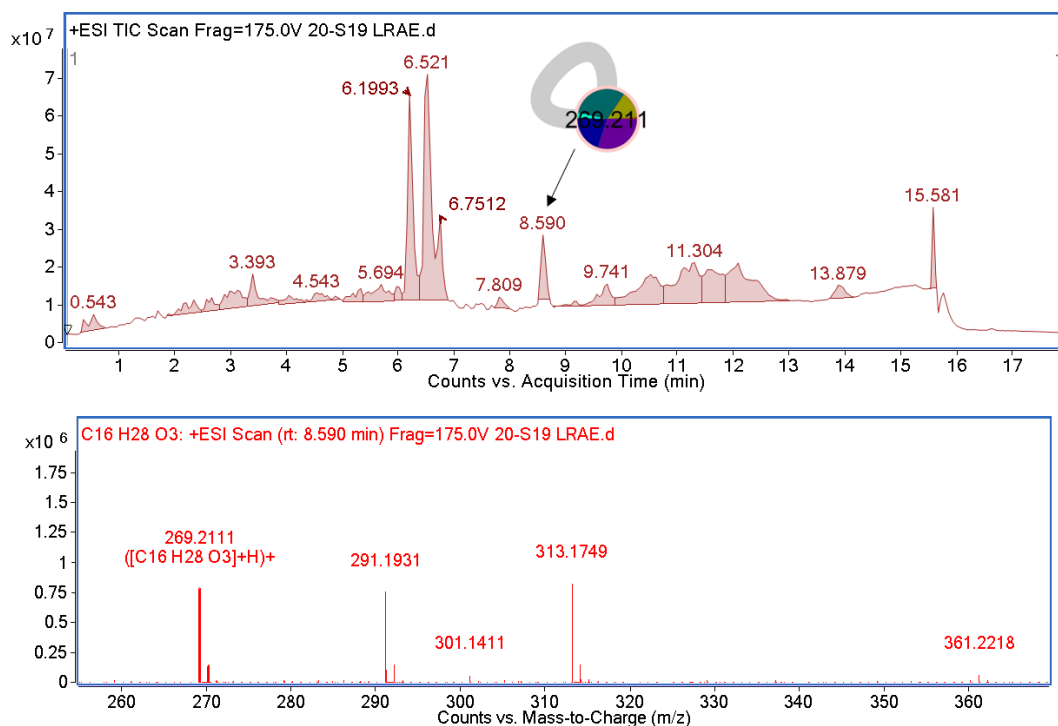


Figure 116 : L'ion à $m/z = 269,2111$ observé à $Tr = 8,590$ (en haut) et sa formule brute générée par MassHunter® (en bas).

2.2.2 Éluclidation structurale du composé **11**

La comparaison des données de RMN de la molécule avec les structures proposées par DNP® et Sci-Finder® sur la seule base de la formule brute ne donne pas de résultat satisfaisant concernant la structure du composé **11**. Celle-ci a été ensuite élucidée par les analyses des spectres RMN (**Figure 117**).

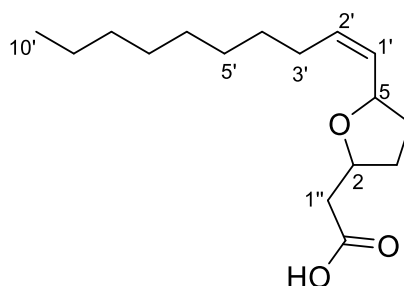


Figure 117 : Structure du composé 11

Les signaux des protons du spectre RMN ^1H du composé **11** peuvent être divisés en trois régions : une région aliphatique entre 0,87 à 2,06 ; une deuxième oxygénée entre 4,20 et 5,00 et une troisième éthylénique entre 5,20 et 6,00 ppm (**Figure 118**). Les données ^1H - ^{13}C HSQC indiquent la présence d'un méthyle, quatre méthines, trois méthylènes non équivalents, sept méthylènes équivalents, un carbone quaternaire correspondant à un carbonyle de type ester ou acide carboxylique (**Tableau 8**).

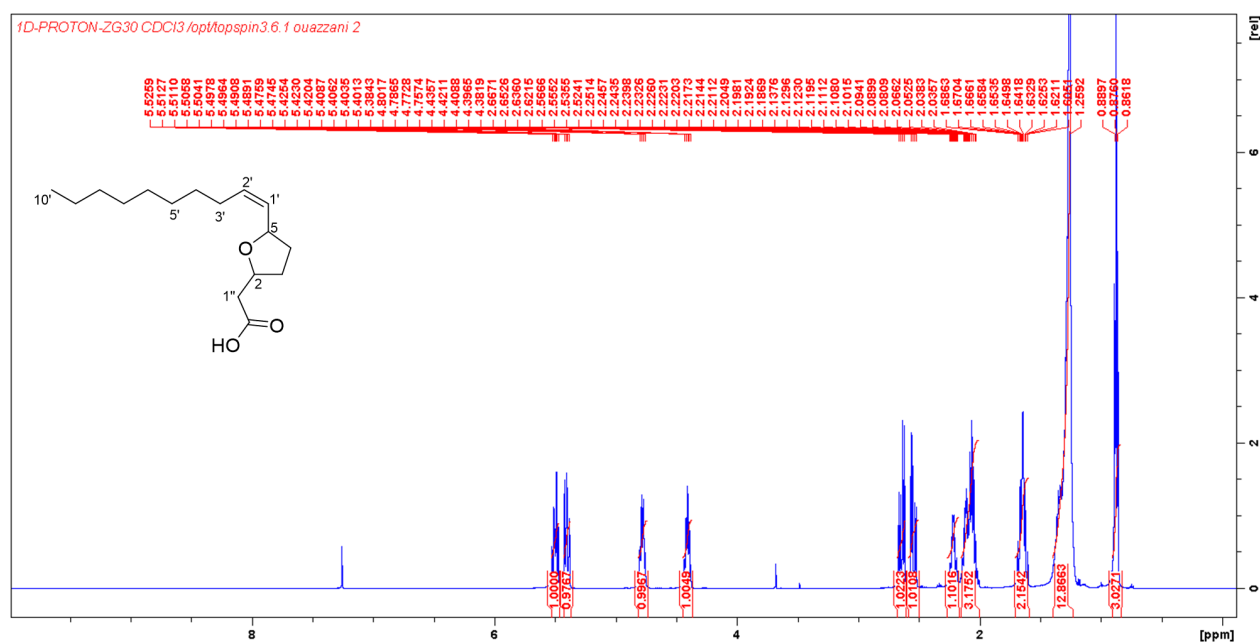


Figure 118 : Spectre RMN ^1H du composé **11** (500 MHz, CDCl_3)

Les méthines CH (H-1') à $\delta_{\text{H}} = 5,40$ ppm ; $\delta_{\text{C}} = 130,1$ ppm et CH (H-2') à $\delta_{\text{H}} = 5,50$ ppm ; $\delta_{\text{C}} = 133,1$ ppm indiquent la présence d'une double liaison. Les proton H-1' et H-2' corrélient en ^1H - ^1H COSY ce qui confirme leur appartenance au même système éthylénique. De plus, le proton H-1' corrélie avec le proton H-5 à $\delta_{\text{H}} = 4,78$ ppm, qui est très déblindé, indiquant la présence d'un oxygène à proximité (**Figure 119**).

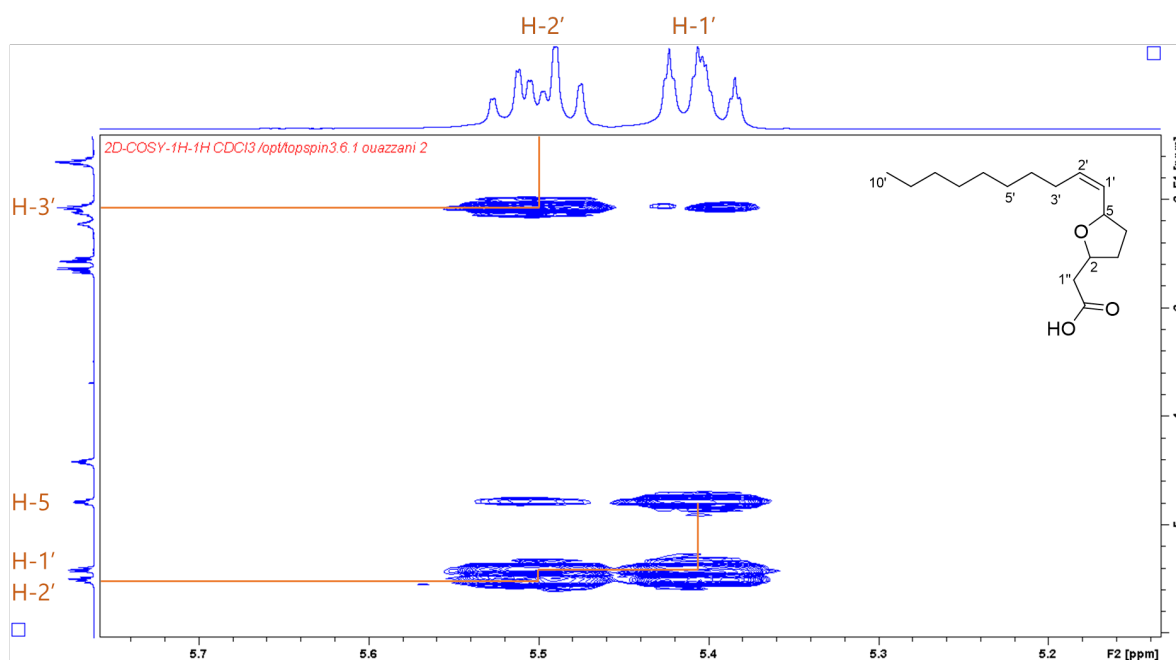


Figure 119 : Détails des corrélations du spectre ¹H-¹H COSY des protons H-1' et H-2' pour le composé **11** (500 MHz, CDCl₃)

Le proton H-2' corrèle avec le proton H-3', lui-même corrélant avec les protons de la chaîne aliphatique (**Figure 121**, **Figure 122**). Toutes ces informations nous ont permis de construire une sous-structure de la molécule (**Figure 120**).

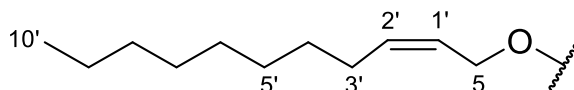


Figure 120 : Sous-structure du composé **11**

La constante de couplage ($J = 11,4$ Hz) mesurée entre les proton H-1' à $\delta_H = 5,40$ ppm et H-2' à $\delta_H = 5,50$ ppm, permet d'attribuer la configuration *cis* pour la double liaison C-1'/C-2' (**Figure 120**).

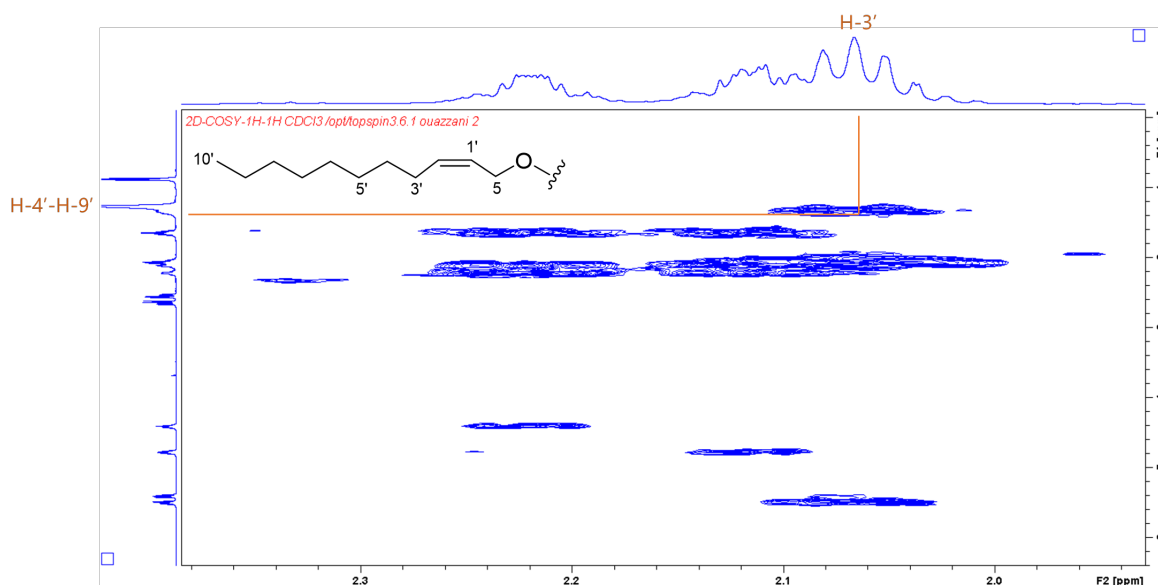


Figure 121 : Détails des corrélations du spectre ^1H - ^1H COSY du proton H-3' pour le composé **11** (500 MHz, CDCl_3)

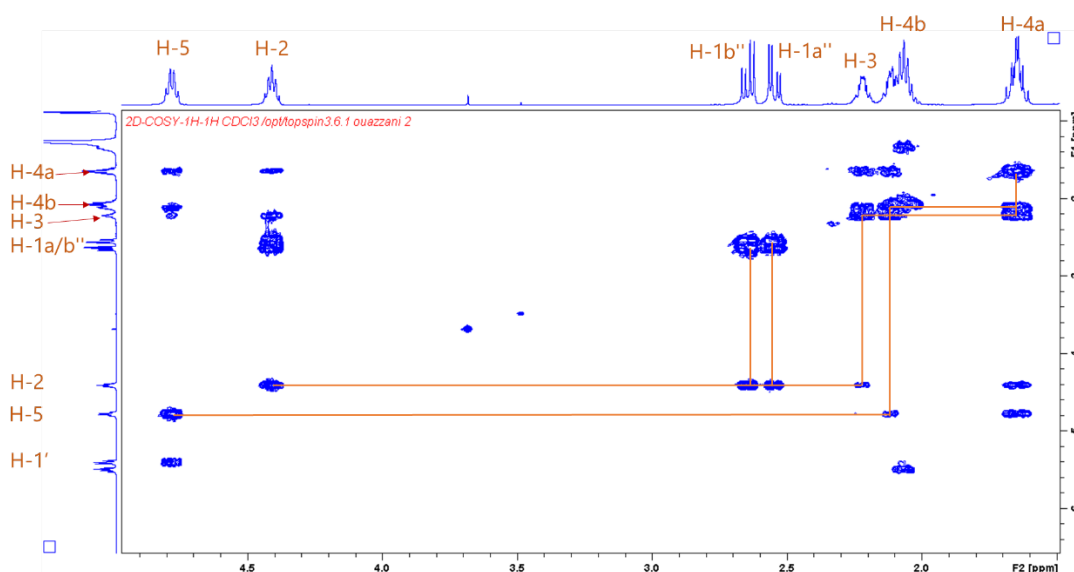


Figure 122 : Détails des corrélations du spectre ^1H - ^1H COSY pour le composé **11** (500 MHz, CDCl_3)

Les protons du méthylène CH_2 (H-4a et H-4b) corrélient avec les protons H-3 ($\delta_{\text{H}} = 2,22$ ppm) et H-5 ($\delta_{\text{H}} = 4,78$ ppm). Le proton H-5 corrélie avec le carbone C-2 en ^1H - ^{13}C HMBC. Comme ces deux protons sont très déblindés, ils sont sensément liés à un oxygène (**Tableau 8**).

Les protons H-1a'' et H-1b'' du méthylène corrélient entre eux et avec le proton H-2 en COSY. Ces deux protons corrélient ainsi avec le carbone à $\delta_{\text{C}} = 175,5$ ppm en HMBC. Toutes ces informations nous ont permis de relier les sous-structures de la

molécule (**Figure 123**).

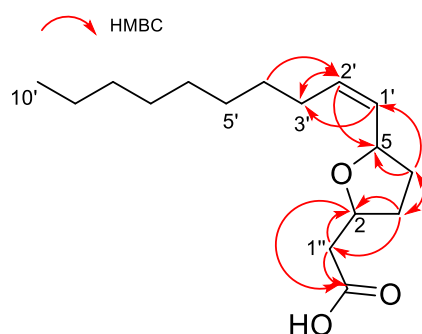


Figure 123 : Structure du composé **11** avec les corrélations ^1H - ^{13}C HMBC

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN du proton ^1H , du carbone ^{13}C , de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 8** ci-dessous :

Tableau 8. Déplacements chimiques des protons (500 MHz, CDCl_3) et des carbones (125 MHz, CDCl_3) du composé **11**

Position	δH , mult, J in Hz	δC (ppm)	HMBC
1	-	-	-
2	4,41 (1H, qu, $J = 6.7$ Hz)	74,8	C-2'', 3, 5
3	2,22 (1H, m) 1,65 (1H, m)	32,2	C-4, 5
4	1,65 (1H, m) 2,11 (1H, m)	33,1	C-2, 3, 1'', 1' C-2, 3, 1'
5	4,78 (1H, q, $J = 7.9$ Hz)	74,9	C-1', 2, 4
1'	5,40 (1H, ddt, $J = 11,4; 5,6; 1,4$ Hz)	130,1	C-2', 3', 4
2'	5,50 (1H, dtd, $J = 10,9; 7,5; 0,9$ Hz)	133,1	C-1', 3', 4', 5
3'	2,06 (2H, m)	27,6	C-1', 2', 4'
4'	1,23-1,39 (2H, m)	29,3	-
5'	1,23-1,39 (2H, m)	29,3	-
6'	1,23-1,39 (2H, m)	29,5	-
7'	1,23-1,39 (2H, m)	29,7	-
8'	1,23-1,39 (2H, m)	31,9	C-9'
9'	1,23-1,39 (2H, m)	22,7	C-10'
10'	0,87 (3H, t, $J = 6.6$ Hz)	14,1	C-8', 9'
1''	2,55 (1H, dd, $J = 15,8 ; 7,4$ Hz) 2,64 (1H, dd, $J = 15,4 ; 6,8$ Hz)	40,5	C-2'', 2, 3
2''	-	175,5	-

- **Stéréochimie du composé 11**

La structure du composé **11** est semblable à des molécules de type acétogénines. Cependant, cette famille de molécule a souvent des groupements hydroxyles à proximité du cycle tétrahydrofurane. Par conséquent, la stéréochimie

relative du composé **11** est difficilement déterminée par les études de RMN seules.

En cherchant la sous-structure tétrahydrofurane du composé **11** dans la littérature, une étude sur la configuration des isomères *cis/trans* des systèmes 2,5-dialkyl-tétrahydrofuranes a attiré notre attention. Dans cette étude, les déplacements chimiques des protons H-2 et H-5 sont plus déblindés dans le cas des isomères *trans*. La moyenne des déplacements chimiques des protons H-2 et H-5 de la molécule 2,5-diméthyltétrahydrofurane est à 4,13 ppm pour la configuration *trans* contre 3,93 ppm pour la configuration *cis* (**Figure 124**)¹⁶⁴.

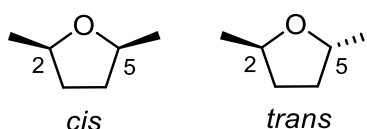


Figure 124 : Les isomères *cis/trans* de la molécule diméthyltétrahydrofurane (figure adaptée de l'article de Mihailović, et al.)¹⁶⁵

Nous avons donc déterminé la stéréochimie relative *trans* pour le tétrahydrofurane du composé **11** (**Figure 125**). Cependant, cela reste une hypothèse à confirmer par une approche DFT associée à une évaluation par Dp4¹⁶⁶

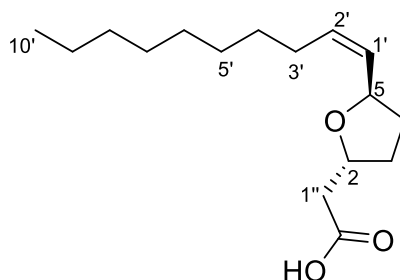


Figure 125 : Hypothèse sur la stéréochimie relative du tétrahydrofurane du composé **11**

2.3 Étude chimique de l'actinomycète *Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13

2.3.1 Informations sur la souche *Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13 et ses molécules.

Les actinobactéries du genre *Nocardia* sont des agents pathogènes opportunistes qui causent des maladies infectieuses de type « nocardiose » au niveau des poumons, de la peau, etc. Ces bactéries existent sous forme saprophyte dans des habitats aquatiques et terrestres¹⁶⁷.

¹⁶⁴ Mihailović, et al., *Tetrahedron*, **1967**, 23, 215-226.

¹⁶⁵ Ibid.

¹⁶⁶ Ermanis, et al., *Org Biomol Chem*, **2019**, 17, 5886-5890.

¹⁶⁷ Komaki, et al., *BMC Genomics*, **2014**, 15, 323.

Au-delà de la production de métabolites possédant diverses activités biologiques telles que des activités antimicrobienne, antitumorale, antioxydante et immunosuppressive, les bactéries du genre *Nocardia* sont également capables de dégrader ou de convertir des hydrocarbures toxiques, des polymères naturels ou synthétiques et d'autres polluants environnementaux. Ces bactéries sont donc très intéressantes dans le milieu académique et industriel ces dernières années¹⁶⁸. Un exemple de la dégradation d'un polluant hydrocarbure polycyclique aromatique par la souche *Nocardia otitidiscaviarum* TSH1, la naphthalène, a été montré par M. Zeinali *et al.*¹⁶⁹

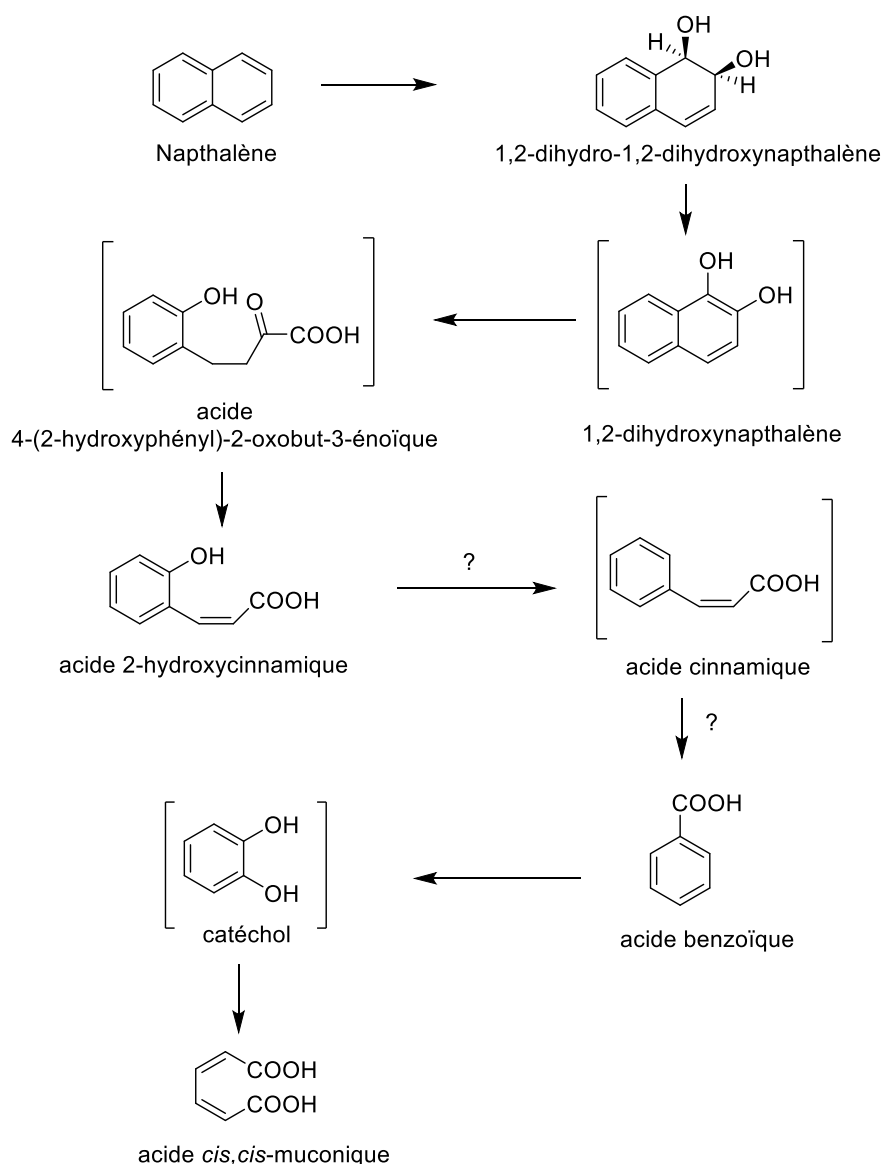


Figure 126 : Mécanisme de dégradation de la naphthalène par la souche *Nocardia*

¹⁶⁸ Luo, *et al.*, *Environmental Microbiology*, **2014**, 16, 29-48.

¹⁶⁹ Zeinali, *et al.*, *Chemosphere*, **2008**, 72, 905-9.

otitidiscaviarum TSH1 (figure reprise *in extenso* de l'article de Zeinali, et al.¹⁷⁰. Les composés entre crochets n'ont pas été détectés dans l'extrait de culture de la souche.

En cherchant les molécules produites par la souche *Nocardia otitidiscaviarum* dans la base de données DNP®, un seul résultat a été trouvé. La molécule HS-6 (**Figure 127**) a été isolée de *Nocardia otitidiscaviarum* en 1990 et a montré une activité sur les bactéries à Gram positif, une levure et différents types de champignons comme *Aspergillus flavus*, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium expansum* et *Candida krusei* à des concentrations entre 0,78 et 1,56 µg/ml¹⁷¹.

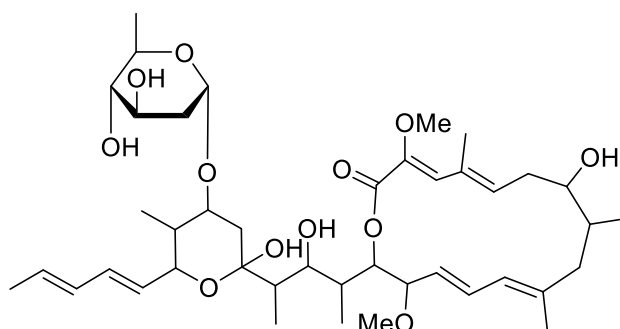


Figure 127 : Structure de la molécule HS-6, isolée à partir de *Nocardia otitidiscaviarum*

2.3.2 Réseaux moléculaires de la souche *Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13

- Réseau moléculaire de la souche cultivée à petite échelle (pour la priorisation)

Grâce à l'utilisation du réseau moléculaire, la souche *Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13 a été sélectionnée car elle produisait des *clusters* non annotés (**Figure 128**).

¹⁷⁰ Ibid.

¹⁷¹ Mikami, et al., *Mycopathologia*, **1990**, 112, 113-8.

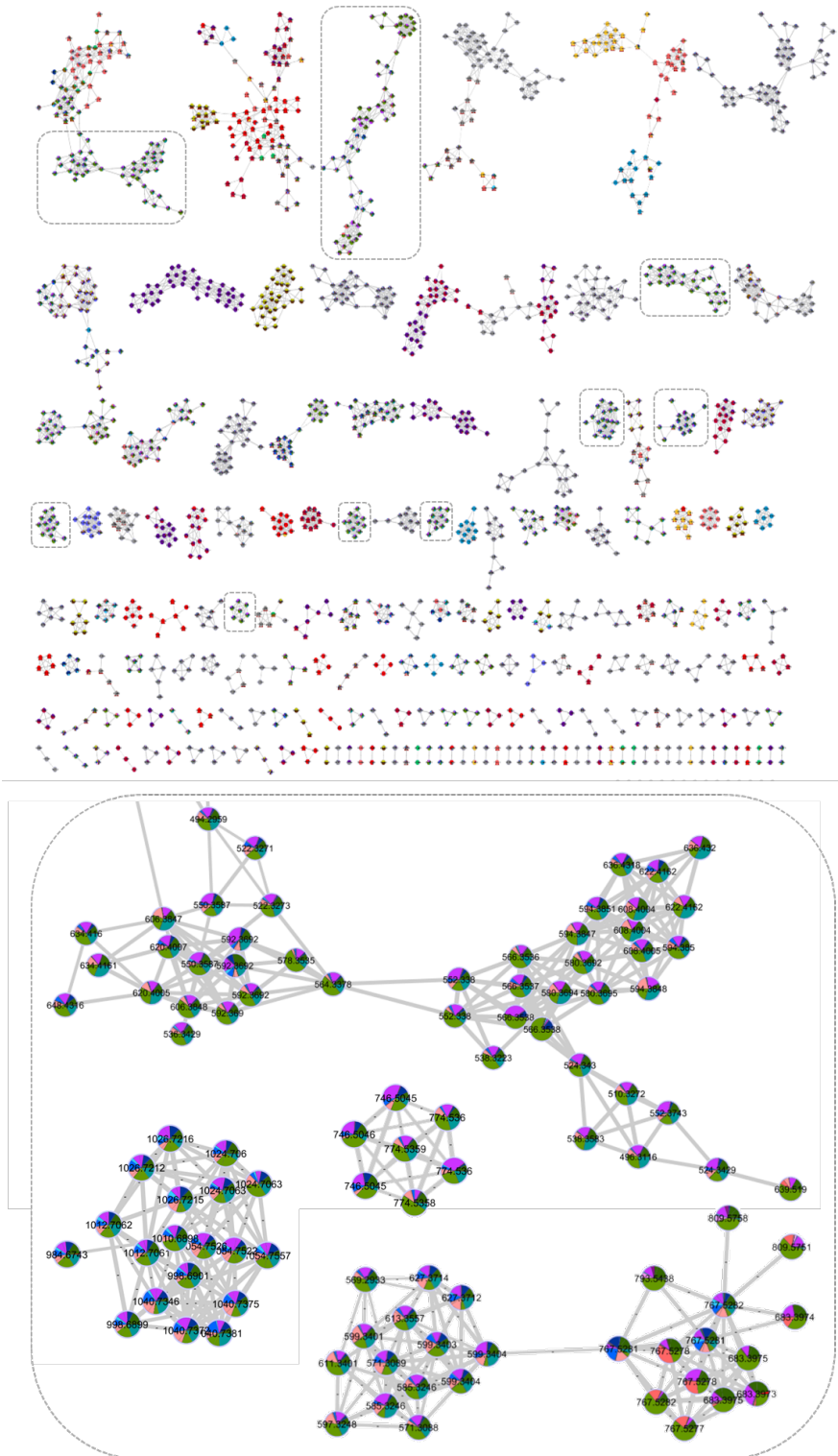


Figure 128 : Le réseau moléculaire de la souche *Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13 avec quelques *clusters* non annotés. Les différentes couleurs des nœuds correspondent à différentes souches d'actinobactéries possédant la même morphologie que la souche 20-S13

- Réseau moléculaire de la souche cultivée à plus grande échelle pour une étude approfondie du métabolome

Le réseau moléculaire des extraits de la souche obtenus par différentes conditions de culture a été réalisé. L'extrait à l'acétate d'éthyle des résines issues de la culture liquide (**LSF**) a été étudié afin d'isoler les composés d'intérêt.

- a. Les composés produits par les actinomycètes du genre *Streptomyces*, trouvés également chez une souche du genre *Nocardia*

L'analyse du chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la culture **LSF** met en évidence deux produits majoritaires ($m/z = 445,1134$, $[M+H]^+$ et $m/z = 429,1187$, $[M+H]^+$) (**Figure 129**). L'annotation de ces produits par GNPS et NAP indique que ces deux molécules sont de la famille des entérocinés. Ce sont des polyacétates antimicrobiens isolés à partir de plusieurs espèces de *Streptomyces*^{172,173}. Ces molécules sont des métabolites spécialisés ayant une faible masse moléculaire et ne doivent pas être confondues avec les « entérocinés » qui sont des bactériocines produites par les bactéries *Enterococcus* spp.^{174,175}.

¹⁷² Miyairi, et al., *J Antibiot (Tokyo)*, **1976**, 29, 227-35.

¹⁷³ Saurav, et al., *Natural Product Research and Development*, **2014**, 1216-1220.

¹⁷⁴ Casaus, et al., *Microbiology*, **1997**, 143 (Pt 7), 2287-2294.

¹⁷⁵ Wu, et al., *Molecules*, **2022**, 27, 2258.

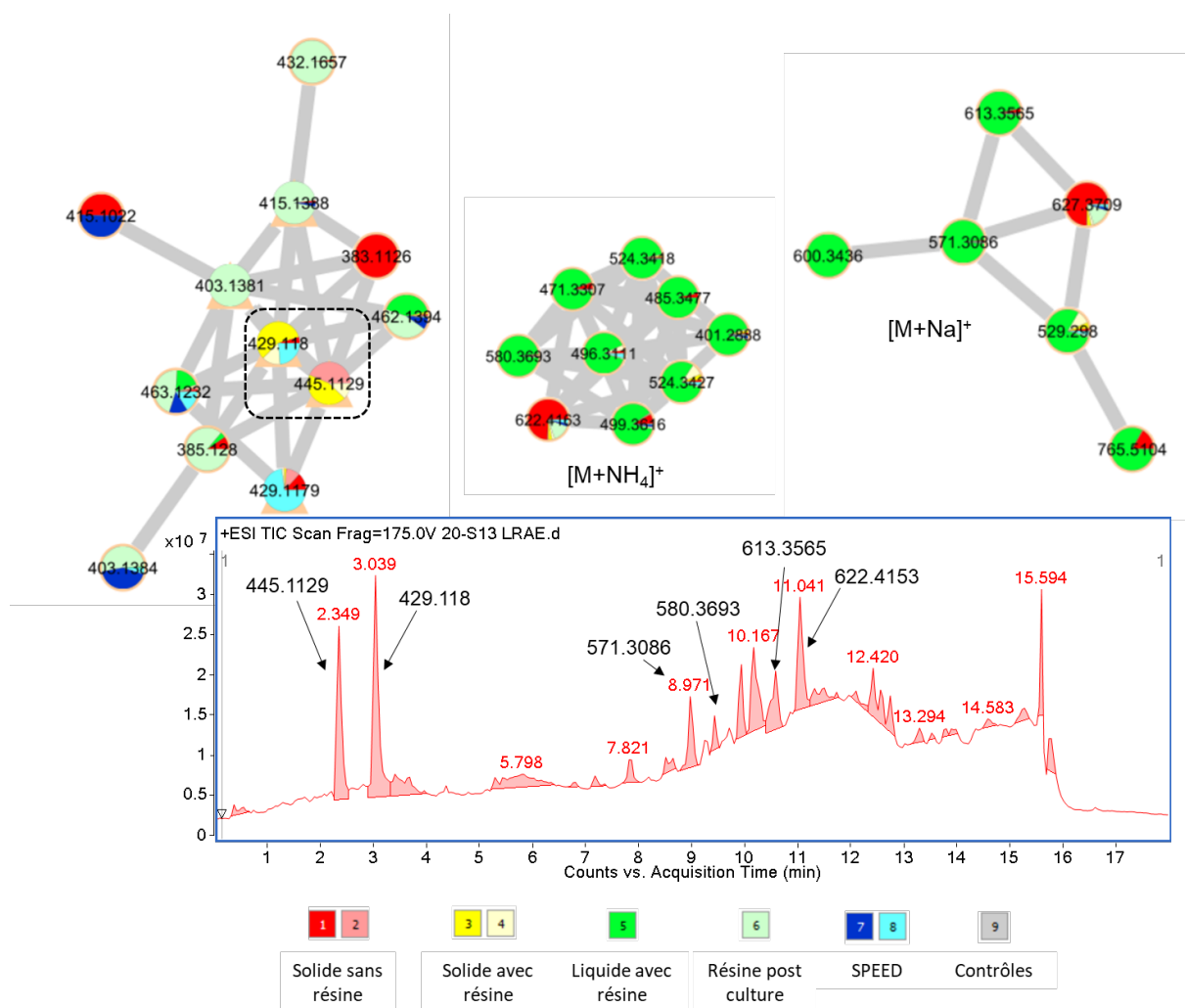


Figure 129 : Chromatogramme LC-MS (TIC-ESI +) de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche 20-S13 cultivée en milieu liquide (en bas) et les *clusters* d'intérêt du réseau moléculaire, générés à partir des extraits bruts de la souche cultivée sous différentes conditions. Dans cette figure, 3 *clusters* ont été mentionnés : un *cluster* contenant les molécules majoritaires de l'extrait, annotés comme des entérocines par GNPS et par NAP ; un *cluster* avec des adduits NH_4^+ et un cluster avec des adduits Na^+ de la même molécule. L'extrait à l'acétate d'éthyle de la culture liquide est représenté par la couleur vert pomme.

L'exploitation des données HRMS des ions à $m/z = 445,1129$ et $m/z = 429,1181$ a permis de proposer les formules brutes $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ et $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_9$, respectivement. L'analyse des données spectrales RMN ^1H et ^{13}C de ces deux molécules ont permis de confirmer qu'elles correspondent à l'entérocine (ou vulgamycine) et la déoxy-entérocine (**Figure 130**)¹⁷⁶. La configuration absolue de la (-) entérocine¹⁷⁷ a été

¹⁷⁶ Cowled, *et al.*, *Org Biomol Chem*, **2020**, *18*, 5879-5890.

¹⁷⁷ La (-)entérocine vient d'une source naturelle contrairement à la (+)entérocine qui est un produit synthétique

publiée récemment par l'équipe de Thorsten Bach¹⁷⁸.

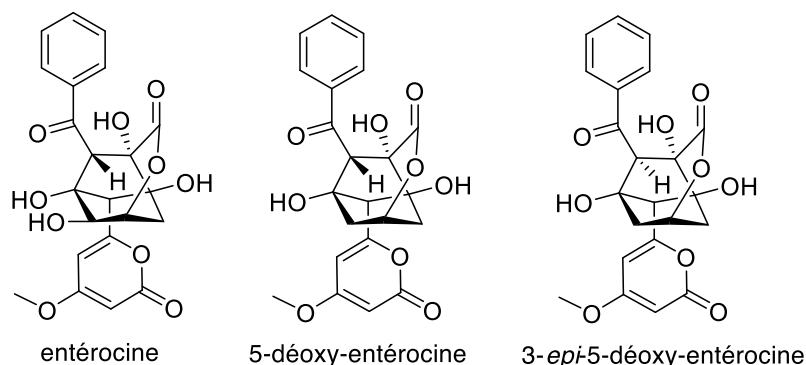


Figure 130 : Structure de l'entécocine et ses dérivés.

b. Isolement ciblé des molécules dans les *clusters* non annotés

L'analyse des informations émanant des réseaux moléculaires des extraits acétate d'éthyle de la souche 20-S13, nous ont conduits à cibler les molécules appartenant aux clusters des adduits NH_4^+ et Na^+ (les molécules éluées entre 8,9 et 12,4) (**Figure 129**). Les molécules de ces clusters ne présentent aucune annotation dans le réseau moléculaire. De plus, les formules brutes générées à partir des masses exactes de ces molécules n'ont pas donné de « *hits* » dans les bases de données de DNP®. Par conséquent, nous avons décidé de les isoler et de les identifier.

Deux nouvelles molécules ont été isolées à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la condition **LSF** (composés **12** et **13**). Les m/z de ces deux entités n'apparaissent pas sur le réseau moléculaire (composé **12** à $m/z = 510,3269$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ et $515,2824$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et composé **13** à $m/z = 627,3716$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $622,4168$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$) en raison de leur faible quantité dans l'extrait.

Cependant, elles sont potentiellement des analogues des molécules représentées dans les *clusters* de la **Figure 129** car elles ont des profils de masse avec des adduits similaires ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$). De plus, nous avons observé des fragmentations similaires entre les spectres SM/SM de l'ion à $m/z = 622,4153$ ($\text{Tr} = 11,04$) dans le cluster des ions $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ et du composé **13** ($m/z 622,4168$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $\text{Tr} = 12,01$) (**Figure 131**), suggérant que ces deux molécules sont potentiellement des isomères.

¹⁷⁸ Koser, et al., *Organic Letters*, **2022**, 24, 6903-6907.

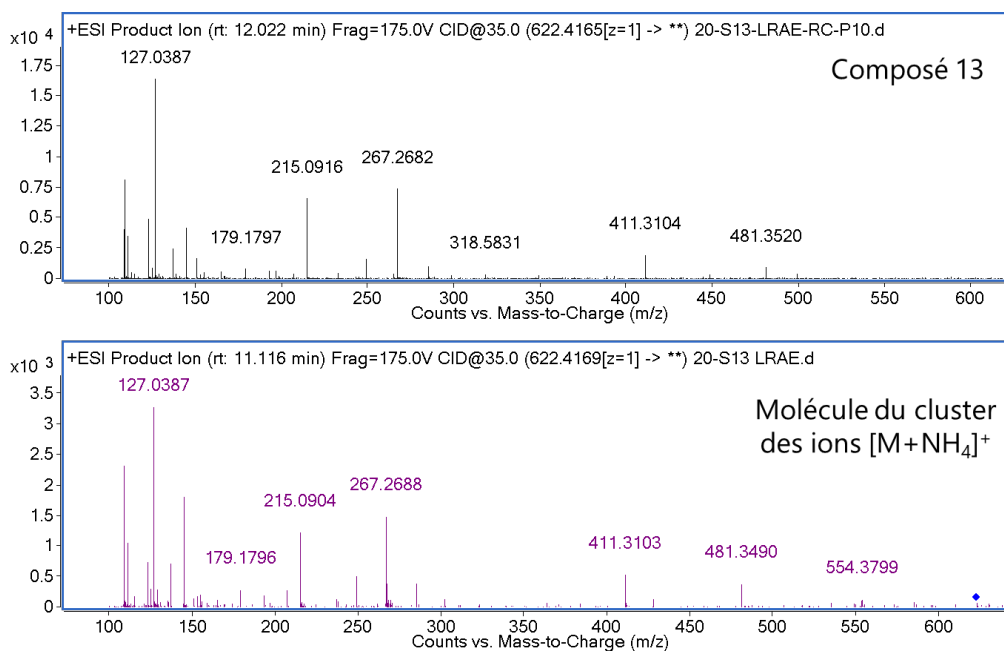


Figure 131 : Comparaison des spectres SM/SM du composé **13** et la molécule présente dans le cluster des ions $[M+NH_4]^+$

- **Élucidation structurale du composé 12**

La mesure de spectrométrie de masse haute résolution à $m/z = 510,3269$ $[M+NH_4]^+$ et $515,2824$ $[M+Na]^+$ du composé **12** donne la formule brute $C_{24}H_{44}O_{10}$, ce qui correspond à trois insaturations (**Figure 132**, **Figure 133**). En cherchant cette formule brute dans les bases de données du DNP®, aucun résultat n'a été obtenu.

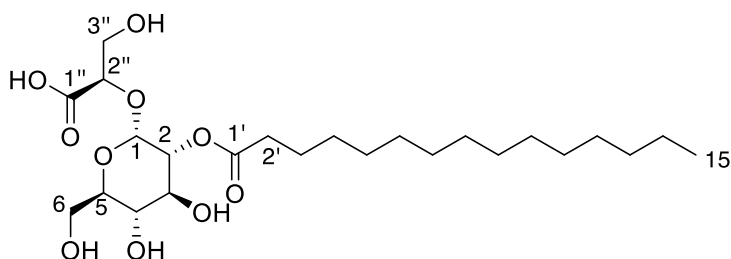


Figure 132 : Structure du composé **12**

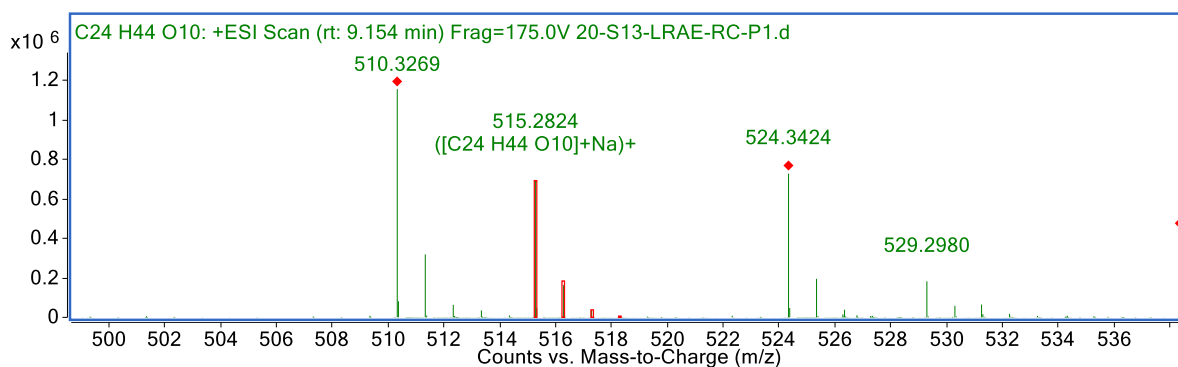


Figure 133 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **12**.

En inspectant le spectre RMN ^1H du composé **12**, nous avons pu observer rapidement la présence d'une longue chaîne aliphatique indiquée par des signaux de protons entre 1,28 et 1,30 ppm et un méthyle à 0,90 ppm.

Le proton du méthine à $\delta_{\text{H}} = 5,12$ ppm (H-1) ainsi que l'ensemble des protons entre 3 et 5 rappellent les signaux caractéristiques d'un sucre.

Les corrélations du spectre RMN ^1H - ^1H COSY permettent de déterminer les couplages entre les protons voisins du proton à $\delta_{\text{H}} = 5,12$ ppm. Les protons des autres méthines dans cette sous-structure sont également déblindés, indiquant qu'ils sont portés par les carbones porteurs du groupement de l'hydroxyle (**Figure 134**).

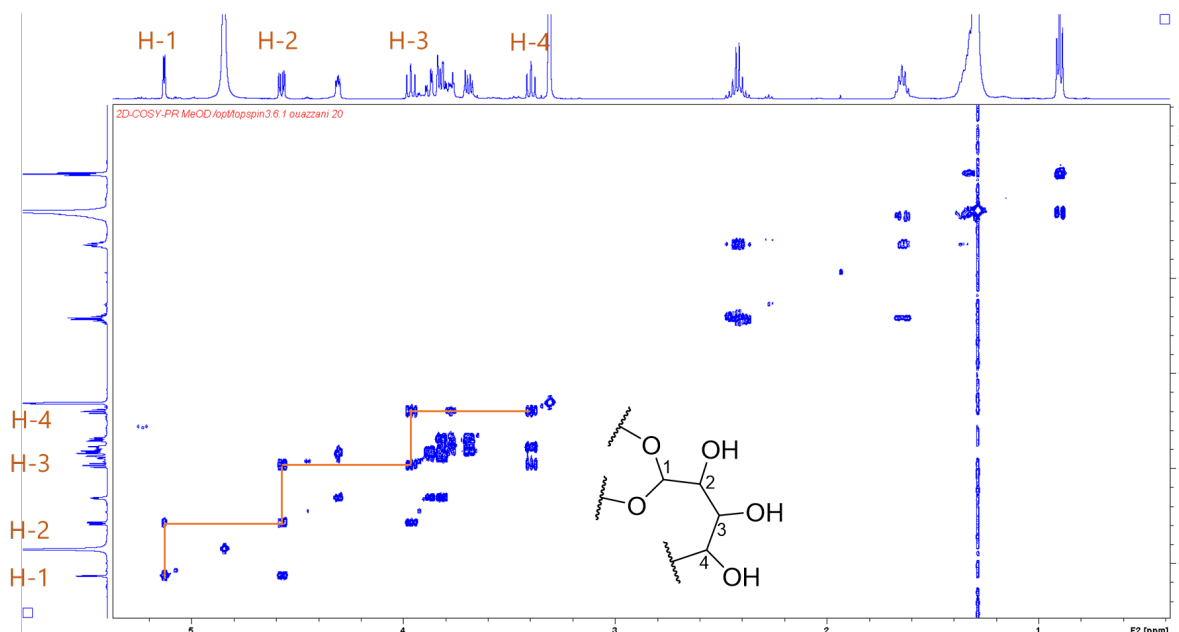


Figure 134 : Détails de corrélations du spectre ^1H - ^1H COSY du composé **12** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

Les corrélations entre les protons H-4 et H-5 ; H-5 et H-6a/6b en ^1H - ^1H COSY

ont permis d'établir le système de spin relatif à la sous-structure décrite ci-dessus (**Figure 135**).

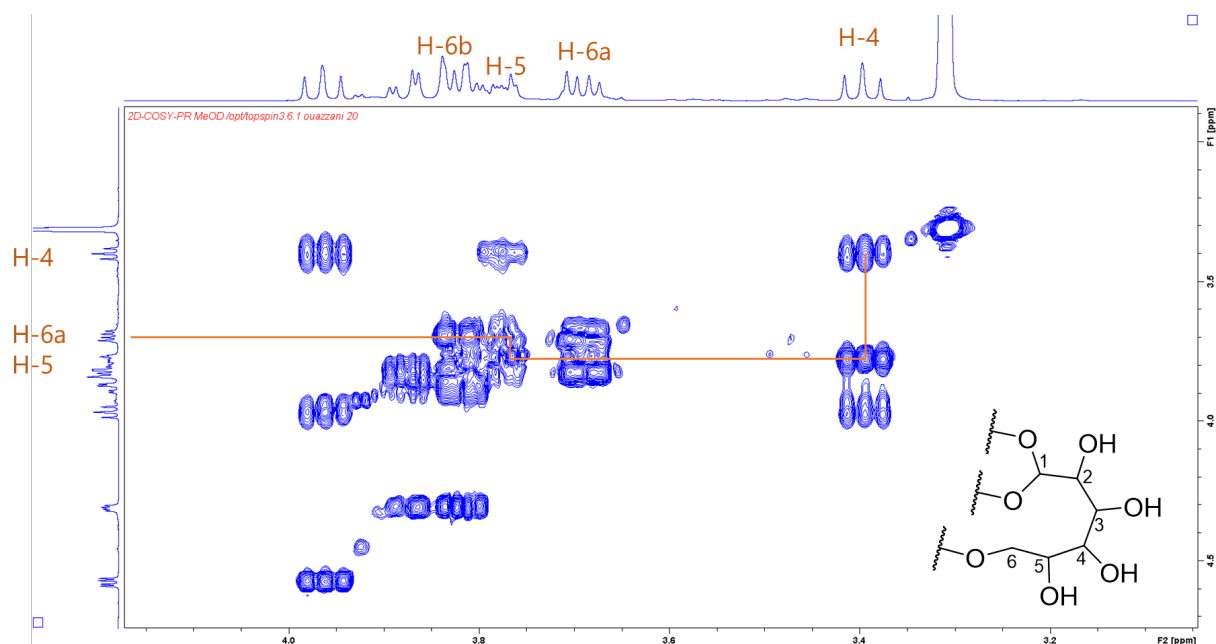


Figure 135: Détails des corrélations du spectre ^1H - ^1H COSY du composé **12** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

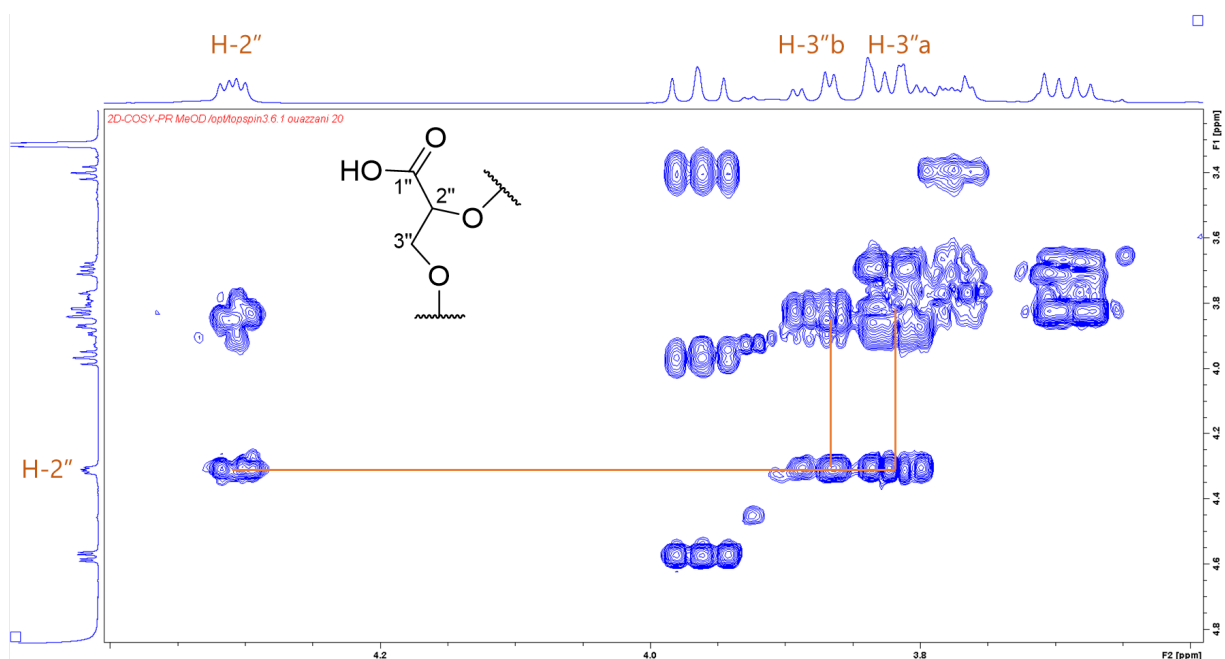


Figure 136 : Détails des corrélations du proton H-2'' du spectre ^1H - ^1H COSY pour le composé **12** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

Le proton du méthine (H-2'') à $\delta_{\text{H}} = 4,31$ ppm corrèle seulement avec les protons H-3a'' à $\delta_{\text{H}} = 3,81$ ppm (1H, m) et H-3b'' à $\delta_{\text{H}} = 3,87$ ppm (1H, m) du méthylène, indiquant une autre sous-structure (**Figure 136**).

Les corrélations HMBC entre le proton du méthine (H-2'') à $\delta_H = 4,31$ ppm et les carbones C-1'' à $\delta_C = 175,5$ ppm (ester ou acide carboxylique), C-1 à $\delta_C = 96,2$ ppm et C-3'' à $\delta_C = 64,0$ ppm nous ont permis de relier les deux structures du composé **12** (**Figure 137**).

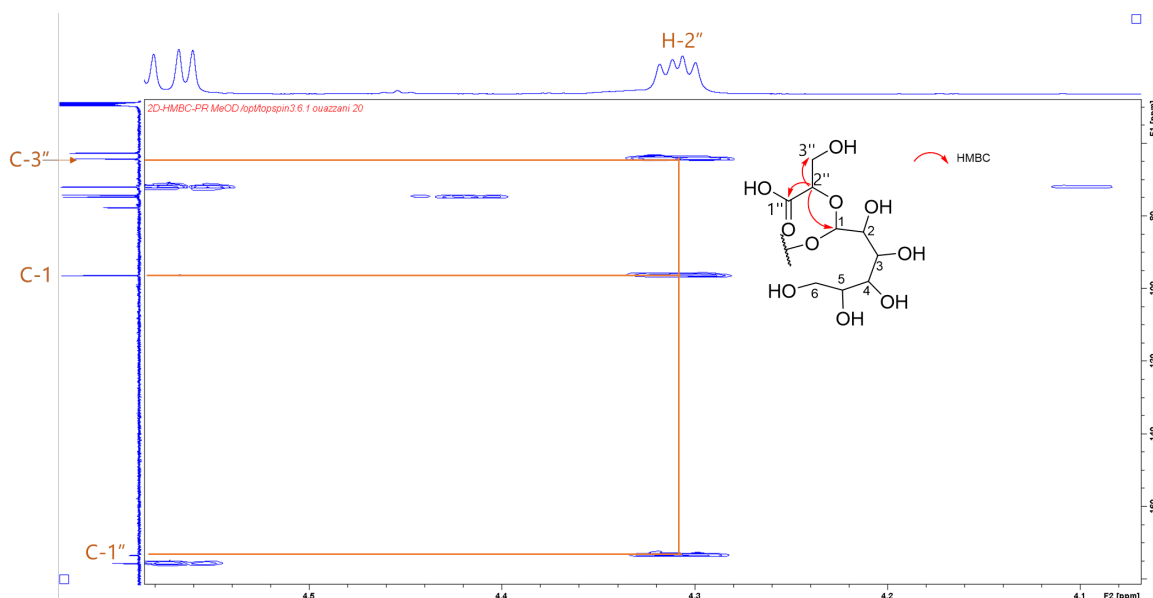


Figure 137 : Détails de corrélations ^1H - ^{13}C HMBC du proton H-2 du composé **12** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

La corrélation ^1H - ^{13}C HMBC entre le proton du méthine (H-5) à $\delta_H = 3,77$ ppm et le carbone C-1 à $\delta_C = 96,2$ ppm nous a permis de finaliser la construction du cycle pyranose (**Figure 138**). Les constantes de couplages du proton anomérique H-1 ($J = 3$ Hz) ainsi que celles observées entre les protons H-1, H-2, H-3, H-4 et H-5 de type axial, axial suggèrent que le cycle pyranose est un alpha-glucose.

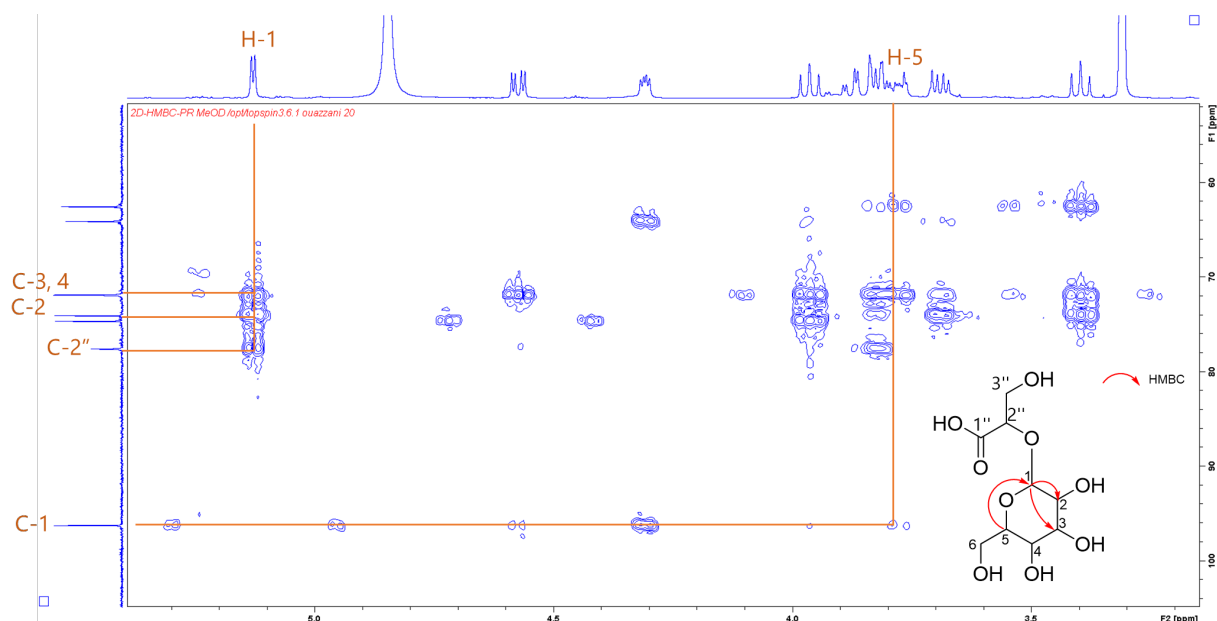


Figure 138 : Détails des corrélations ^1H - ^{13}C HMBC du proton H-1 et H-5 du composé **12** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

Concernant la chaîne aliphatique du composé **12**, nous avons déterminé les corrélations des protons voisins grâce au spectre ^1H - ^1H COSY. Les protons du méthylène H-2a'/H-2b' ($\delta_{\text{H}} = 2,42$ ppm) corrélient avec les protons H-3a'/H-3b', eux-même corréliant avec les protons de la chaîne aliphatique (**Figure 139**).

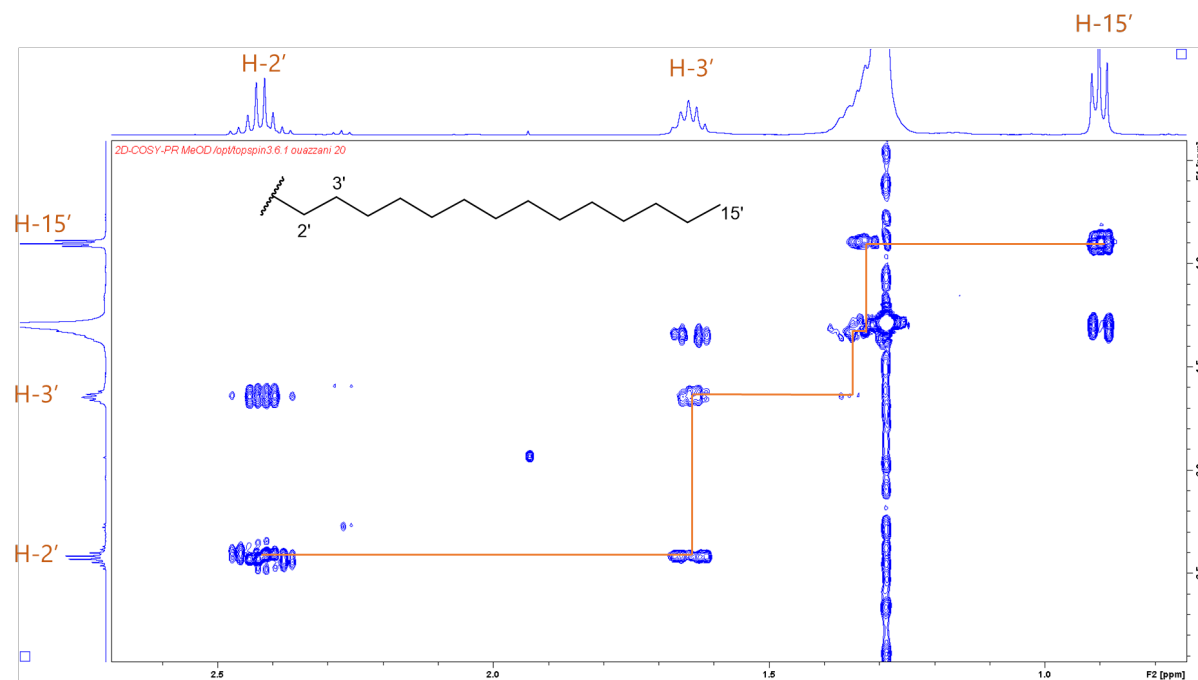


Figure 139 : Détails des corrélations ^1H - ^1H COSY des protons de la chaîne aliphatique du composé **12** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

Les corrélations ^1H - ^{13}C HMBC entre les protons H-2', H-3', H-2 et le carbone de la fonction ester C-1' à $\delta_{\text{C}} = 175,5$ ppm ont permis de relier les sous-structures de la

molécule. La longueur de la chaîne aliphatique a été déduite à partir de la différence entre sa formule brute et celle de la sous-structure (**Figure 140**).

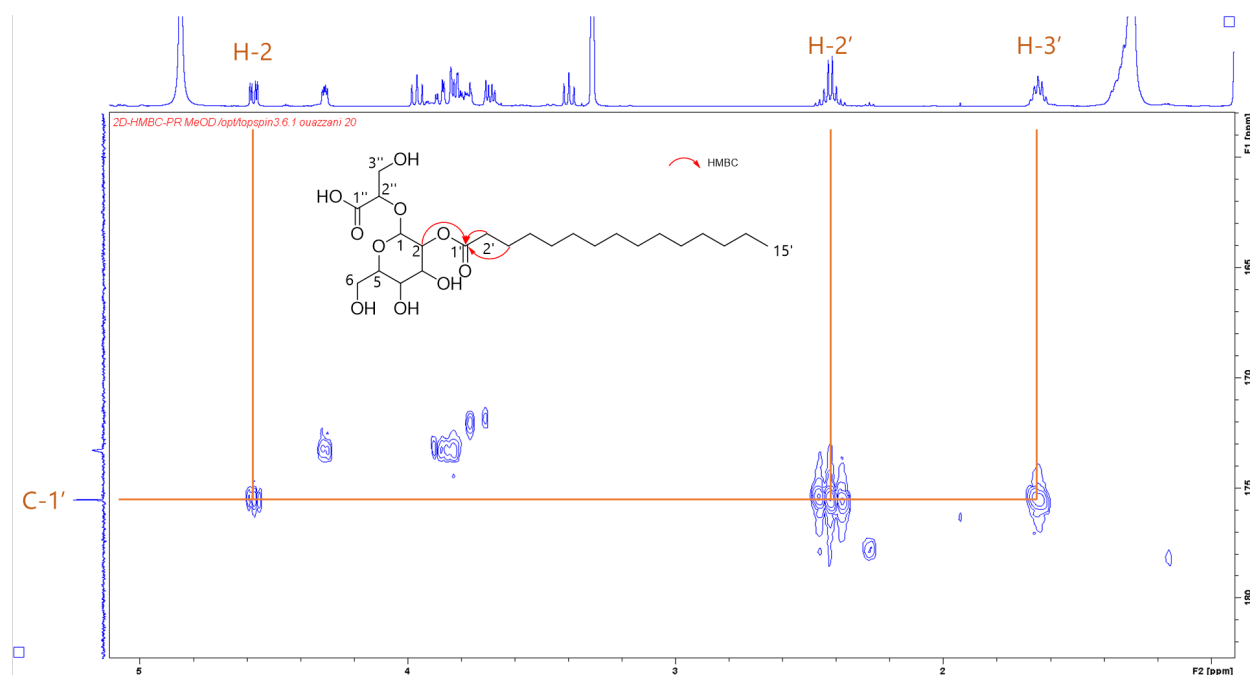


Figure 140 : Détails des corrélations du spectre ^1H - ^{13}C HMBC du composé **12** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

- La multiplicité « anormale » des protons du méthylène H-2a'/H-2b' de la chaîne aliphatique

La multiplicité des protons du méthylène H-2a'/H-2b' est particulièrement intéressante. Nous avons réalisé des expériences supplémentaires en RMN en augmentant le champ magnétique pour expliquer la multiplicité de ce proton. Le spectre du proton RMN ^1H enregistré à 700 MHz a permis d'améliorer la résolution des signaux de ces deux protons (**Figure 141**).

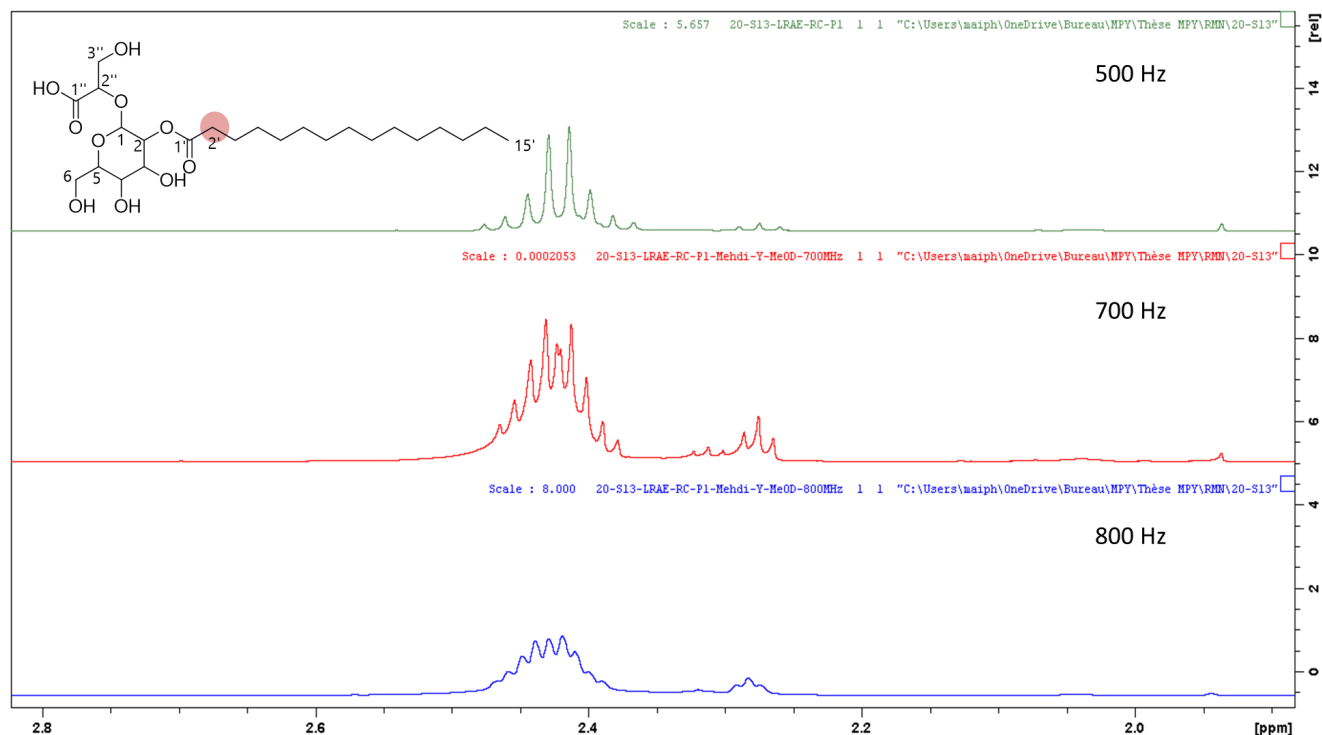


Figure 141 : Superposition des analyses RMN ^1H des protons H-2a'/H-2b' du composé **12** à différents champs magnétiques dans le but de déterminer leurs multiplicités (vert, 500 MHz, rouge 700 MHz et bleu 800 MHz).

Comme indiqué dans la **Figure 140**, les protons H-2a' et H-2b' corrélient entre eux ainsi qu'avec deux protons non équivalents H-3a' et H-3b'. Nous avons supposé que leur multiplicité était un doublet de doublet de doublet. Nous avons utilisé NMRnotebook® pour déterminer la multiplicité ainsi que la constante de couplage de ces deux protons (**Figure 142**).

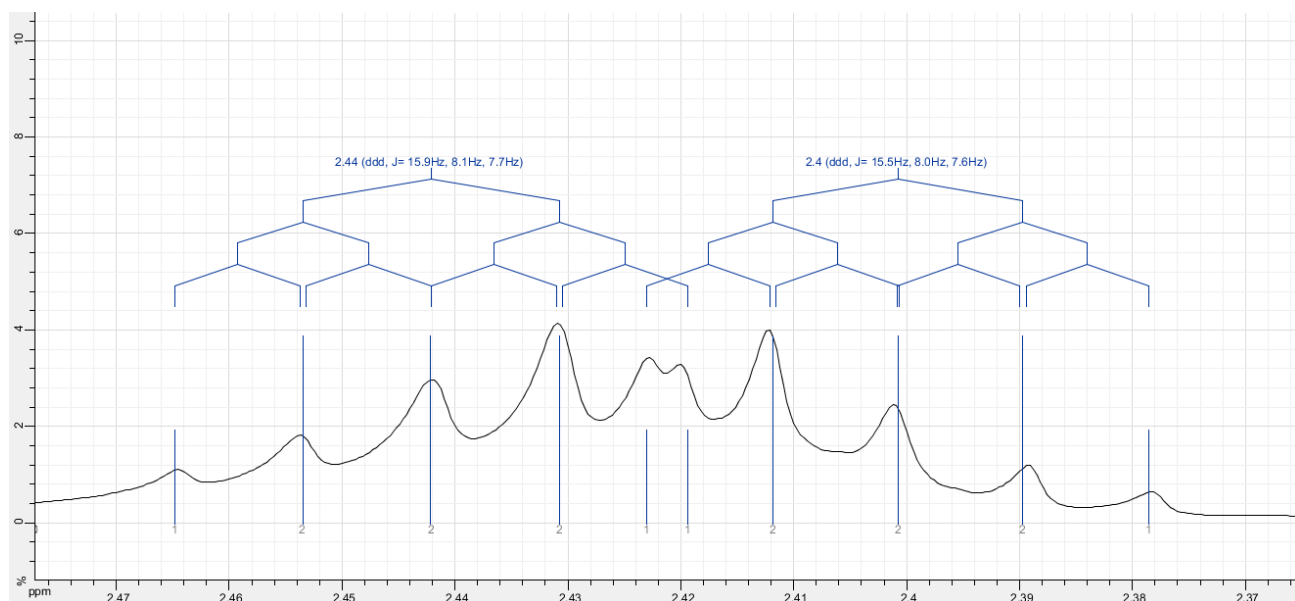


Figure 142 : La multiplicité et la constante de couplage de deux protons H-2a' et H-

2b', déterminés par NMRnotebook®.

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN du proton ^1H , du carbone ^{13}C , de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9. Déplacements chimiques des protons (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) et des carbones (125 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) du composé **12**.

Position	δH , mult, J in Hz	δC (ppm)	HMBC
1''	-	173,5	-
2''	4,31 (1H, dd, $J = 6,1; 3,3$ Hz)	77,5	C-1'', 3'', 1
3''	3,81 (1H, m) 3,87 (1H, m)	64,0	C-1'', 2''
1	5,12 (1H, d, $J = 3,6$ Hz)	96,2	C-2, 3, 4, 2''
2	4,57 (1H, dd, $J = 10,1; 3,6$ Hz)	74,6	C-1, 3, 4, 1'
3	3,96 (1H, dd, $J = 9,8; 9,2$ Hz)	71,8	C-4, 5
4	3,39 (1H, dd, $J = 9,6; 9,4$ Hz)	71,9	C-3, 5, 6
5	3,77 (1H, m)	74,0	C-1, 4, 6
6	3,69 (1H, dd, $J = 11,8; 5,7$ Hz) 3,82 (1H, m)	62,5	C-5, 4
1'	-	175,5	-
2'	2,40 (1H, ddd, $J = 15,5; 8,0; 7,6$ Hz) 2,44 (1H, ddd, $J = 15,9; 8,1; 7,7$ Hz)	35,1	C-1', 3', 4'
3'	1,64 (2H, m)	25,8	C-1', 2', 4'
4'	1,34 (2H, m)	30,3	C-3'
5'	1,28-1,30 (2H, m)	30,3	-
6'	1,28-1,30 (2H, m)	30,4	-
7'	1,28-1,30 (2H, m)	30,5	-
8'	1,28-1,30 (2H, m)	30,6	-
9'	1,28-1,30 (2H, m)	30,8	-
10'	1,28-1,30 (2H, m)	30,8	-
11'	1,28-1,30 (2H, m)	30,8	-
12'	1,28-1,30 (2H, m)	30,8	-
13'	1,28 (2H, m)	33,1	C-14'
14'	1,31 (2H, m)	23,7	C-13', 15'
15'	0,90 (3H, t, $J = 6,9$ Hz)	14,4	C-13', 14'

- **Élucidation structurale du composé 13**

Les ions à m/z 622,4168 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ et 627,3716 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ du composé **13** (**Figure 143**) donne la formule brute $\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_{11}$, suggérant la présence de quatre insaturations (**Figure 144**). En cherchant cette formule brute dans le DNP®, aucun résultat n'a été obtenu.

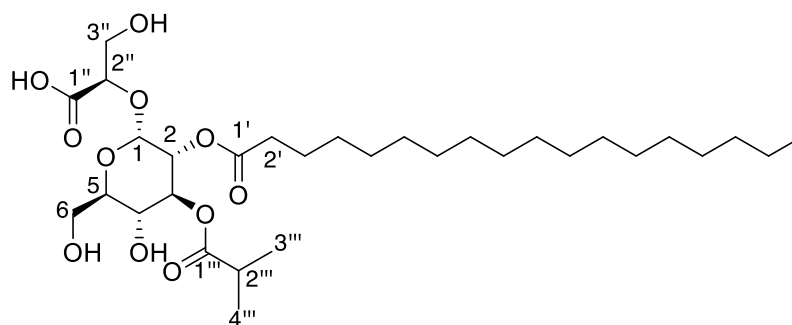


Figure 143 : Structure du composé **13**.

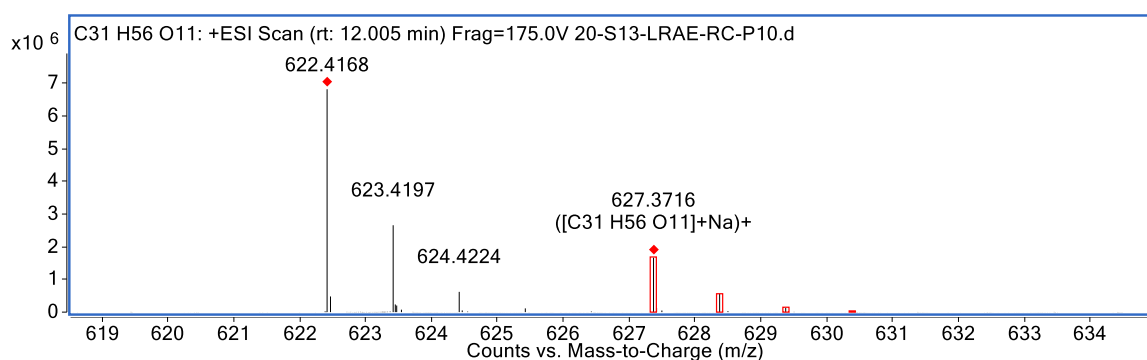


Figure 144 : Spectre HR-ESIMS en mode positif du composé **13**

Les composés **12** et **13** présentent des signaux similaires, suggérant des molécules analogues (**Figure 145**). Les différences principales entre ces deux composés sont la présence de deux méthyles ($\delta_{\text{H}} = 1,15$ et $1,17$ ppm) et un méthine ($\delta_{\text{H}} = 2,59$ ppm) de plus dans le composé **13**.

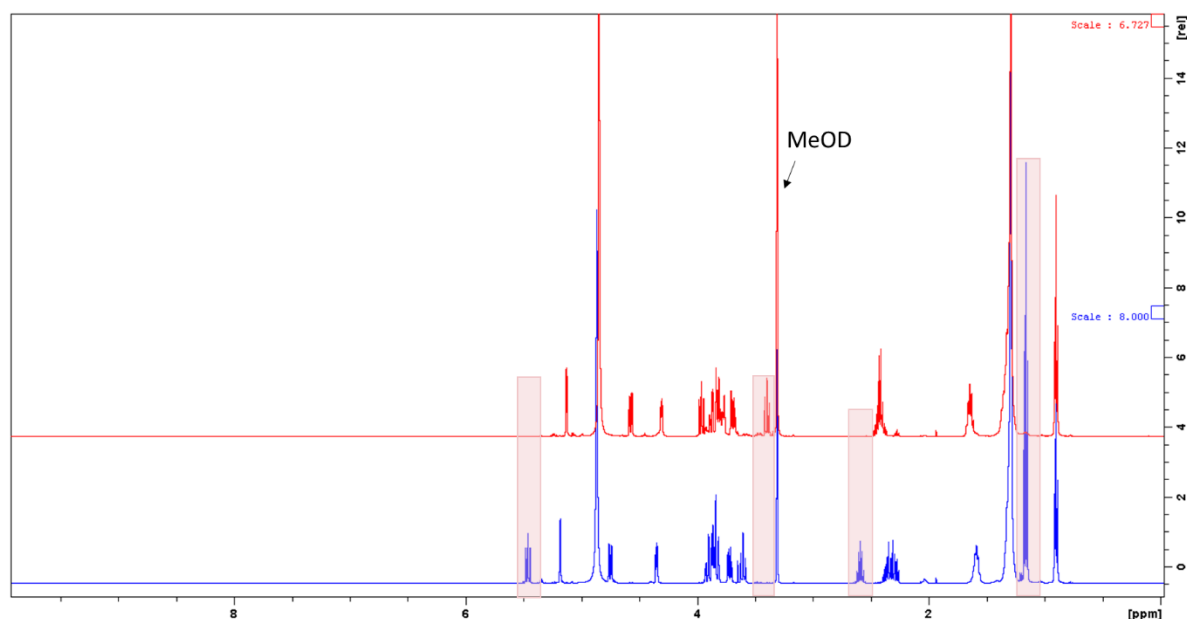


Figure 145 : Superposition des spectres de proton ^1H RMN du composé **12** (rouge, 500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) et composé **13** (bleu, 500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

La structure de la molécule **13** a été élucidée par l'étude de ses spectres RMN. De plus, l'obtention de cristaux par évaporation d'un mélange dichlorométhane, méthanol et acétonitrile (1 : 1 : 1). Sa structure a été confirmée par une expérience de diffraction aux rayons X. Cette expérience nous a également permis de confirmer que le sucre dans la structure des composés est un alpha-glucose (**Figure 146**).

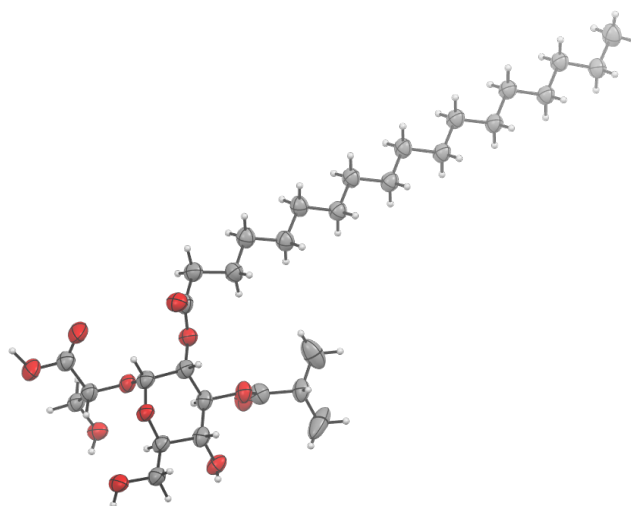


Figure 146 : Représentation ORTEP du composé **13** par diffraction des rayons X

Le proton H-3 associé au carbone porteur de l'hydroxyle dans le composé **12** ($\delta_{\text{H}} = 3,96$ ppm) est plus déblindé dans le spectre RMN ^1H du composé **13** (H-3, $\delta_{\text{H}} = 5,46$ ppm), indiquant qu'une substitution a eu lieu sur cette position (**Figure 147**,

Figure 148).

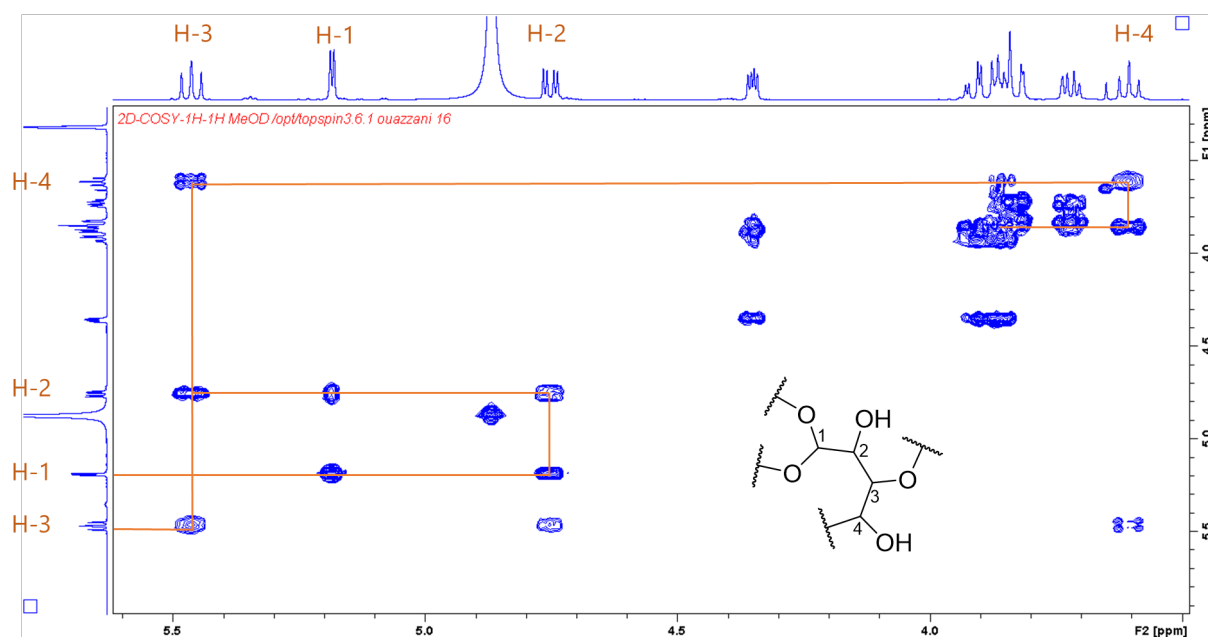


Figure 147 : Détails de corrélations du spectre ^1H - ^1H COSY du composé **13** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$).

Le proton du méthine à $\delta_{\text{H}} = 2,59$ ppm, apparaissant sous la forme d'un sextuplet, indiquant qu'il a six protons voisins : un méthyle à $\delta_{\text{H}} = 1,15$ ppm et un autre méthyle à $\delta_{\text{H}} = 1,17$ ppm (**Figure 148**).

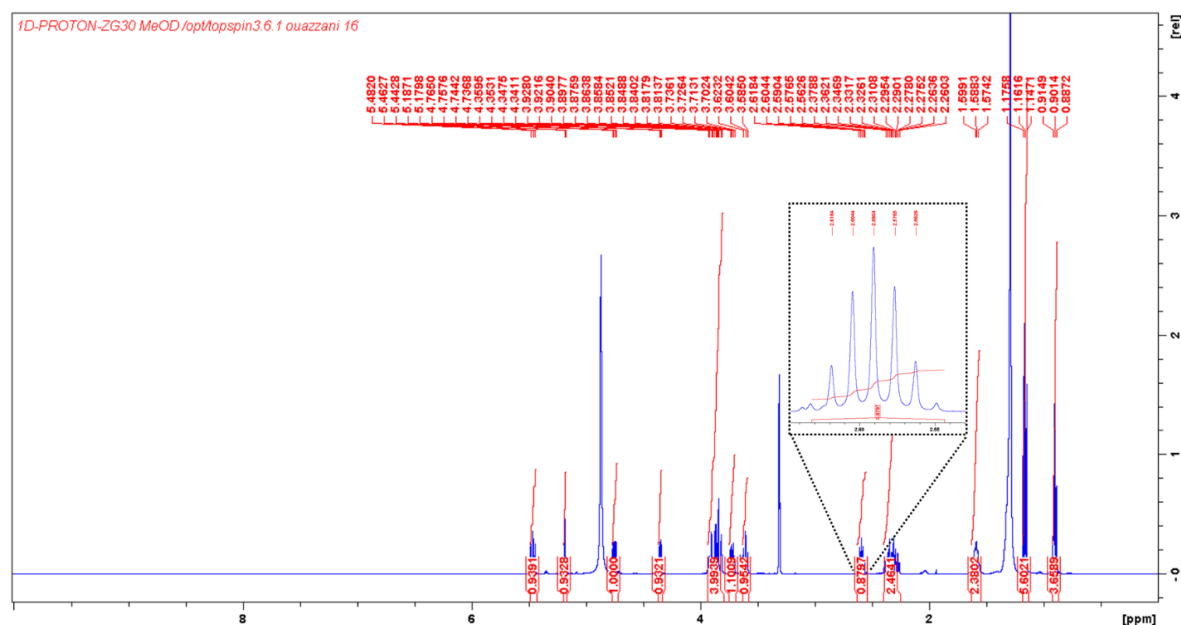


Figure 148 : Spectre de proton RMN ^1H du composé **13** avec l'agrandissement des signaux du méthine à $\delta_{\text{H}} = 2,59$ ppm (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

Nous avons observé une fonction ester ($\delta_{\text{C}} = 178,2$ ppm) supplémentaire dans le composé **13**. Ce groupement ester en position C-1''' corrèle avec les protons H-3,

H-2''', H-3''' et H-4''', confirmant la présence d'un groupement ester isopropylique sur le carbone C-3 (**Figure 149**).

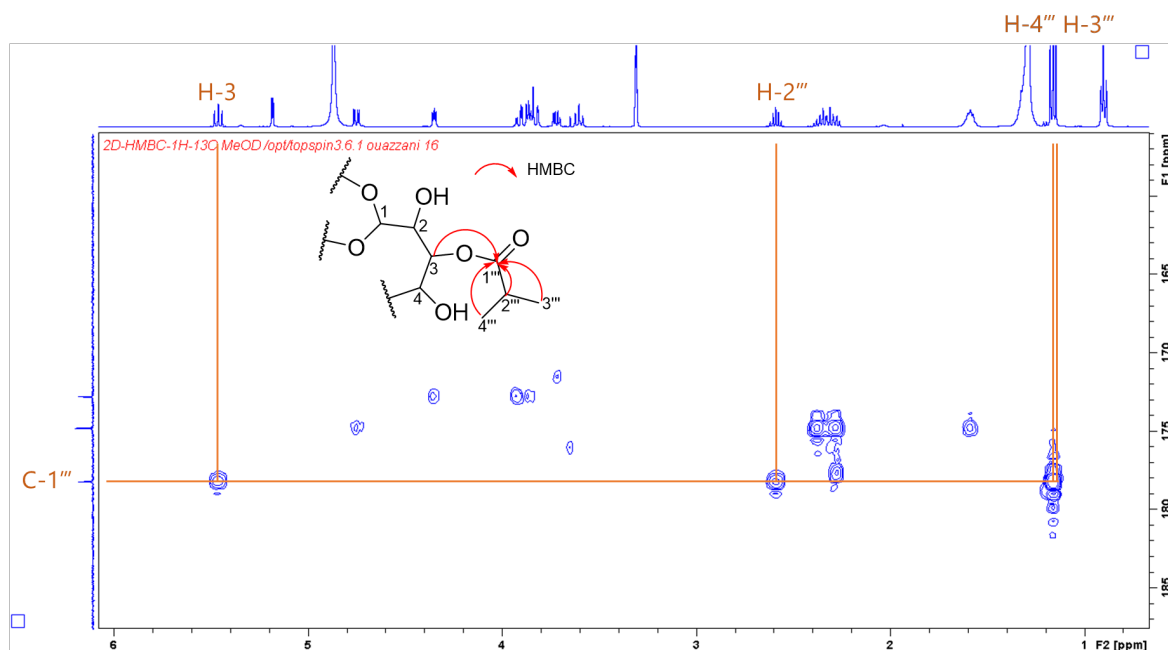


Figure 149 : Détails de corrélations du spectre ^1H - ^{13}C HMBC d'une sous-structure du composé **13** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$)

La longueur de la chaîne aliphatique du composé **13** a été ensuite déterminée en analysant la différence entre la formule brute de la sous-structure et celle du composé (**Figure 150**).

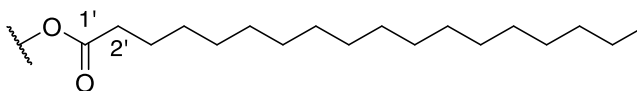


Figure 150 : la chaîne aliphatique du composé **13**

- Clarification de multiplicité du méthylène en position 2'

Nous avons observé le même problème de multiplicité du méthylène en position 2' dans le composé **13**. Le produit a été re-analysé en RMN en augmentant le champ magnétique.

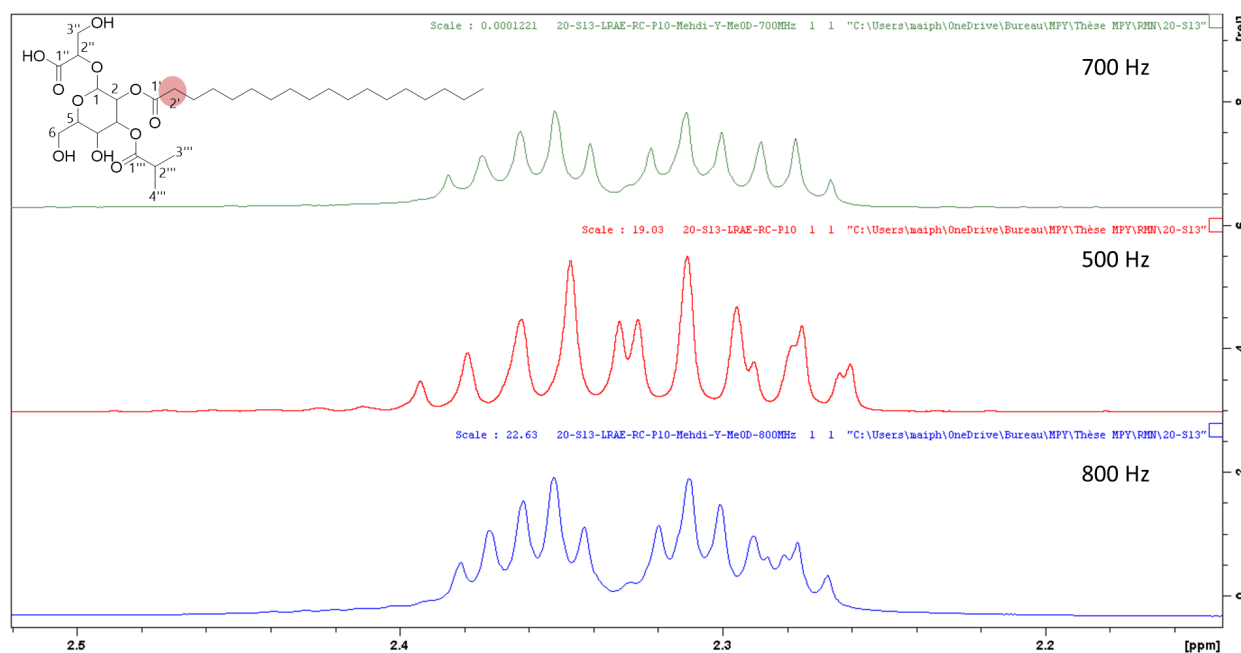


Figure 151 : Superposition des analyses ^1H RMN du proton H-2' du composé **13** à différents champs magnétiques dans le but de déterminer sa multiplicité (vert, 700 MHz, rouge 500 MHz et bleu 800 MHz).

Les signaux du méthylène sont bien séparés en montant en champ magnétique. Ces signaux sont plus écartés dans le composé **13** en comparant à ceux du composé **12**. Cette différence vient probablement de la présence d'un substitué en position C-8 du composé **13** (**Figure 151**).

Nous avons également utilisé NMRnotebook® pour calculer les constantes de couplage de deux protons de ce méthylène et ainsi déterminer sa multiplicité (**Figure 152**). Chacun des protons du méthylène est sous forme de doublet de doublet de doublet comme dans le cas du méthylène du composé **12**.

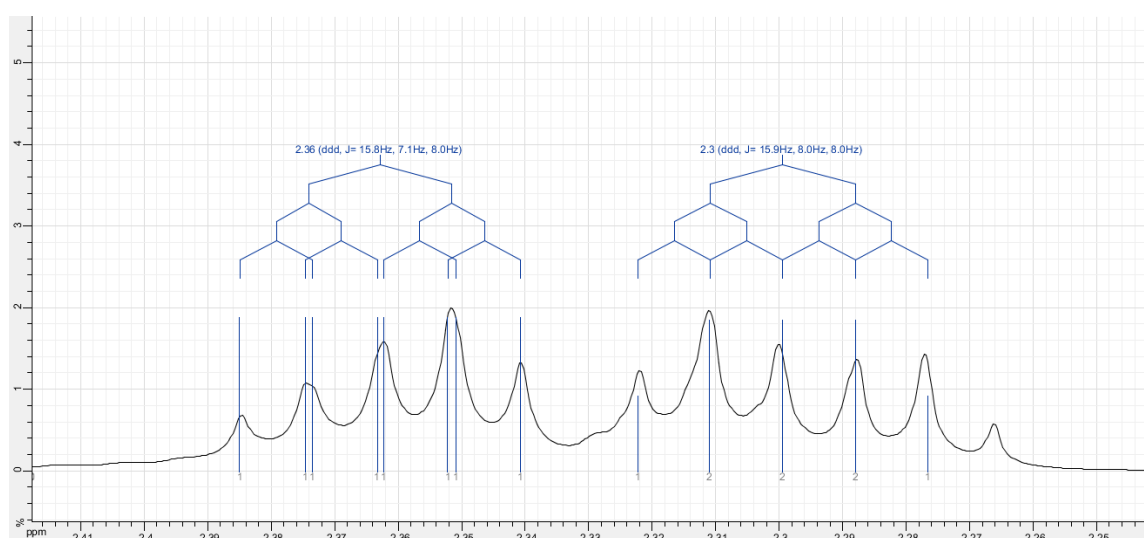


Figure 152 : Multiplicités et constantes de couplage des deux protons H-2a' et H-2b',

déterminés par NMRnotebook® (700 MHz, CH₃OH-d₄)

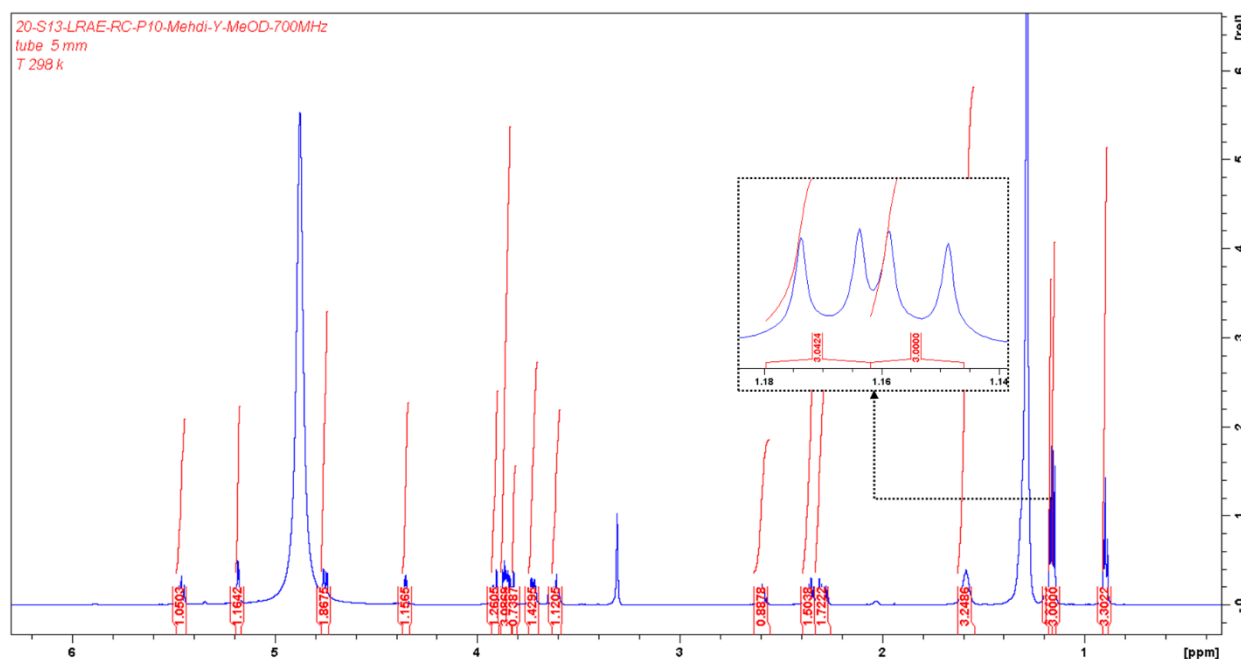


Figure 153 : Spectre de proton RMN ¹H du composé **13** avec agrandissement des signaux de protons de deux méthyles à $\delta_H = 1,15$ ppm (doublet) et à $\delta_H = 1,17$ ppm (700 MHz, CH₃OH-d₄)

Le spectre de proton RMN ¹H du composé **13** en 700 MHz a permis de mettre en évidence la multiplicité de deux méthyles à $\delta_H = 1,15$ ppm (doublet) et à $\delta_H = 1,17$ ppm (doublet). Les signaux de protons de ces deux méthyles se chevauchaient et donnaient un aspect de triplet (effet de toit) dans le spectre ¹H RMN enregistré en 500 MHz. Cela montre l'importance du champ magnétique du spectromètre dans l'enregistrement et l'interprétation des spectres RMN (**Figure 153**).

Les données issues de l'interprétation des spectres RMN du proton ¹H, du carbone ¹³C, de l'HSQC et de l'HMBC sont résumées dans le **Tableau 10**.

Tableau 10. Déplacements chimiques des protons (500 MHz, CH₃OH-d₄) et des carbones (125 MHz, CH₃OH-d₄) du composé **13**

Position	δ_H , mult, J in Hz	δ_C (ppm)	HMBC
1	5,18 (1H, d, J = 3,8 Hz)	96,0	C-2, 3, 2''
2	4,75 (1H, dd, J = 10,3; 4,8 Hz)	72,4	C-1', 3
3	5,47 (1H, dd, J = 9,6; 9,4 Hz)	73,3	C-1''', 2, 4
4	3,60 (1H, dd, J = 9,6; 9,4 Hz)	69,6	C-3, 5, 6
5	3,85 (1H, m)	74,0	C-4
6	3,72 (1H, dd, J = 11,5; 3,3 Hz) 3,82 (1H, m)	62,0	C-5

1''	-	172,7	-
2''	4,35 (1H, dd, $J = 6,1; 3,3$ Hz)	77,2	C-1'', 3'', 1
3''	3,86 (1H, m) 3,91 (1H, m)	63,9	C-1'', 2
1'	-	174,7	-
2'	2,30 (1H, ddd, $J = 15,9; 8,0; 8,0$ Hz) 2,36 (1H, ddd, $J = 15,8; 8,0; 7,1$ Hz)	34,9	C-1', 3', 4'
3'	1,59 (2H, m)	25,6	C-1', 2', 4'
4'	1,28-1,33 (2H, m)	30,2	-
5'	1,28-1,33 (2H, m)	30,4	-
6'	1,28-1,33 (2H, m)	30,4	-
7'	1,28-1,33 (2H, m)	30,5	-
8'	1,28-1,33 (2H, m)	30,7	-
9'	1,28-1,33 (2H, m)	30,7	-
10'	1,28-1,33 (2H, m)	30,7	-
11'	1,28-1,33 (2H, m)	30,7	-
12'	1,28-1,33 (2H, m)	30,7	-
13'	1,28-1,33 (2H, m)	30,7	-
14'	1,28-1,33 (2H, m)	30,7	-
15'	1,28-1,33 (2H, m)	30,7	-
16'	1,28-1,33 (2H, m)	33,1	-
17'	1,31 (2H, m)	23,7	C-16', 18'
18'	0,91 (3H, t, $J = 6,7$ Hz)	14,5	C-16', 17'
1'''	-	178,2	-
2'''	2,59 (1H, sx, $J = 6,9$ Hz)	35,3	C-1''', 3''', 4'''
3'''	1,15 (3H, d, $J = 7,1$ Hz)	19,2	C-1''', 2''', 4'''
4'''	2,17 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	19,6	C-1''', 2''', 3'''

- **Stéréochimie des composés 12 et 13**

La stéréochimie relative du composé **13** a été déterminée par l'expérience de diffraction aux rayons X. Comme les deux molécules sont de la même famille, l'expérience de diffraction aux rayons X des cristaux du composé **13** a ainsi permis de confirmer l'hypothèse sur l'identité du sucre du composé **12** (**Figure 154**).

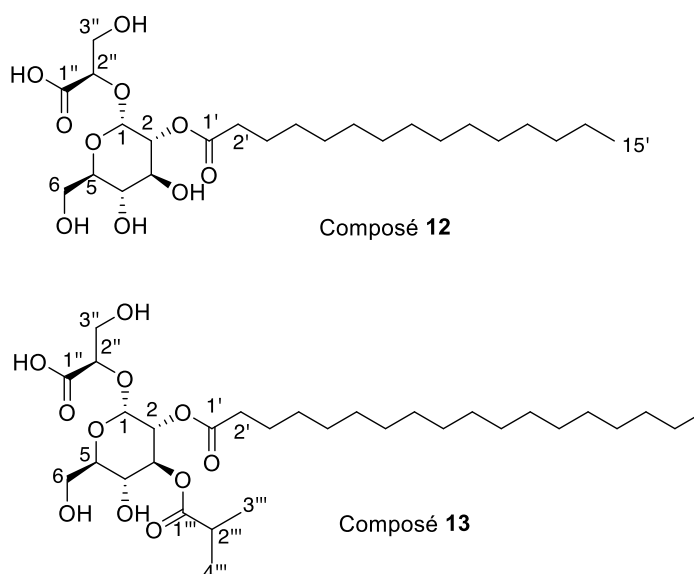


Figure 154 : Stéréochimie relative des composés **12** et **13**

- **Commentaires sur la structure des composés 12 et 13**

Ces deux composés sont constitués de trois parties : un sucre greffé à une chaîne acide gras et un acide glycérique. La recherche de ces molécules dans les bases de données DNP® et Sci-Finder® n'a donné aucun résultat. Nous avons donc cherché les sous-structures de ces molécules.

La recherche de la sous-structure composée du sucre et de l'acide gras sur Sci-Finder® a donné six résultats provenant de produits naturels avec la présence d'une chaîne aliphatique d'une longueur variant de 8 à 18 carbones. Cependant, celle-ci est liée au carbone en position C-1 et non au carbone C-2 comme dans notre molécule.

Sci-Finder® a donné 22 résultats pour la sous-structure composée du sucre et de l'acide glycérique. Ces composés font partie d'une famille appelée « *extremolytes* ». Il s'agit de petites molécules organiques produites par les micro-organismes extrémophiles afin de répondre au stress salin et thermique¹⁷⁹. Comme nos composés contiennent une partie glucose, nous sommes particulièrement intéressés par la molécule dite glucosyl-glycérate. Celle-ci est trouvée chez les cyanobactéries marines et joue un rôle de protection des protéines et des cellules contre les différents types de stress¹⁸⁰. Pour revenir à notre souche (*Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13), qui a été isolée à partir d'une source marine, nous nous permettons de spéculer, ici, que les composés **12** et **13** sont probablement des

¹⁷⁹ Lentzen and Schwarz, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2006**, 72, 623-34.

¹⁸⁰ Becker and Wittmann, *Current Opinion in Biotechnology*, **2020**, 65, 118-128.

produits qui lui permettent de répondre aux stress environnementaux.

- Conclusion du chapitre et analyses critiques

Au travers de l'étude des trois souches de l'échantillon 20 (*Hypocrea lixii* 20-S1, *Emericellopsis microspora* 20-S19 et *Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13), le réseau moléculaire se révèle comme un outil puissant pour recueillir le maximum d'informations sur les familles de molécules produites par les souches et de cibler les molécules potentiellement intéressantes.

Cependant, l'exploration du réseau moléculaire demande un travail manuel intense et un esprit ouvert et critique. Nous avons découvert quelques nouvelles molécules ayant des annotations dans le réseau moléculaire. Pour vérifier la fiabilité des annotations, il est nécessaire de vérifier le score d'annotation ainsi que l'origine de la molécule annotée, si celle-ci est produite par les micro-organismes et/ou par le même genre du micro-organisme en question. Il faut également comparer les spectres SM/SM de la molécule annotée et la molécule concernée pour avoir une idée de leur similarité.

De plus, l'utilisation de plusieurs outils d'annotation est fortement conseillée car cela nous permet de faire ressortir plus d'informations sur l'identité des molécules ainsi que de comparer les annotations entre les outils. Cependant, cela nécessite un traitement manuel important des données.

Certaines molécules minoritaires ne sont pas détectées par le réseau moléculaire car elles n'ont pas été fragmentées dans l'extrait brut en raison de nos paramètres d'acquisition. La fragmentation est réalisée sur les cinq ions les plus intenses détectés dans le spectre SM. Nous pourrions augmenter cette valeur pour pouvoir détecter les composés minoritaires. Cependant, nous serions en face d'un nombre considérable d'informations, y compris des informations peu intéressantes. Il est donc nécessaire de trouver les paramètres optimisés idéaux pour construire un réseau contenant un maximum d'informations utiles. Dans notre cas, nous avons réalisé des réseaux moléculaires regroupant les données SM/SM des fractions avec des extraits bruts afin de maximiser les informations sur le profil chimique des souches. Cela nous a permis de mettre en évidence des molécules minoritaires qui ont été détectées dans les fractions et non dans l'extrait brut.

Le réseau moléculaire nous a permis de cibler des molécules potentiellement intéressantes. Cependant, ces molécules sont souvent très minoritaires dans l'extrait donc très difficiles à obtenir à l'état pur. De ce fait, l'isolement du nouveau produit nécessite énormément d'efforts et de temps.

L'analyse génomique des micro-organismes de l'échantillon 20 est actuellement en cours.

CONCLUSION GÉNÉRALE

-

PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse implique des connaissances et des développements dans plusieurs disciplines : métabolomique, génomique, chimie extractive et analytique et microbiologie. Différentes stratégies de priorisation ont été envisagées (**Figure 155**) :

- Les champignons et les actinomycètes ont été priorisés en début de thèse - et avant les analyses génétiques - par leur morphologie,
- Leur métabolome ont été ensuite étudié par réseaux moléculaires afin de prioriser les souches intéressantes,
- L'utilisation de sondes chimiques pour cibler les molécules d'intérêt et intercepter d'éventuels intermédiaires biosynthétiques par définition transitoire (des polyacétates - par exemple - dans ce projet).

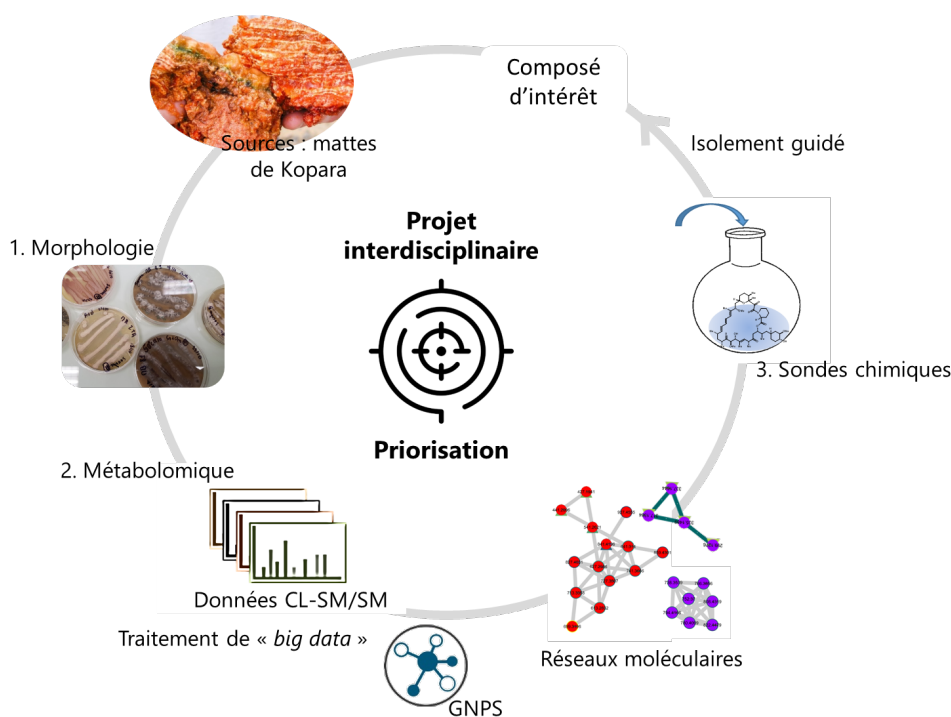


Figure 155 : Différentes stratégies de priorisation utilisé dans ce projet de thèse

La technique des réseaux moléculaires est un outil très puissant dans l'exploration rapide, dans la déréplication et l'annotation de la diversité chimique des micro-organismes. La stratégie de priorisation, fondée sur l'utilisation du réseau moléculaire, nous a permis de prioriser les souches potentiellement intéressantes en se basant sur l'originalité des métabolites produits et sur leurs activités biologiques (dans le cas des micro-organismes de l'échantillon 20). Par conséquent, cette stratégie nous a aidés à gagner du temps en concentrant nos efforts sur l'étude des souches priorisées. À partir de quatre souches priorisées et étudiées dans ce projet, 56

molécules ont été isolées et caractérisées dont 10 nouvelles molécules.

Dans la première partie de l'étude des micro-organismes priorisés par réseaux moléculaires, la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, a été utilisée comme un cas d'étude pour développer et optimiser une nouvelle technologie de culture, appelée « SPEED » (**Figure 156**).

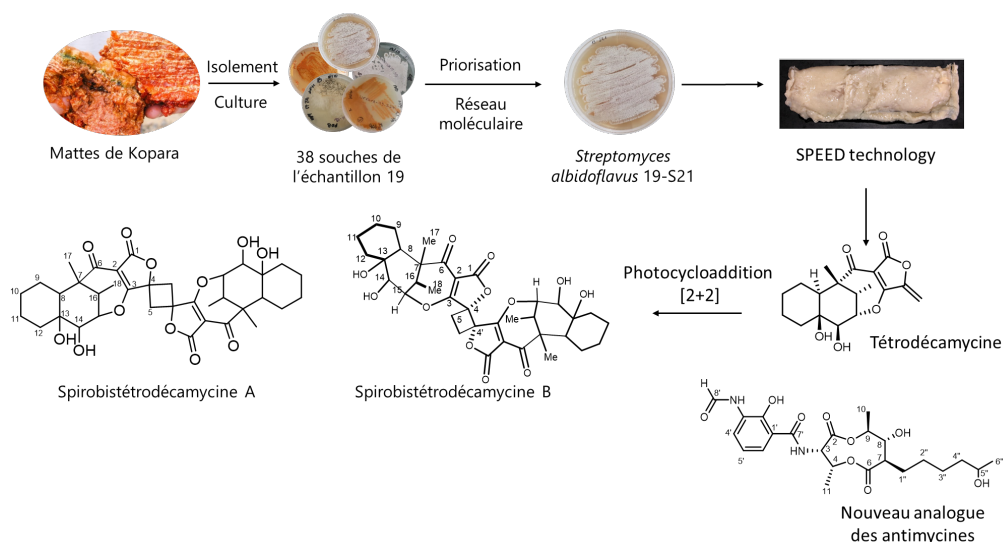


Figure 156 : Résumé des résultats obtenus de la souche *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 et la technique de culture SPEED.

Cette technique de culture a été inventée dans le but de séparer la biomasse de micro-organismes des résines XAD-16, ce qui entraîne, de plus, l'observation de métabolites non-attendus dans les extraits bruts. Nous avons, par l'analyse de plusieurs conditions de culture, observé une production unique de la tétrodécamycine en grande quantité par la souche en conditions « SPEED ». Cette molécule a été isolée, pour la première fois, à partir de la *Streptomyces nashvillensis* MJ885-mF8 en 1994¹⁸¹. Nous avons également isolé plusieurs familles de molécules à partir des extraits obtenus par la technique SPEED dont une nouvelle molécule appartenant à la famille des antimycines (composé **2**).

Nous avons par la suite découvert la formation spontanée des dimères de la tétrodécamycine (spirobistétrodécamycines A et B) par la lumière *via* une réaction photocycloaddition [2+2]. Une expérience d'irradiation de la tétrodécamycine par la lumière artificielle mais mimant des conditions d'ensoleillement intenses a été réalisée afin de confirmer l'hypothèse de la transformation spontanée de la tétrodécamycine en spirobistétrodécamycines A et B. Des calculs DFT sont encore nécessaires pour

¹⁸¹ Tsuchida, *et al.*, *J Antibiot (Tokyo)*, **1994**, 47, 386-8.

finaliser la rédaction de la publication de ces résultats.

Notre stratégie de priorisation basée sur les réseaux moléculaires n'a pas été très satisfaisante dans un premier temps. Nous avons isolé une molécule connue, la tétrodécamycine, car elle n'était pas disponible dans les bases de données du GNPS. L'annotation *in silico* par ISDB n'a pas pu, non plus, l'identifier. Cependant, nous avons réussi à développer une nouvelle technologie innovante et découvert les premiers dimères de la tétrodécamycine, ainsi qu'un nouvel analogue d'antimycine.

À travers des expériences sur les réseaux moléculaires des micro-organismes de l'échantillon 19, nous avons amélioré nos critères de priorisation des micro-organismes de l'échantillon 20. Cette fois, en plus de l'originalité des molécules, les souches priorisées doivent être actives sur les bactéries testées : *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus subtilis*. Pour recueillir le maximum d'informations sur les molécules du réseau moléculaire des souches de l'échantillon 20, nous avons confronté les annotations de deux outils NAP et ISDB (**Figure 157**).

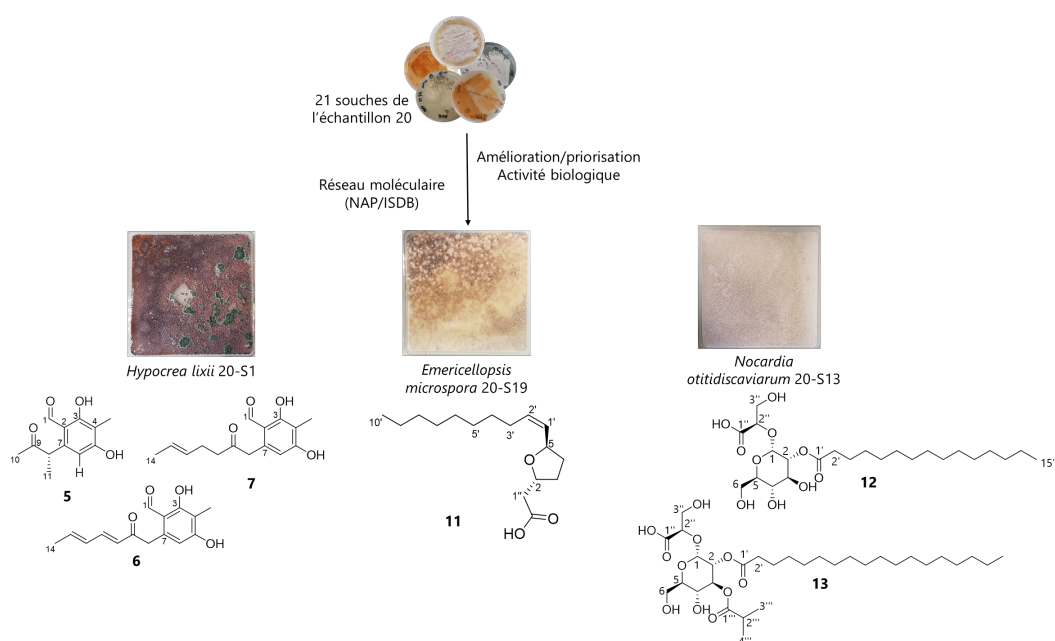


Figure 157 : Résumé des résultats obtenus des souches priorisés de l'échantillon 20

Par l'étude de la souche *Hypocrea lixii* 20-S1, nous avons isolé la molécule T22 azaphilone, un biopesticide commercial isolée à partir des souches *Trichoderma harzianum* T22 et T39¹⁸² et 3 nouvelles molécules (composé 5-7), qui ont probablement un lien avec des précurseurs de biosynthèse des azaphilones¹⁸³.

¹⁸² Vinale, *et al.*, *Letters in Applied Microbiology*, **2006**, 43, 143-8.

¹⁸³ Les azaphilones sont des polyacétates produits par plusieurs espèces de genres de champignons

Nous avons découvert une nouvelle molécule (composé **11**) et trois peptaibols de 15 résidus d'acides aminés de la famille des éméricines (éméricine III, V, VI) à partir du champignon *Emericellopsis microspora* 20-S19. Ces trois composés n'ont pas été détectés dans le réseau moléculaire à cause de la fenêtre d'acquisition des « scans » en SM non adaptée. Par conséquent, il est nécessaire d'élargir ce paramètre afin d'obtenir plus d'informations complètes sur les extraits bruts.

À partir de l'actinomycète 20-S13 *Nocardia otitidiscaviarum*, deux nouvelles molécules (composés **12** et **13**) ont été isolées. *N. otitidiscaviarum* est un agent opportuniste qui cause des infections chez les personnes immunodéprimées. Cette souche est très peu étudiée chimiquement jusqu'à présent. Il n'existe qu'une seule molécule décrite à partir de *Nocardia otitidiscaviarum* depuis 1990 (HS-6).

Les tests des activités biologiques des molécules isolées afin de vérifier leurs éventuels champs d'application doivent être envisagés.

La puissance de la stratégie de priorisation fondée sur l'utilisation du réseau moléculaire a été démontrée par l'isolement de plusieurs nouvelles familles de molécules à partir des micro-organismes ciblés. Cette stratégie permet une observation globale et rapide sur l'originalité des métabolites produits par différentes souches et de choisir les souches potentiellement intéressantes. Plusieurs outils informatiques ont été développés pour permettre une meilleure application de cette stratégie. Par exemple, *Inventa*¹⁸⁴, un nouvel outil développé en 2022 par l'équipe de Jean-luc Wolfender, combine plusieurs informations (différents résultats d'analyse et les données bibliographiques) afin de faciliter l'interprétation des données et donc une meilleure prise de décision dans la priorisation.

Cependant, il est important d'étudier le réseau moléculaire avec un esprit ouvert et critique car nous n'obtenons qu'une idée de la structure mais pas la vraie identité des molécules présentes dans l'extrait. Il est nécessaire de chercher les annotations proposées dans la littérature pour savoir si ces annotations sont cohérentes avec ce que nous nous attendons à trouver chez les micro-organismes. Un autre problème rencontré avec le réseau moléculaire est la non-détection des molécules minoritaires dans les extraits bruts malgré la sensibilité de la spectrométrie de masse. Il est donc préférable de trouver des paramètres plus adaptés à des extraits de micro-organismes ou d'étudier le réseau moléculaire des fractions afin d'observer les molécules minoritaires.

telles que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Talaromyces*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Emericella* et *Epicoccum*, ainsi que *Monascus* et *Hypoxylon*.

¹⁸⁴ Quiros-Guerrero, et al., *bioRxiv* **2022**,

CHAPITRE IV : PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE IV : PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE MICROBIOLOGIE

- Collection des échantillons de mattes de Kopara

Nos échantillons de mattes de Kopara ont été collectés à partir de ces coordonnées GPS : 14°55'58.8"S 147°51'00.7"W (premier point de prélèvement). Les prélèvements ont été réalisés en collaboration avec Pacific Biotech. Chaque partie de matre prélevée présentait des caractéristiques morphologiques spécifiques (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Les échantillons des mattes de Kopara avec des caractéristiques morphologiques différentes prélevés au premier point.

1 ^{er} point	milieu mare (20 m à l'intérieur)
17	surface boule kopara
18	boule Kopara (carotte)
19	boule Kopara (carotte)
20	boule Kopara (carotte) + eau milieu mare
21	sédiment bord -15 cm
22	carotte Kopara sur bourre de coco (bord)
23	sable côté lagon

- Isolement des micro-organismes

Pour isoler les micro-organismes cultivables, tout d'abord, les différents échantillons ont été broyés avec l'eau stérile et puis partagés en deux tubes Falcon® : un laissé à température ambiante et l'autre chauffé au bain-marie à 50 °C pendant une heure. Ensuite, 50 µL d'inoculum de chaque tube a été prélevé et étalé sur différents milieux de culture marins (A1BFe+C, MYA2, R2A, SCAM, MB)¹⁸⁵ et non marins (PDB, SFM)¹⁸⁶. La préparation des milieux de culture sera détaillée ultérieurement.

Les dilutions en série (10^{-1} et 10^{-2}) de chaque tube ont été réalisées avec l'eau stérile salée. Ces dilutions ont été ensuiteensemencées dans différents milieux de cultures comme citées précédemment. Enfin, ces cultures ont été placées à l'étuve à

¹⁸⁵ A1BFe+C : le nom du milieu utilisé dans la littérature

MYA2 : Malt 2 % Yeast Extract Agar

R2A : Reasoner's 2A agar

SCAM : S = sels marins, C = caséine, AM = amidon

MB : Marine Broth

¹⁸⁶ PDB : Potato Dextrose Broth

SFM : Mannitol Soya Flour

28 °C permettant la croissance des micro-organismes.

Ces boîtes de culture ont été inspectées régulièrement. Les colonies ont été isolées en fonction de leur morphologie (de préférences champignons et bactéries filamenteuses). Ces colonies ont été ensuiteensemencées sur deux milieux de cultures : non marin PDB et marin A1BFe+C jusqu'à l'obtention de la colonie de souche propre. Plusieurs repiquages ont été réalisés afin d'obtenir une souche pure.

Toutes les étapes de préparation d'inoculum et purification des souches ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire afin d'assurer la stérilité des manipulations.

Les milieux de cultures utilisés sont détaillés ci-dessous :

- Les milieux de cultures marins ont été préparés avec de l'eau distillée :
 - A1BFe+C : amidon 10 g, extrait de levure 4 g, peptone 2 g, carbonate de calcium 1 g, sulfate de fer(III) 5 mL, bromure de potassium 5 mL, sels marins 30 g, agar (Difco, 20 g/L).
 - MYA2 : extrait de malt (Difco, 20 g), extrait de levure (Difco, 1 g), sels marins 30 g, agar (Difco, 20 g/L).
 - R2A : R2A (Difco, 18.2 g), sels marins 30 g, agar 5 g.
 - SCAM : amidon 10 g, caséine 1 g, sels marins 30 g, agar (Difco, 20 g/L).
 - MB : bouillon marin 2216 (Difco, 37,4 g/L), agar (Difco, 20 g/L).
- Les milieux de cultures non marins ont été préparés avec l'eau de ville :
 - PDB : extrait de pomme de terre et dextrose (milieu prêt à l'emploi, Difco, 24 g/L), agar (Difco, 20 g/L).
 - SFM : farine de soja 20 g, mannitol 20 g, agar (Difco, 20 g/L).

Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave à 120°C avant d'être répartis dans les boîtes de Pétri.

- Culture à « petite échelle » et « grande échelle »

Toutes les souches sélectionnées ont été cultivées selon le protocole suivant :

- La culture en milieu liquide (**LSF** pour Liquid State Fermentation) :

En vue d'obtenir nos premiers réseaux moléculaires, nous avons tout d'abord réalisé des cultures à petite échelle. Pour cela, chaque souche a été cultivée en Erlenmeyer de 2 L contenant 1 L de milieu de culture PDB et 40 g de résines Amberlite® XAD-16 stérile (1 Erlenmeyer par souche). La culture a été agitée à 150 rpm dans un incubateur à agitation orbitale, thermostaté à 28°C pendant 7 jours. La culture liquide couplée à l'extraction en phase solide *in situ* (**SPE** pour Solid Phase

Extraction) permet de piéger les métabolites spécialisés microbiens tout au long de la culture¹⁸⁷.

Les souches priorisées par le réseau moléculaire ont été mises en culture à grande échelle. Les procédures restent les mêmes mais nous avons augmenté la quantité d'Erlenmeyer utilisée (10 Erlenmeyers pour une souche).

- La culture en milieu solide (**SSF** pour Solid State Fermentation) :

Pour la culture à petite échelle, chacune des souches a étéensemencée dans une boîte de Pétri (24,5 cm x 24,5 cm). Pour cela, un mélange constitué de 30 mL d'inoculum et de 30 g de résines Amberlite® XAD-16 stérile a été réparti uniformément sur la surface gélosée. Le surplus de liquide a été ensuite retiré à l'aide d'une pipette stérile. Les boîtes ont été ensuite incubées dans une étuve thermostatée à 28 °C pendant 10 à 15 jours.

Pour la culture à grande échelle, nous avons réalisé deux conditions de culture (5 boîtes de Pétri par condition) :

- Un inoculum avec 30 g de résines Amberlite® XAD-16 (**SSF**)
- Un inoculum sans les résines (**AgSF** pour *Agar State Fermentation*).

- Technique de culture « résine post-culture »

La condition « résine post-culture » a été réalisée pour les souches de l'échantillon 20. Pour réaliser cette dernière, les souches ont été cultivées en condition liquide normale dans un Erlenmeyer de 2 L contenant 1 L de milieu de culture PDB en absence de la résine. Ces cultures ont été ensuite agitées à 150 rpm sur une table d'agitation orbitale thermostatée à 28 °C pendant 13 jours. Cette technique n'a été réalisée qu'en petite échelle.

- La stratégie de culture SPEED (Solid-Phase Extraction Embedded Dialysis)

La technique SPEED consiste à utiliser une poche de dialyse que nous avons appelée SPEED, pour séparer *in situ* la biomasse de micro-organismes des billes de résine. Cette poche comprend deux parties : une enveloppe externe en nylon et un tube de dialyse interne contenant 40 g de résines Amberlite® XAD-16. Ce dernier, avec un seuil de rétention des molécules de moins de 1400 daltons, permet de sélectionner une grande variété de familles de métabolites spécialisés (**Figure 42**).

Afin de développer et d'optimiser cette technique de culture, une des souches priorisées par le réseau moléculaire, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21 a été choisie. Cette souche, conservée à -20 °C dans 20 % de glycérol, a été recultivée puis

¹⁸⁷ Le Goff, *et al.*, *J Nat Prod*, **2013**, 76, 142-9.

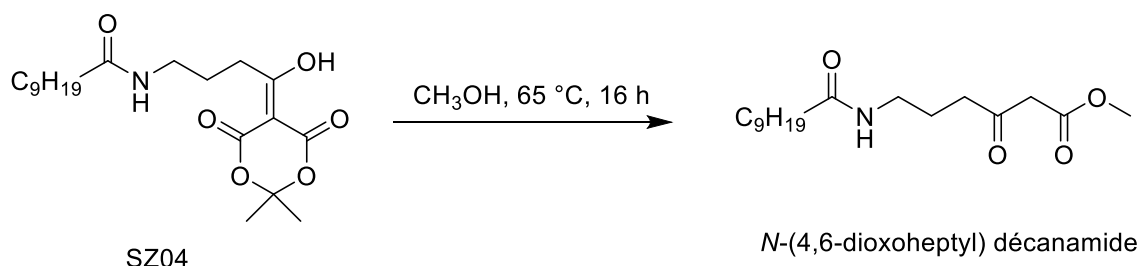
repiquée en quatre boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (3 × 15 cm) pendant 5 jours.

Pour préparer l'inoculum, 16 mL d'eau stérile ont été ajoutées dans chacune des boîtes de Pétri. La biomasse de la souche a été récupérée en grattant doucement la surface de boîte avec un scalpel. Ensuite, 10 Erlenmeyers de 2 L contenant 1 L de milieu de culture PDB et un tube SPEED stérile ont été ensemencés avec 4 mL d'inoculum (4 mL d'inoculum par Erlenmeyer). Ces cultures ont été ensuite agitées à 150 rpm dans un incubateur à agitation orbitale et thermostaté à 28 °C pendant 13 jours. Après 13 jours de culture, les tubes SPEED ont été récupérés, puis rincés abondamment sous l'eau du robinet pour détacher la biomasse collante. L'enveloppe externe a été retiré puis le tube interne a été récupéré et lavé sous l'eau courante. Enfin, les résines XAD ont été récupérées, placées dans un entonnoir Büchner, relavées abondamment à l'eau et séchées sous vide pour enlever l'eau résidu

- Protocole de synthèse de la sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide

La sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide a été synthétisée par Sarah Szwarc dans le cadre de son stage de M2. Le protocole de synthèse est le même que celui dans l'article de E. Riva et al.¹⁸⁸.

SZ04 (1.084 g, 2.83 mmol) was dissolved in methanol (45 mL) and heated under reflux overnight under argon atmosphere. The solvent was evaporated, and the crude was purified by Flash Chromatography (elution gradient starting from 100% Cyclohexane and linearly increasing to 100% EtOAc over 75 min and from 100% EtOAc to 100% MeOH over 30 min). The final compound was obtained as a white powder (694.2 mg, 78.9%). R_f = 0.04 (100% EtOAc).



La sonde a été ensuite contrôlé par l'analyse de CLHP-DEDL (**Figure 158**) et sa structure a été confirmée en comparant ses données RMN ¹H et ¹³C avec celles de la littérature (les données RMN de la sonde ci-dessous ont été prises du rapport de

¹⁸⁸ Riva, et al., *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **2014**, 53, 11944-9.

stage de M2 de Sarah).

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃): δ_H 5.68 (br s, 1H, NH), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.45 (s, 2H, COCH₂CO), 3.26 (apt q, J=6.6 Hz, 2H, NHCH₂), 2.61 (t, J= 7.0 Hz, 2H, CH₂CO), 2.14 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CONH), 1.85-1.76 (m, 2H, CH₂-CH₂CO), 1.62-1.57 (m, 2H, CH₂-CH₂CONH), 1.26 (br s, 12H, (CH₂)₆), 0.87 (t, J=6.3 Hz, 3H, CH₃)

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃): δ_C 202.5 (R₂CO), 173.4 (RCONH), 167.6 (RCOOR), 52.3 (OCH₃), 48.9 (COCH₂CO), 40.3 (CH₂CO), 38.6 (NHCH₂), 36.8 (CH₂CONH), 31.8 (CH₂-CH₂CO), 29.4, 29.3, 25.9, 25.7, 23.3, 22.8 (each CH₂), 22.6 (CH₂CH₃), 14.0 (CH₃);

ESI-HRMS: m/z [M+H]⁺ calculated: 314.2326, found: 314.2335

Conform to literature¹⁸⁹

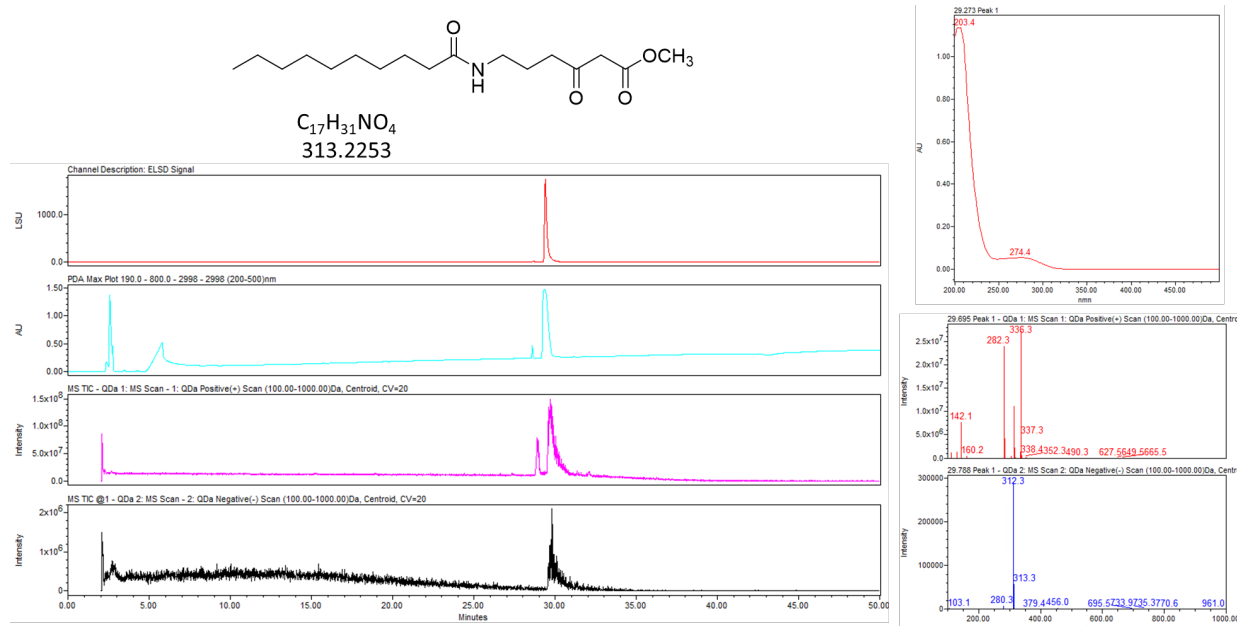


Figure 158 : Profil de CLHP-DEDL de la sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide

- Protocole d'incubation de la sonde *N*-(4,6-dioxoheptyl) décanamide avec la souche

Plusieurs conditions d'incubation de la sonde avec la culture de la souche ont été réalisées. En s'inspirant des conditions d'incubation de la sonde dans l'article de E. Riva et *al.*¹⁹⁰, nous avons développé un protocole adapté aux conditions expérimentales du laboratoire.

Pour préparer l'inoculum, 20 mL d'eau stérile ont été ajoutées dans chacune des boîtes de culture (3 × 15 cm) de la souche. Ensuite, 1 mL d'inoculum a été ajouté dans

¹⁸⁹ Ibid.

¹⁹⁰ Ibid.

chaque Erlenmeyer de 100 mL contenant 20 mL de culture.

5.1 Conditions d'incubation de la sonde avec la souche en présence ou absence de résine

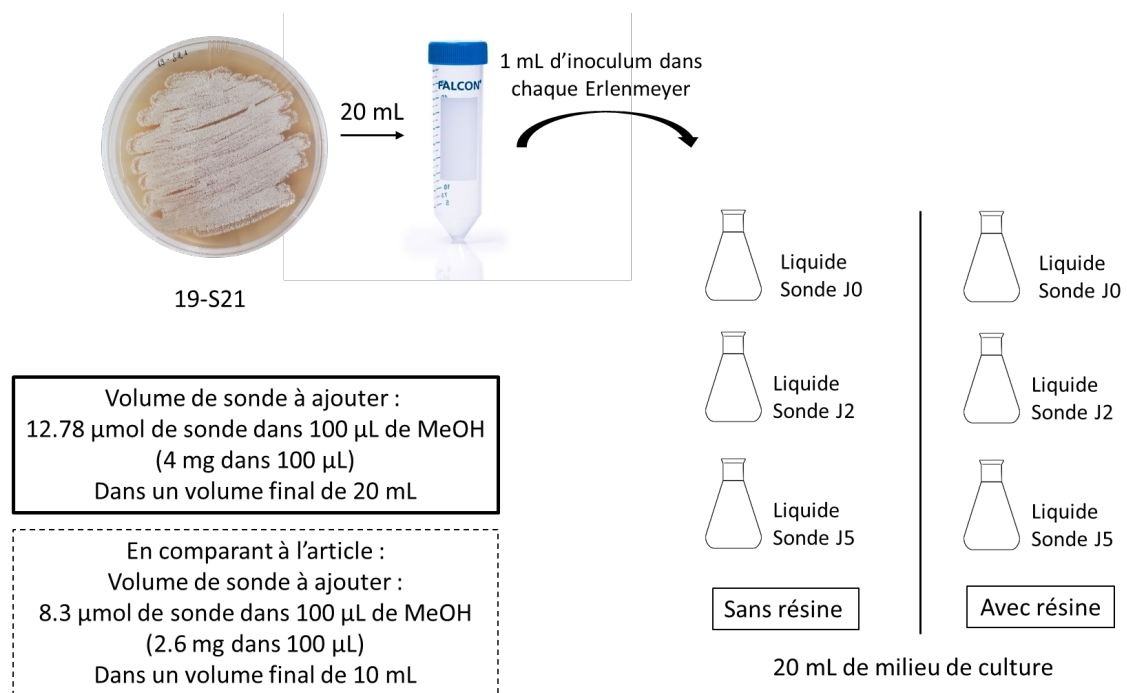


Figure 159 : Protocole d'incubation de la sonde dans la culture de la souche avec ou sans la résine

Dans cette condition, 100 μL de la sonde (12,78 μmol dans 100 μL de méthanol) ont été ajoutées dans chacun des Erlenmeyers avec et sans la résine à différents jours (**Figure 159**).

- J0 : la sonde a été ajoutée le même jour que la souche
- J2 : la sonde a été ajoutée deux jours après la souche
- J5 : la sonde a été ajoutée cinq jours après la souche.

5.2 Conditions d'incubation de la sonde avec la souche en présence ou absence de résine avec l'ajout de la sonde tous les trois jours

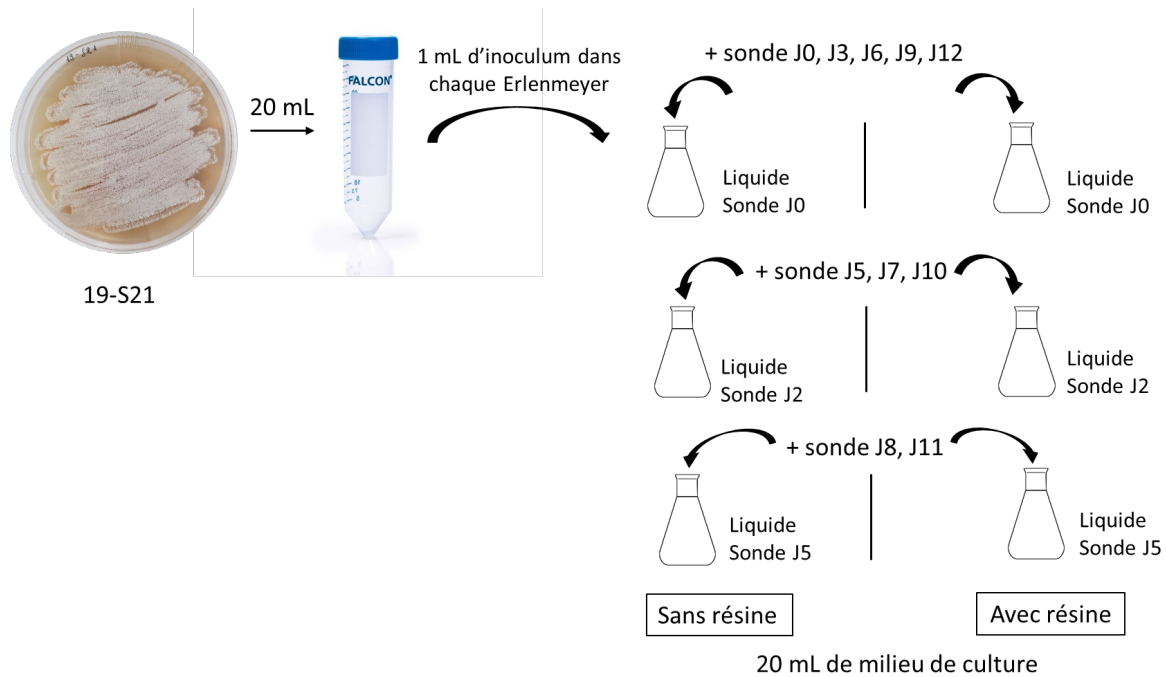


Figure 160 : Protocole d'incubation de la sonde dans la culture de la souche avec ou sans la résine avec l'ajout de la sonde tous les trois jours

Ce protocole est semblable au protocole précédent. La seule différence est l'ajout de 100 μL de sonde tous les trois jours dans chaque condition d'incubation jusqu'à l'arrêt de la culture (**Figure 160**).

5.3 Conditions de contrôle : en présence de la souche sans la sonde

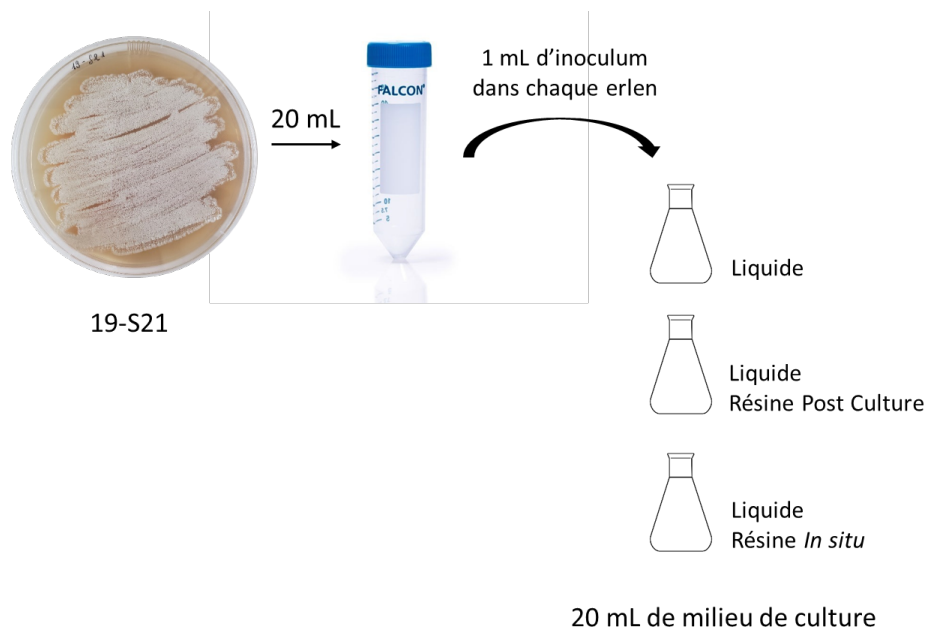


Figure 161 : Conditions de contrôle

La souche a étéensemencée selon les protocoles classiques le même jour que les autres conditions afin de comparer les profils de la souche en absence de la sonde (**Figure 161**).

- **Essais biologiques**

Les molécules isolées et les extraits ont été dissous dans le DMSO à 10 mg/mL et puis testés sur trois micro-organismes tests : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*. Ces trois micro-organismes stockés à -20 °C sont décongelés etensemencés dans 5 mL de milieu LB¹⁹¹ liquide. Ils sont ensuite incubés pendant 24 heures à 28 °C pour *B. subtilis* et *M. luteus* et 37 °C pour *E. coli*.

Des boîtes de Pétri de 14 cm ou 25 cm de diamètre, contenant du milieu LB gélosé sont préparées. Le milieu LB contient la tryptone (Difco, 10 g), l'extrait de levure (Difco, 5 g), la chlorure de sodium (VWR, 10 g) et l'agar (Difco, 20 g/L).

Ces boîtes sont ensuiteensemencées par inondation à partir d'inoculum de souches tests. Le surplus d'inoculum est récupéré à l'aide d'une pipette. Les pastilles ont été déposées à l'aide d'une pince et 10 µL de la solution à tester ont été ensuite déposées sur chaque pastille à l'aide d'une micropipette.

¹⁹¹ LB : *Lysogeny broth*, milieu de culture bactérienne non sélectif

Des pastilles antibiotiques de référence ont été déposées au milieu des boîtes : chloramphénicol (30 µg) pour *E. coli* et gentamycine (10 µg) pour *B. subtilis* et *M. luteus*. Les boîtes de Pétri contenant *B. subtilis* et *M. luteus* sont incubées dans une étuve à 28 °C, celles contenant *E. coli* sont incubées à 37 °C. La lecture des antibiogrammes se fait après 24 et 48 h d'incubation, en mesurant le diamètre du cercle d'inhibition des échantillons.

- **Extraction de l'ADN génomique des micro-organismes**

Les micro-organismes à extraire sont cultivés dans des Erlenmeyers de 100 mL contenant du milieu PDB et LB. Ensuite, la culture fraîche de la souche (entre 3 à 5 jours) est centrifugée. Le culot est récupéré et broyé à froid dans l'azote liquide jusqu'à obtenir une poudre fine (étape de la lyse mécanique). Deux protocoles d'extraction de l'ADN génomique sont détaillés ci-dessous :

- **Extraction du génome selon le protocole proposé par notre collaboration**

Cette partie est réalisée en collaboration avec l'Institut de Biologie Intégrative de la cellule (dans l'équipe de Dr. Lautru Sylvie). L'extraction s'est déroulée en 2 jours :

- Jour 1 : la poudre fine est transvasée dans un tube à centrifuger et puis est centrifugée de nouveau afin d'enlever le liquide de culture restant. Ce tube est ensuite incubé au bain marie à 65 °C pendant 30 min. Le culot est ensuite resuspendu dans 10 mL du tampon TE, 500 µL de SDS 20 % et bien mélangé par retournement jusqu'à l'obtention d'un mélange blanc et mousseux. Ce mélange est ensuite incubé à nouveau au bain marie à 65 °C pendant 30 min. Ensuite, nous avons ajouté 3 mL d'acétate de potassium 3 M pH 5 dans le mélange puis nous l'avons laissé incubé 1 h dans la glace à 0 °C. Ce mélange est ensuite centrifugé, le surnageant est récupéré dans un tube de 50 mL. Deux volumes d'éthanol y ont été ajoutés. Le tube est mélangé par retournement et laissé à -20 °C pendant la nuit.

- Jour 2 : Avant de centrifuger le tube précédent, nous avons observé si les filaments d'ADN de la souche étaient présents. Après la centrifugation, le culot est resuspendu dans 700 µL du tampon TE, et transféré dans un tube eppendorf de 2 mL. La purification d'ADN est réalisée par l'extraction au phénol/chloroforme (3 fois). La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée dans un tube eppendorf de 1,5 mL et nous avons ajouté 2 volumes d'éthanol absolu froid. Le mélange est ensuite bien mélangé et incubé 1 h à 4 °C. Ensuite, le tube est centrifugé, le culot est récupéré et rincé avec 1 mL d'éthanol 70 °C et séché à température ambiante. Enfin, le culot est resuspendu dans l'eau/RNase.

- **Extraction de l'ADN génomique par Kit commercial**

La poudre fine est répartie dans différents tube Eppendorf à 2 mL (3 à 4 tubes pour chaque condition de culture). L'ADN génomique a été ensuite extrait et purifié selon le

protocole proposé avec les kits commerciaux DNeasy QIAGEN contenant les différents tampons et membranes de filtration.

- L'ADN obtenu est vérifié par l'électrophorèse sur gel d'agarose et quantifié par fluorimétrie (système Qubit) et ensuite confié à la plateforme de séquençage d'IMAGIF.

- **Taxinomie des micro-organismes**

Les micro-organismes à identifier ont été cultivées dans des boîtes de Petri (3 x 15 cm) pendant trois à cinq jours. La biomasse des souches fraîches a été récupérée en grattant soigneusement avec un scalpel et mise en condition dans une boîte de 96 puits fournie par notre collaborateur Microsynth.

PARTIE CHIMIE

- **Extraction des métabolites des micro-organismes**

- **Extraction des cultures gélosées de la culture solide sans résine (*AgSF*)**

Les géloses sont découpées et séchées à 50 °C dans l'étuve pendant une nuit afin d'enlever l'eau résiduelle. Les géloses séchées sont ensuite mises dans une bouteille de 2 L où nous avons ajouté l'acétate d'éthyle. L'extrait d'acétate d'éthyle obtenu est ensuite évaporé sous pression réduite à l'aide d'un rotavapor. Les géloses sont ensuite réextraites avec le méthanol. L'extrait méthanolique est obtenu en évaporant le méthanol à l'aide d'un rotavapor. Enfin, ces extraits sont soumis aux protocoles classiques d'analyse et de séparation.

- **Extraction des résines de la culture solide avec résine (*SSF*)**

La couche biomasse/résine est récupérée par grattage à l'aide d'une spatule et puis extraite par l'acétate d'éthyle puis par le méthanol. Les étapes d'extraction, d'analyse et de séparation sont identiques à celles de la culture AgSF.

- **Extraction des résines de la culture liquide avec les résines (*LSF*)**

Les résines sont filtrées, relavées abondamment à l'eau et séchées sous vide à l'aide un entonnoir Büchner. Les résines sèches sont ensuite extraites par l'acétate d'éthyle, puis le méthanol. Les étapes d'extraction, d'analyse et de séparation sont identiques à celles décrites précédemment.

- **Extraction des résines de la culture liquide « résine post-culture »**

Après 13 jours de culture, la biomasse de la souche est séparée du filtrat par une filtration sous vide. Le filtrat est récupéré et transféré à nouveau dans son Erlenmeyer où nous avons ajouté 40 g de résine. Le mélange a ensuite été laissé en

agitation à 150 rpm pendant 24 h. Le lendemain, les résines XAD sont placées dans un entonnoir Büchner, relavées abondamment à l'eau et séchées sous vide pour enlever l'eau résiduelle. Enfin, ces résines ont été extraites avec de l'acétate d'éthyle puis du méthanol.

- Méthodes d'analyse et de séparation

- Analyses CLHP-SM/SM

Les échantillons ont été analysés avec un système comprenant une CLUP couplée à un Q-TOF Agilent 6546, équipé d'une source ESI opérant en mode positif et négatif; et une colonne ZORBAX® Eclipse Plus C18 UPLC (2,1 × 50 mm ; i.d. 1,8 µm, Agilent), avec un débit de 0,5 mL·min⁻¹ et un gradient linéaire de 5 % de B (A : eau + 0,1 % acide formique, B : acétonitrile + 0,1 % d'acide formique) à 100 % de B en 15 min. Les conditions de la source ESI ont été définies ainsi : température du capillaire à 320 °C, voltage de la source à 3,5 kV and un débit de gaz à 11 L·min⁻¹. La fenêtre d'acquisition des « scans » en SM a été réglée entre les *m/z* 100 et 1200, puis les cinq ions monochargés les plus intenses de chaque « scan » ont été fragmentés, sans exclusion. Une énergie de collision unique, à 35 eV, a été appliquée. L'intensité minimum a été réglée à 3000 coups, et la largeur d'isolement à 1,3 amu. En mode positif, l'ion purine C₅H₄N₄ [M+H]⁺ (*m/z* 121,050873) et l'ion hexakis (1H, 1H, 3H-tétrafluoropropoxy) phosphazine C₁₈H₁₈F₂₄N₃O₆P₃ [M+H]⁺ (*m/z* 922,009798) ont été utilisés comme références. En mode ions négatif, l'acide trifluoroacétique (CF₃COOH, *m/z* 112,98559) et l'adduit de trifluoroacétate avec *m/z* 1033,988109 ont été utilisés. Une liste d'exclusion SM/SM des masses de références a été définie pour éviter les analyses de ces calibrants. L'acquisition et le traitement des données LC-UV et MS ont été effectués à l'aide du logiciel MassHunter® Workstation (Agilent Technologies, Massy, France).

- Traitement des données SM/SM et les paramètres du réseau moléculaire

Les données SM/SM sont converties du format .d (format standard d'Agilent) en .mzML avec le logiciel MSConvert¹⁹². Toutes les données .mzML sont ensuite traitées par MZmine 2.53¹⁹³.

Les paramètres de MZmine pour nos réseaux moléculaires sont décrits dans le **Tableau 12** suivant :

Tableau 12 : Les paramètres de traitement MZmine des données LC-SM/SM :

¹⁹² Chambers, *et al.*, *Nature Biotechnology*, **2012**, 30, 918-20.

¹⁹³ Pluskal, *et al.*, *BMC Bioinformatics*, **2010**, 11, 395.

		Réseau moléculaire global de l'échantillon 19	<i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21	Réseau moléculaire global de l'échantillon 20
Détection des pics	<i>mass detection MS1*</i>	1.0E4	1.0E4	1.0E4
	<i>mass detection MS2*</i>	1.0E2	1.0E3	1.0E3
Création de la liste de pics (<i>ADAP chromatogram builder</i>)	<i>minimum group size of scans</i>	2	2	2
	<i>group intensity threshold</i>	3.0E3	3.0E3	1.0E3
	<i>minimum highest intensity</i>	3.0E3	3.0E3	1.0E3
	<i>m/z tolerance</i>	0.01 ou 50 ppm	0.01 ou 50 ppm	0.0 m/z ou 10 ppm
Déconvolution (<i>chromatogram deconvolution Wavelets (ADAP)</i>)	<i>m/z range for MS2 scan pairing</i>	0.06	0.06	0.01
	<i>RT range for MS2 scan pairing</i>	1	1	0.2
	<i>S/N threshold</i>	5	5	5
	<i>min feature height</i>	2,000	3,000	1,000
	<i>coefficient/area threshold</i>	2	2	2
	<i>Peak duration range</i>	0.00-0.9	0.00-0.9	0.00-0.9
	<i>RT wavelet range</i>	0.01-1	0.00-0.09	0.00-0.09
Regroupement des isotopes (<i>isotopic peaks grouper</i>)	<i>m/z tolerance</i>	0.004 m/z ou 15 ppm	0.005 m/z ou 5 ppm	0.0 m/z ou 10 ppm
	<i>RT tolerance</i>	0.2	0.2	0.1
Alignement (<i>peak alignment</i>)	<i>m/z tolerance</i>	0.001 ou 5 ppm	0.004 or 5 ppm	0.0 m/z ou 10 ppm
	<i>weight for m/z</i>	1	1	1
	<i>retention time tolerance</i>	0.2	0.1	0.2
	<i>weight for RT</i>	1	1	1
Filtering	Seuls les pics avec MS2 scans seront conservés			

* : seuil adapté en fonction du profil chromatographique des extraits

Nos réseaux moléculaires ont été construits en utilisant le *workflow* de « *Feature-based molecular networking* » sur le site GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>).

Les paramètres pour la construction du réseau moléculaire sur la plateforme GNPS sont détaillés dans le **Tableau 13** ci-dessous :

Tableau 13 : Les paramètres pour la construction du réseau moléculaire sur GNPS

	Réseau moléculaire global de l'échantillon 19	<i>Streptomyces albidoflavus</i> 19-S21	Réseau moléculaire global de l'échantillon 20
<i>Precursor ion mass tolerance</i>	0.02 Da	0.02 Da	0.02 Da

<i>Fragment Ion Mass Tolerance</i>	0.02 Da	0.02 Da	0.02 Da
<i>Min Pairs Cos</i>	0.6	0.6	0.5
<i>Network TopK</i>	10	10	10
<i>Minimum Matched Fragment Ions</i>	4	3	4
<i>Maximum shift between precursors</i>	500	500	500
<i>Maximum Connected Component Size</i>	100	100	100
<i>Library Search Min Matched Peaks</i>	4	5	4
<i>Score Threshold</i>	0.7	0.7	0.7
<i>Search Analogs</i>	Do Search	Do Search	Do Search
<i>Top results to report per query</i>	1	1	1
<i>Maximum Analog Search Mass Difference</i>	100	100	100

* : les micro-organismes de l'échantillon 19 ont été répartis en 3 réseaux moléculaires en fonction de leur taxinomie.

Le réseau moléculaire obtenu a été visualisé grâce au logiciel Cytoscape® (ver. 3.7.2)¹⁹⁴.

- Les paramètres des outils d'annotation *in silico*

NAP (Network Annotation Propagation)

L'annotation des réseaux moléculaires par NAP a été réalisée en utilisant le workflow NAP_CCMS, disponible sur le site <https://proteomics2.ucsd.edu/>. Les paramètres d'annotation sont les suivantes :

- *Number of a cluster index* : 0
- *Cosine value to subselect inside a cluster* : 0,5
- *N first candidates for consensus score* : 10 (*Use fusion result for consensus*)
- *Accuracy for exact mass candidate search (ppm)* : 10
- *Acquisition mode* : Positive
- *Structure databases* : DNP, GNPS
- *Adduct ion type* : [M+H]⁺
- *Maximum number of candidate structures in the graph* : 10
- *Workflow type* : MZmine

ISDB (*In Silico* spectral Database)

L'annotation des réseaux moléculaires par ISDB a été réalisée par comparaison

¹⁹⁴ Shannon, *et al.*, *Genome Research*, **2003**, 13, 2498-504.

des spectres SM/SM expérimentaux à ceux *in silico* dans ISDB.

Le *workflow* de cet outil est disponible sur [ISDB by oolonek](#)

Les paramètres pour la recherche spectrale sont les suivantes :

- *Tolerance* : 0,002
- *Score threshold in Da* : 0,2
- *Top K results* : 5

- **Analyses par CLHP analytique**

Le système CLHP analytique compose d'une chaîne CLHP Alliance® Waters W2695 couplé à un détecteur PhotoDiode Array Waters 2996 (UV), un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) Waters 2424 et un détecteur de masse Waters QDa (SM) (Waters SAS, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Une colonne en phase inverse de type Sunfire III C18 (4,6 x 150 mm) 3,5 µm (Waters) est utilisée.

Le gradient d'élution consiste en un gradient linéaire de 100 % de solvant A à 100 % de solvant B en 40 min, puis 10 min à 100 % B (Solvant A : H₂O + 0,1 % HCOOH, Solvant B : ACN + 0,1 % HCOOH) avec un débit de 0,7 mL/min.

Pour les composés apolaires, deux gradients d'élution ont été utilisés :

- 30 % de solvant A à 100 % de solvant B en 40 min, puis 10 min à 100 % B (Solvant A : H₂O + 0,1 % HCOOH, Solvant B : ACN + 0,1 % HCOOH).
- 50 % de solvant A à 100 % de solvant B en 40 min, puis 10 min à 100 % B (Solvant A : H₂O + 0,1 % HCOOH, Solvant B : ACN + 0,1 % HCOOH).

- **Séparation par chromatographie sur colonnes de silice**

La séparation par chromatographie sur colonnes de silice des extraits obtenus est réalisée à l'aide d'un appareil Combiflash-Companion® (Serlabo) équipé d'un détecteur UV, en utilisant des colonnes prêtes à l'emploi. Les solvants utilisés pour les séparations sont des systèmes binaires de type Heptane/Acétate d'éthyle ou Dichlorométhane/Méthanol. Les échantillons ont été préparés en dépôt solide sur une silice SDS 60 ACC 35-70 µm (Chromagel). Analyses spectrales des composés

- **Purification par CLHP semi-préparative**

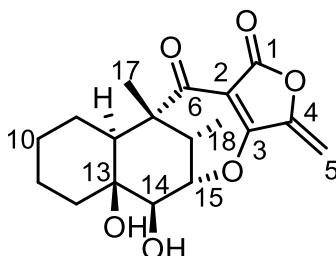
La purification a été réalisée sur une chaîne CLHP équipée d'une colonne en phase inverse de type Sunfire C18 (10 x 250 mm, 5 µm). Cette chaîne CLHP est munie d'un injecteur automatique Waters 717 Autosampler, d'une pompe Waters 600, d'un détecteur PDA Waters 2996 et d'un DEDL Waters 2420 (Waters SAS, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Le gradient d'élution est adapté selon le profil chromatographique des fractions.

- Élucidation structurale (Service de Résonance Magnétique Nucléaire de l'ICSN)

Les expériences de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées sur des spectromètres Bruker Avance 500 MHz équipé d'une sonde BBO, 600 MHz équipé d'une microsonde TXI 1,7 mm, 700 MHz équipé d'une cryosonde TXO 5 mm et 800 MHz équipé d'une cryosonde TCI en utilisant des solvants deutérés comme le chloroforme CDCl_3 , le diméthylsulfoxyde $\text{O}=\text{S}(\text{CD}_3)_2$ et le méthanol $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et calibrés par rapport au solvant de référence. Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est exprimée par les abréviations suivantes : s (singulet), bs (singulet large), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet), m (multiplet), q (quadruplet), dq (doublet de quadruplet), qu (quintuplet), sx (sextuplet), ddt (doublet de doublet de triplet), dtd (doublet de triplet de doublet). L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences monodimensionnelles 1D ^1H et ^{13}C , et bidimensionnelles 2D $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC, $^1\text{H}-^1\text{H}$ NOESY ou ROESY. Les spectres RMN sont traités grâce aux logiciels dédiés TopSpin (Bruker).

- Données expérimentales des composés isolés

Tétradécamycine : 83,2 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide amorphe transparent

Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_6$

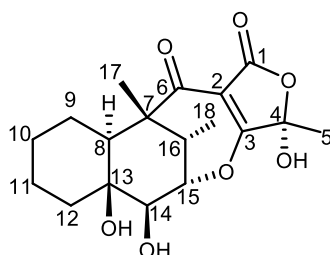
MS-ESIHR (ESI+) : 335,1496 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, valeur calculée: 335,1489

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5,40 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-5) ; 5,26 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz, H-5) ; 4,85 (1H, br d, $J = 2,1$ Hz, H-15) ; 3,63 (brs, 1H, H-14) ; 2,71 (qd, 1H, $J = 7,1$; 2,5 Hz, H-16) ; 2,08 (br d, 1H, $J = 13,3$ Hz, H-12) ; 1,75 (br d, 1H, $J = 13,3$ Hz, H-10) ; 1,62 (qd, 1H, $J = 13,0$; 3,3 Hz, H-9) ; 1,52 (m, 1H, H-11) ; 1,48 (m, 1H, H-9) ; 1,43 (t, 1H, $J = 12,5$, H-11) ; 1,31 (1H, dd, $J = 12,5$; 3,8 Hz, H-8) ; 1,23 (s, 3H, H-17) ; 1,18 (dt, 1H, $J = 13,0$; 4,1 Hz, H-12) ; 1,09 (q, $J = 12,8$ Hz, H-10) ; 0,97 (d, 3H, $J = 7,8$ Hz, H-18).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 195,6 (C-6) ; 165,3 (C-1) ; 165,2 (C-3) ; 148,4 (C-4) ; 100,7 (C-2) ; 97,0 (C-5) ; 92,5 (C-15) ; 78,5 (C-14) ; 68,8 (C-13) ; 53,4 (C-7) ; 43,1 (C-

8) ; 39,8 (C-12) ; 32,7 (C-16) ; 26,0 (C-10) ; 23,6 (C-9) ; 20,1 (C-11) ; 17,5 (C-17) ; 13,7 (C-18).

Composé 1 : 1,3 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide transparent

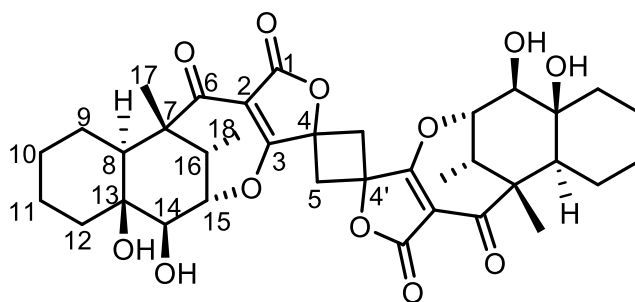
Formule brute : $C_{18}H_{24}O_7$

MS-ESIHR (ESI+) : 353,1603 ($[M+H]^+$, valeur calculée : 353,1595

RMN 1H (500 MHz, CH_3OH-d_4) δ_H : 4,84 (1H, H-15)¹⁹⁵ ; 3,50 (brs, 1H, H-14) ; 2,81 (qd, 1H, $J = 7,4$; 3,2 Hz, H-16) ; 2,09 (br d, 1H, $J = 14,2$ Hz, H-12) ; 1,75 (br d, 1H, $J = 12,4$ Hz, H-10) ; 1,66 (m, 1H, H-9) ; 1,63 (s, 2H, H-5) ; 1,56 (m, 1H, H-11) ; 1,49 (m, 1H, H-11) ; 1,41 (dd, 1H, $J = 12,4$; 3,8 Hz) ; 1,35 (m, 1H, H-9) ; 1,20 (s, 3H, H-17) ; 1,16 (m, 1H, H-12) ; 1,15 (m, 1H, H-10) ; 0,96 (d, 3H, $J = 7,4$ Hz).

RMN ^{13}C (125 MHz, CH_3OH-d_4) δ_C : (C-1) ; (C-2)¹⁹⁶ ; 198,1 (C-6) ; 179,7 (C-3) ; 101,5 (C-4) ; 95,0 (C-15) ; 80,1 (C-14) ; 69,8 (C-13) ; 54,6 (C-7) ; 44,3 (C-8) ; 40,3 (C-12) ; 34,0 (C-16) ; 27,4 (C-10) ; 24,9 (C-9) ; 23,4 (C-5) ; 22,1 (C-11) ; 18,1 (C-17) ; 13,6 (C-18).

Composé 2 : Spirobistétrodécamyine A : 0,7 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide transparent

¹⁹⁵ Signal masqué par l'eau résiduelle

¹⁹⁶ Non déterminé

$[\alpha]_D^{25.0}$: +4 (c 0,2, CH₃OH)

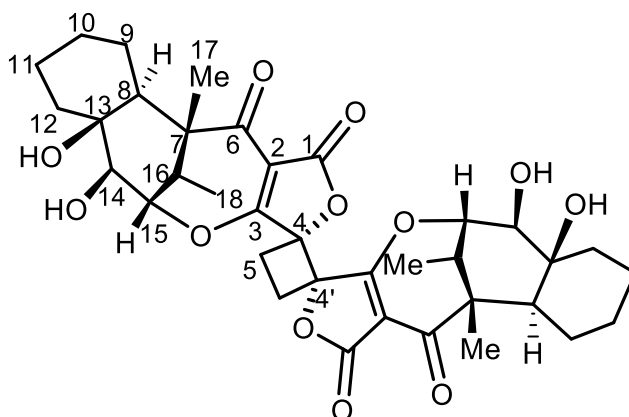
Formule brute : C₃₆H₄₄O₁₂

MS-ESIHR (ESI+) : 669,2906 ([M+H]⁺, valeur calculée : 669,2906

RMN ¹H (500 MHz, CH₃OH-d₄) δ_H : 4.96 (br d, 1H, *J* = 2.8 Hz, H-15/15') ; 3.58 (br s, 1H, H-14/14') ; 2.85 (qd, 1H, *J* = 7,5 ; 2,9 Hz, H-16/16') ; 2.64 (s, 2H, H-5/5') ; 2.11 (d, 1H, *J* = 14 Hz, H-12/12') ; 1.74 (br d, 1H, *J* = 12,4 Hz, H-10/10') ; 1.66 (dd, 1H, *J* = 12,4 ; 3,1 Hz, H-9/9') ; 1.57 (m, 1H, H-11/11') ; 1.48 (m, 1H, H-11/11') ; 1.38 (dd, 1H, *J* = 12,2 ; 4,2 Hz, H-8/8') ; 1.33 (m, 1H, H-9/9') ; 1.23 (1H, m, H-12/12') ; 1.21 (s, 3H, H-17/17') ; 1.01 (d, 3H, *J* = 7,4 Hz, H-18/18').

RMN ¹³C (125 MHz, CH₃OH-d₄) δ_C : 196,9 (C-6/6') ; 178,8 (C-3/3') ; 168,6 (C-1/1') ; 101,6 (C-2/2') ; 95,4 (C-15/15') ; 86,9 (C-4/4') ; 80,1 (C-14/14') ; 69,6 (C-13/13') ; 54,5 (C-7/7') ; 44,1 (C-8/8') ; 40,3 (C-12/12') ; 33,8 (C-16/16') ; 27,1 (C-10/10') ; 24,7 (C-9/9') ; 21,9 (C-11/11') ; 17,9 (C-17/17') ; 13,7 (C-18/18').

Composé 3 : Spirobistétrodécamyne B : 13,6 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, *m*_{extrait} = 577 mg



Aspect : cristallin.

$[\alpha]_D^{25.0}$: + 82,7 (c 0,2, CH₃OH)

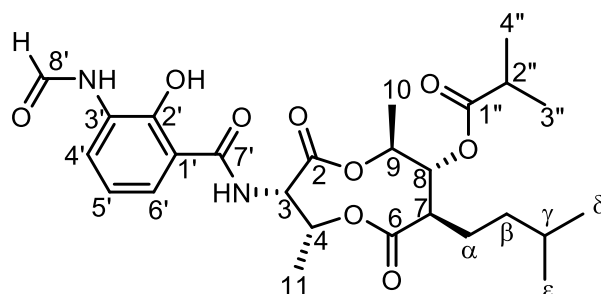
Formule brute : C₃₆H₄₄O₁₂

MS-ESIHR (ESI+) : 669,2910 ([M+H]⁺, valeur calculée : 669,2906

RMN ¹H (600 MHz, CH₃OH-d₄) δ_H : 5.01 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz, H-15/15') ; 3.93 (s, 1H, H-14/14') ; 2.78 (qd, 1H, *J* = 7,4 ; 2,7 Hz, H-16/16') ; 2.67 (m, 1H, H-5/5') ; 2.62 (m, 1H, H-5/5') ; 2.06 (d, 1H, *J* = 10,5 Hz, H-12/12') ; 1.68 (m, 1H, H-11/11') ; 1.65 (m, 1H, H-9/9') ; 1.55 (m, 1H, H-12/12') ; 1.47 (m, 1H, H-10/10') ; 1.39 (m, 1H, H-8/8') ; 1.37 (m, 1H, H-10/10') ; 1.27 (m, 1H, H-9/9') ; 1.22 (m, 1H, H-11/11') ; 1.21 (s, 3H, H-17/17') ; 0.98 (d, 3H, *J* = 7,4 Hz, H-18/18').

RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) δ_{C} : 197,4 (C-6/6') ; 179,1 (C-3/3') ; 168,4 (C-1/1') ; 101,1 (C-2/2') ; 96,1 (C-15/15') ; 87,4 (C-4/4') ; 78,9 (C-14/14') ; 69,4 (C-13/13') ; 54,8 (C-7/7') ; 44,7 (C-8/8') ; 40,1 (C-12/12') ; 33,8 (C-16/16') ; 26,0 (C-10/10') ; 24,9 (C-9/9') ; 26,9 (C-11/11') ; 17,8 (C-17/17') ; 13,6 (C-18/18').

Antimycine A7a : 0,2 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide amorphe blanchâtre.

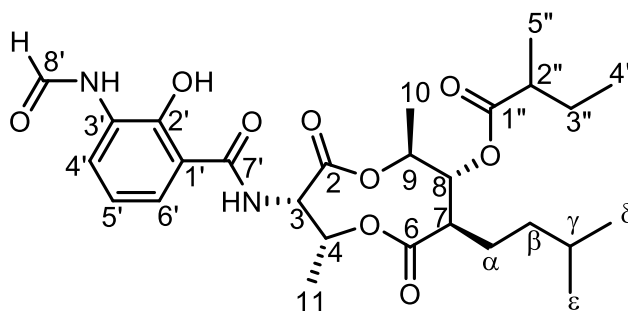
Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_9$

MS-ESIHR (ESI+) : 521,2502 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, valeur calculée: 521,2494

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 12,61 (s, 1H, OH-2') ; 8,55 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-4') ; 8,50 (d, 1H, $J = 1,1$ Hz, H-8') ; 7,89 (bs, 1H, NH-8') ; 7,23 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-6') ; 7,04 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, NH-7') ; 6,92 (t, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-5') ; 5,73 (qu, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-4) ; 5,28 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-3) ; 5,08 (t, 1H, $J = 9,8$ Hz, H-8) ; 5,00 (m, 1H, H-9) ; 2,61 (m, 1H, H-2'') ; 2,50 (dt, 1H, $J = 10,0$; 3,3 Hz, H-7) ; 1,68 (m, 1H, H- α) ; 1,50 (m, 1H, H- γ) ; 1,36 (m, 1H, H- α) ; 1,31 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz, 4-Me) ; 1,29 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz, 9-Me) ; 1,21 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-3'') ; 1,22 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, H-4'') ; 1,17 (m, 2H, H- β) ; 0,84 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz, H- δ) ; 0,84 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz, H- ϵ).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : non déterminée à cause d'une faible quantité du produit.

Antimycine A8a : 0,5 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide amorphe blanchâtre.

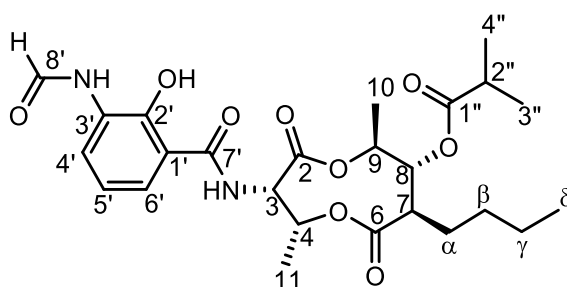
Formule brute : $C_{27}H_{38}N_2O_9$

MS-ESIHR (ESI+) : 535,2659 ($[M+H]^+$), valeur calculée: 535,2650a

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 12,61 (s, 1H, OH-2') ; 8,55 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-4') ; 8,50 (s, 1H, H-8') ; 7,89 (bs, 1H, NH-8') ; 7,23 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-6') ; 7,05 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, NH-7') ; 6,92 (t, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-5') ; 5,73 (qu, 1H, $J = 7,1$ Hz, H-4) ; 5,28 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-3) ; 5,09 (t, 1H, $J = 9,9$ Hz, H-8) ; 5,00 (m, 1H, H-9) ; 2,50 (m, 1H, H-7) ; 2,42 (m, 1H, H-2'') ; 1,74 (m, 1H, H-3'') ; 1,68 (m, 1H, H- α) ; 1,50 (m, 1H, H-3'') ; 1,48 (m, 1H, H- γ) ; 1,36 (m, 1H, H- α) ; 1,31 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz, 4-Me) ; 1,29 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz, 9-Me) ; 1,22 (m, 2H, H- β) ; 1,19 (d, 3H, $J = 7,1$, H-5'') ; 0,94 (t, 3H, $J = 7,4$ Hz, H-4'') ; 0,84 (d, 3H, $J = 6,0$ Hz, H- δ) ; 0,84 (d, 3H, $J = 6,0$ Hz, H- ϵ).

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C : non déterminée à cause d'une faible quantité du produit.

Antimycine A4a : 0,6 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide amorphe blanchâtre.

Formule brute : $C_{25}H_{34}N_2O_9$

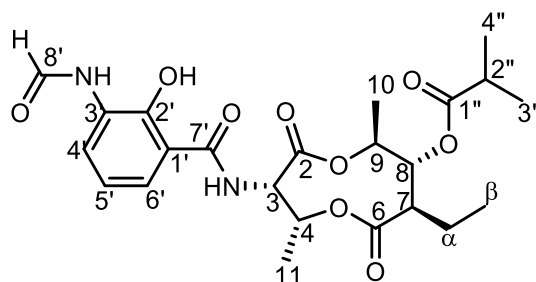
MS-ESIHR (ESI+) : 507,2349 ($[M+H]^+$), valeur calculée : 507,2337

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 12,61 (s, 1H, OH-2') ; 8,55 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-4') ; 8,50 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-8') ; 7,89 (bs, 1H, NH-8') ; 7,23 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-6') ; 7,05 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz, NH-7') ; 6,92 (t, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-5') ; 5,73 (qu, 1H, $J = 7,0$

Hz, H-4) ; 5,28 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-3) ; 5,08 (t, 1H, $J = 9,9$ Hz, H-8) ; 5,00 (m, 1H, H-9) ; 2,61 (m, 1H, H-2'') ; 2,53 (m, 1H, H-7) ; 1,71 (m, 1H, H- α) ; 1,31 (d, $J = 3$ Hz, 6,7 Hz, 4-Me) ; 1,29 (d, 3H, $J = 6,2$ Hz, 9-Me) ; 1,25-1,34 (m, 5H, H- α) ; 1,25-1,34 (m, 5H, H- β) ; 1,25-1,34 (m, 5H, H- γ) ; 1,21 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz, H-3'') ; 1,20 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, H-4'') ; 0,86 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, H- δ).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : non déterminée à cause d'une faible quantité du produit.

Antimycine A6a : 0,4 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide amorphe jaunâtre

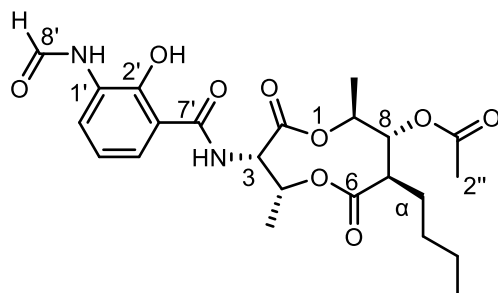
Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_9$

MS-ESIHR (ESI+) : 479,2029 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, valeur calculée : 479,2024

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 12,61 (s, 1H, OH-2') ; 8,55 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-4') ; 8,50 (s, 1H, H-8') ; 7,89 (bs, 1H, NH-8') ; 7,22 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-6') ; 7,05 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, NH-7') ; 6,92 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-5') ; 5,74 (qu, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-4) ; 5,28 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, H-3) ; 5,08 (t, 1H, $J = 9,9$ Hz, H-8) ; 5,00 (m, 1H, H-9) ; 2,61 (m, 1H, H-2'') ; 2,48 (m, 1H, H-7) ; 1,69 (m, 1H, H- α) ; 1,41 (m, 1H, H- α) ; 1,31 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, 4-Me) ; 1,29 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz, 10-Me) ; 1,21 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, H-3'') ; 1,21 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, H-4'') ; 0,88 (t, 3H, $J = 7,3$ Hz, H- β)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : non déterminée à cause d'une faible quantité du produit.

Antimycine A18 : 0,2 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide amorphe blanchâtre.

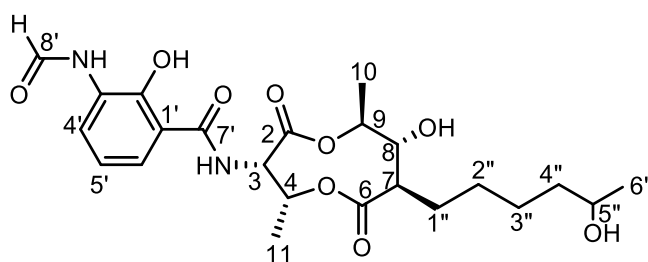
Formule brute : $C_{23}H_{30}N_2O_9$

MS-ESIHR (ESI+) : 479,2026 ($[M+H]^+$, valeur calculée : 479,2024

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H : 12,61 (s, 1H, OH-2') ; 8,55 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-4') ; 8,50 (s, 1H, H-8') ; 7,92 (bs, 1H, NH-8') ; 7,24 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-6') ; 7,08 (d, 1H, $J = 7,1$ Hz, NH-7') ; 6,92 (t, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-5') ; 5,72 (qu, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-4) ; 5,28 (dd, 1H, $J = 7,8 ; 7,5$ Hz, H-3) ; 5,07 (dd 1H, $J = 10,0 ; 9,3$ Hz, H-8) ; 4,98 (m, 1H, H-9) ; 2,53 (m, 1H, H-7) ; 2,13 (s, 3H, H-2'') ; 1,36 (m, 1H, H- α) ; 1,33 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H, 4-Me) ; 1,31 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, 9-Me) ; 0,87 (t, 3H, $J = 6,6$ Hz, H- δ)

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C : non déterminée à cause d'une faible quantité du produit.

Composé 4 : 0,7 mg, *Streptomyces albidoflavus* 19-S21, $m_{\text{extrait}} = 577$ mg



Aspect : solide amorphe blanchâtre.

$[\alpha]_D^{25.0}$: + 5 (c 0.1, CH_3OH)

Formule brute : $C_{23}H_{32}N_2O_9$

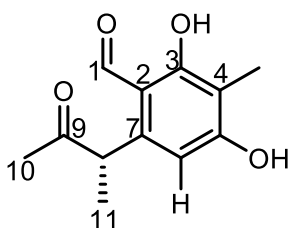
MS-ESIHR (ESI+) : 481,2192 ($[M+H]^+$, valeur calculée : 481,2181

RMN 1H (600 MHz, CH_3OH-d_4) δ_H : 8,35 (s, 1H, H-8') ; 8,25 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, H-4') ; 7,68 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, H-6') ; 6,86 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H-5') ; 5,62 (pent, $J = 6,9$ Hz, 1H, H-4) ; 5,31 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H-3) ; 4,75 (m, 1H, H-9) ; 3,70 (m, 1H, H-5'') ; 3,40

(q, $J = 8,9$ Hz, 1H, H-8) ; 2,30 (t, 1H, $J = 9,9$ Hz, H-7) ; 1,88 (m, 1H, H-2'') ; 1,83 (m, 1H, H-1'') ; 1,73 (m, 1H, H-1'') ; 1,65 (m, 1H, H-2'') ; 1,45 (m, 2H, H-4'') ; 1,41 (d, 3H, $J = 6,3$ Hz, H-10) ; 1,33 (d, 3H, $J = 6,6$ Hz, H-11) ; 1,31 (m, 2H, H-3'') ; 1,21 (d, $J = 6,2$ Hz, 3H, H-6'').

RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) δ_{C} : 177,3 (C-6) ; 172,1 (C-2) ; 172,0 (C-7') ; 162,9 (C-8') ; 154,5 (C-2') ; 129,5 (C-3') ; 127,1 (C-4') ; 125,3 (C-5') ; 119,7 (C-6') ; 117,2 (C-1') ; 78,8 (C-8) ; 78,6 (C-9) ; 73,2 (C-4) ; 69,3 (C-5'') ; 55,9 (C-3) ; 54,6 (C-7) ; 40,7 (C-4'') ; 30,9 (C-2'') ; 29,4 (C-3'') ; 28,9 (C-1'') ; 24,4 (C-6'') ; 19,6 (C-10) ; 16,3 (C-11).

Composé 5 : 1,9 mg, *Hypocrea lixii* 20-S1, $m_{\text{extrait}} = 2,1862$ g



Aspect : solide amorphe jaune

$[\alpha]_{\text{D}}^{25,0}$: + 37 (c 0,1, CH_3OH)

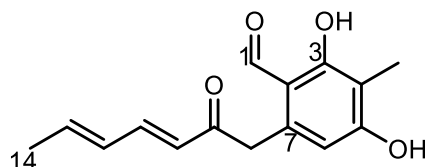
Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$

MS-ESIHR (ESI+) : 223,0968 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, valeur calculée : 223,0965

RMN ^1H (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) δ_{H} : 10,15 (s, 1H, H-1) ; 6,18 (s, 1H, H-6) ; 4,43 (q, 1H, $J = 7,2$ Hz, H-8) ; 2,07 (s, 3H, H-10) ; 2,01 (s, 3H, H-12) ; 1,37 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz, H-11).

RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) δ_{C} : 210,1 (C-9) ; 194,1 (C-1) ; 165,1 (C-3) ; 165,1 (C-5) ; 145,6 (C-7) ; 112,6 (C-2) ; 111,4 (C-4) ; 108,3 (C-6) ; 48,6 (C-8) ; 28,5 (C-10) ; 18,5 (C-11) ; 7,1 (C-12).

Composé 6 : 0,9 mg, *Hypocrea lixii* 20-S1, $m_{\text{extrait}} = 2,1862$ g



Aspect : solide amorphe jaune

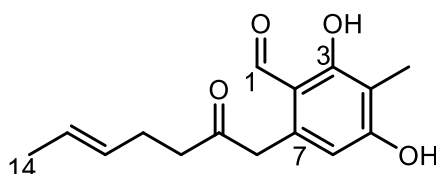
Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$

MS-ESIHR (ESI+) : 261,1121 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, valeur calculée : 261,1121

RMN ^1H (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) δ_{H} : 9,83 (s, 1H, H-1) ; 7,33 (dd, 1H, $J = 15,7$; 9,6 Hz, H-11) ; 6,30 (m, 1H, H-13) ; 6,29 (m, 1H, H-12) ; 6,21 (d, 1H, $J = 15,7$ Hz, C-10) ; 6,25 (s, 1H, H-6) ; 4,14 (s, 2H, H-8) ; 2,01 (s, 3H, H-15) ; 1,88 (d, 3H, $J = 5,7$ Hz, H-14).

RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) δ_{C} : 199,5 (C-9) ; 194,8 (C-1) ; 165,3 (C-3) ; 164,2 (C-5) ; 145,8 (C-11) ; 142,8 (C-13) ; 139,1 (C-7) ; 131,2 (C-12) ; 127,6 (C-10) ; 113,9 (C-2) ; 111,5 (C-4) ; 111,6 (C-6) ; 44,2 (C-8) ; 18,7 (C-14) ; 7,01 (C-15).

Composé 7 : 1,1 mg, *Hypocrea lixii* 20-S1, $m_{\text{extrait}} = 2,1862$ g



Aspect : solide amorphe jaune

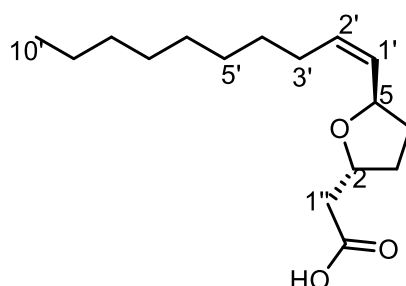
Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$

MS-ESIHR (ESI+) : 263,1278 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, valeur calculée : 263,1278)

RMN ^1H (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) δ_{H} : 9,76 (s, 1H, H-1) ; 6,23 (1H, s) ; 5,44 (dq, 1H, $J = 15,5$; 6,1 Hz, H-13) ; 5,39 (dt, 1H, $J = 15,4$; 7,1 Hz, H-12) ; 3,99 (s, 2H, H-8) ; 2,62 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, H-10) ; 2,22 (q, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-11) ; 2,01 (s, 3H, H-15) ; 1,60 (d, 3H, $J = 6,1$ Hz, H-14)

RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$) δ_{C} : 209,2 (C-9) ; 194,9 (C-1) ; 164,9 (C-3) ; 165,0 (C-5) ; 139,1 (C-7) ; 130,8 (C-12) ; 127,2 (C-13) ; 113,5 (C-4) ; 111,8 (C-6) ; 111,6 (C-2) ; 46,7 (C-8) ; 43,0 (C-10) ; 27,9 (C-11) ; 18,1 (C-14) ; 7,05 (C-15).

Composé 11 : 6,8 mg, *Emericellopsis microspora* 20-S19, $m_{\text{extrait}} = 1,1235$ g



Aspect : jaune huileux

$[\alpha]_{\text{D}}^{25.0}$: + 20 (c 0,1, CH₃OH)

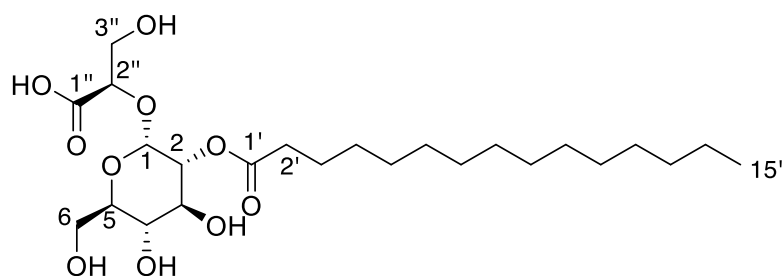
Formule brute : C₁₆H₂₈O₃

MS-ESIHR (ESI+) : 269,2111 ([M+H]⁺, valeur calculée : 269,2111)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 5,50 (dtd, 1H, $J = 10,9$; $7,5$; $0,9$ Hz, H-2') ; 5,40 (ddt, 1H, $J = 11,4$; $5,6$; $1,4$ Hz, H-1') ; 4,78 (q, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-5) ; 4,41 (qu, 1H, $J = 6,7$ Hz, H-2) ; 2,64 (dd, 1H, $J = 15,4$; $6,8$ Hz, H-1'') ; 2,55 (dd, 1H, $J = 15,8$; $7,4$ Hz, H-1'') ; 2,22 (m, 1H, H-3) ; 2,11 (m, 1H, H-4) ; 2,06 (m, 2H, H-3') ; 1,65 (m, 1H, H-3) ; 1,65 (m, 1H, H-4) ; 1,23-1,39 (m, 12H, H-4'-H-9') ; 0,87 (t, 3H, $J = 6,6$ Hz, H-10').

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 175,5 (C-2'') ; 133,1 (C-2') ; 130,1 (C-1') ; 74,9 (C-5) ; 74,8 (C-2) ; 40,5 (C-1'') ; 33,1 (C-4) ; 32,2 (C-3) ; 31,9 (C-8') ; 29,3 (C-4') ; 29,3 (C-5') ; 29,5 (C-6') ; 29,7 (C-7') ; 27,6 (C-3') ; 22,7 (C-9') ; 14,1 (C-10').

Composé 12 : 5,3 mg, *Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13, $m_{\text{extrait}} = 3,8$ g



Aspect : solide amorphe blanc

$[\alpha]_{\text{D}}^{25.0}$: + 95 (c 0,1, CH₃OH)

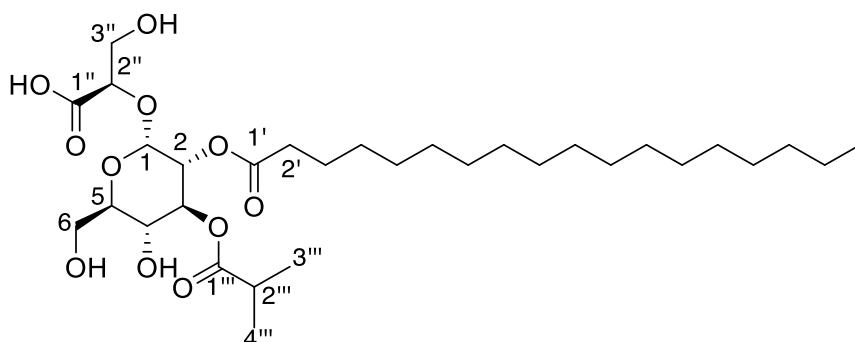
Formule brute : C₂₄H₄₄O₁₀

MS-ESIHR (ESI+) : 515,2824 ([M+Na]⁺, valeur calculée : 515,2832)

RMN ^1H (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) δ_{H} : 5,12 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, H-1) ; 4,57 (dd, 1H, $J = 10,1$; 3,6 Hz, H-2) ; 4,31 (dd, 1H, $J = 6,1$; 3,3 Hz, H-2'') ; 3,96 (dd, 1H, $J = 9,8$; 9,2 Hz, H-3) ; 3,87 (m, 1H, H-3'') ; 3,82 (m, 1H, H-6) ; 3,81 (m, 1H, H-3''') ; 3,77 (m, 1H, H-5) ; 3,69 (dd, 1H, $J = 11,8$; 5,7 Hz, H-6) ; 3,39 (dd, 1H, $J = 9,6$; 9,4 Hz, H-4) ; 2,44 (ddd, 1H, $J = 15,9$; 8,1 ; 7,7 Hz, H-2') ; 2,40 (ddd, 1H, $J = 15,5$; 8,0 ; 7,6 Hz, H-2') ; 1,64 (m, 2H, H-3') ; 1,34 (m, 2H, H-4') ; 1,28-1,30 (m, 2H, H-5'-H-12') ; 1,31 (m, 2H, H-14') ; 1,28 (m, 2H, H-13') ; 0,90 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, H-15').

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$) δ_{C} : 175,5 (C-1') ; 173,5 (C-1'') ; 96,2 (C-1) ; 77,5 (C-2'') ; 74,6 (C-2) ; 74,0 (C-5) ; 71,9 (C-6) ; 71,8 (C-3) ; 64,0 (C-3'') ; 62,5 (C-6) ; 35,1 (C-2') ; 33,1 (C-13') ; 30,8 (C-9'-C-12') ; 30,6 (C-8') ; 30,5 (C-7') ; 30,4 (C-6') ; 30,3 (C-4/5') ; 25,8 (C-3') ; 23,7 (C-14') ; 14,4 (C-15').

Composé 13 : 7,2 mg, *Nocardia otitidiscaviarum* 20-S13, $m_{\text{extrait}} = 3,8$ g



Aspect : solide amorphe blanc

$[\alpha]_{\text{D}}^{25,0}$: + 37 (c 0,1, CH_3OH)

Formule brute : $\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_{11}$,

MS-ESIHR (ESI+) : 627,3716 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), valeur calculée : 627,3720

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5,47 (dd, 1H, $J = 9,6$; 9,4 Hz, H-3) ; 5,18 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, H-1) ; 4,75 (dd, 1H, $J = 10,3$; 4,8 Hz, H-2) ; 4,35 (dd, 1H, $J = 6,1$; 3,3 Hz, H-2'') ; 3,91 (m, 1H, H-3'') ; 3,86 (m, 1H, H-3'') ; 3,85 (m, 1H, H-5) ; 3,82 (m, 1H, H-6) ; 3,72 (dd, 1H, $J = 11,5$; 3,3 Hz, H-6) ; 3,60 (dd, 1H, $J = 9,6$; 9,4 Hz, H-4) ; 2,59 (sx, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-2''') ; 2,17 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz, H-4''') ; 2,36 (ddd, 1H, $J = 15,8$; 8,0 ; 7,1 Hz, H-2') ; 2,30 (ddd, 1H, $J = 15,9$; 8,0 ; 8,0 Hz, H-2') ; 1,59 (m, 2H, H-3') ; 1,31 (m, 2H, H-17') ; 1,28-1,33 (m, 2H, H-4'-H-16') ; 1,15 (3H, d, $J = 7,1$ Hz, H-3''') ; 0,91 (3H, t, $J = 6,7$ Hz, H-18''')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 178,2 (C-1''') ; 174,7 (C-1') ; 172,7 (C-1'') ; 96,0 (C-1) ; 77,2 (C-2'') ; 74,0 (C-5) ; 73,3 (C-3) ; 72,4 (C-2) ; 69,6 (C-4) ; 63,9 (C-3'') ; 62,0 (C-

6) ; 35,3 (C-2''') ; 34,9 (C-2') ; 33,1 (C-16') ; 30,7 (C-8'-C-15') ; 30,5 (C-7') ; 30,4 (C-5'/6') ; 30,2 (C-4') ; 25,6 (C-3') ; 23,7 (C-17') ; 19,6 (C-4''') ; 19,2 (C-3''') ; 14,5 (C-18').

- L'expérience de photocycloaddition

Toutes les expériences photochimiques ont été réalisées à l'aide de deux lampes UV-B.

Pour l'expérience de photocycloaddition de la tétrodécamycine à l'état liquide, deux solutions du monomère tétrodécamycine ont été préparées : une première solution contenant 0,5 équivalent du catalyseur Triflate de cuivre (I) et 1 équivalent de tétrodécamycine et la seconde solution en absence du catalyseur. Pour ces solutions, la tétrodécamycine (1,67 mg, 0,005 mmol) a été solubilisée dans 2 ml de DMF, placé dans un cristalliseur de 8 cm de diamètre.

Pour l'expérience de photo-irradiation de la tétrodécamycine à l'état solide, cette dernière (1,67 mg, 0,005 mmol) est solubilisée dans 2 mL de CH₂Cl₂ dans un cristalliseur (8 cm de diamètre). Cette solution est ensuite laissée évaporer à température ambiante sous une atmosphère d'air normale. Une fine couche solide blanche s'est formée après l'évaporation complète du CH₂Cl₂.

Les solutions et le résidu de tétrodécamycine sont ensuite exposés à la lumière UV et enfin analysés par CL-SM/SM après 15 heures d'éclairage.

- Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires des composés ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre JascoTM P1010, équipé du logiciel Spectro Manager. La source lumineuse monochromatique est la raie D de sodium. Les expériences ont été menées avec une cuve en quartz 100 mm de 350 µL.

- Dichroïsme circulaire électronique

Des spectres de dichroïsme circulaires électroniques ont été acquis à l'aide d'un dichrographe Jasco J-815. Les expériences ont été menées avec une cuve en quartz 100 mm de 1000 µL.

- Expériences de cristallographie

Les données des expériences de cristallographie ont été enregistrées par le diffractomètre Rigaku XtaLabPro équipé d'une radiation Mo K α et un détecteur HPAD

PILATUS3 R 200K. CrysAlisPro 1.171.42.64a¹⁹⁷ a été utilisé pour le traitement des données.

¹⁹⁷ Rigaku OD (2015). CrysAlis PRO. Rigaku Oxford Diffraction, Yarnton, Oxfordshire, England.

REFERENCES

1. Saldivar-Gonzalez, F. I.; Aldas-Bulos, V. D.; Medina-Franco, J. L.; Plisson, F., Natural product drug discovery in the artificial intelligence era. *Chemical science* **2022**, *13* (6), 1526-1546.
2. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **2020**, *83*, 770-803.
3. Maithani, D.; Sharma, A.; Gangola, S.; Chaudhary, P.; Bhatt, P., Insights into applications and strategies for discovery of microbial bioactive metabolites. *Microbiological research* **2022**, *261*, 127053.
4. Swann, J. P., Milton Wainwright. *Miracle Cure: The Story of Penicillin and the Golden Age of Antibiotics*. Oxford: Basil Blackwell, 1990. Pp. xi + 196. ISBN 0-631-16492-8. £16.95. *The British Journal for the History of Science* **2009**, *25* (3), 376-377.
5. Gverzdys, T.; Nodwell, J. R., Biosynthetic Genes for the Tetrodecamycin Antibiotics. *Journal of bacteriology* **2016**, *198* (14), 1965-1973.
6. Subramani, R.; Sipkema, D., Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Marine drugs* **2019**, *17* (5), 249.
7. Butler, M. S., The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod* **2004**, *67* (12), 2141-53.
8. Rice, L. B., Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases* **2008**, *197* (8), 1079-81.
9. Schneider, Y. K., Bacterial Natural Product Drug Discovery for New Antibiotics: Strategies for Tackling the Problem of Antibiotic Resistance by Efficient Bioprospecting. *Antibiotics* **2021**, *10* (7), 842.
10. Lewis, K., The Science of Antibiotic Discovery. *Cell* **2020**, *181* (1), 29-45.
11. Dadgostar, P., Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and drug resistance* **2019**, *12*, 3903-3910.
12. Baym, M.; Stone, L. K.; Kishony, R., Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. *Science* **2016**, *351* (6268), aad3292.
13. O'Shea, R.; Moser, H. E., Physicochemical Properties of Antibacterial Compounds: Implications for Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (10), 2871-2878.
14. Teta, R.; Marteinsson, V. T.; Longeon, A.; Klonowski, A. M.; Groben, R.; Bourguet-Kondracki, M. L.; Costantino, V.; Mangoni, A., Thermoactinoamide A, an Antibiotic Lipophilic Cyclopeptide from the Icelandic Thermophilic Bacterium *Thermoactinomyces vulgaris*. *J Nat Prod* **2017**, *80* (9), 2530-2535.
15. Birer, C. Bacterial microbiota of ant's cuticle in French Guiana : antibiotic activities and community ecology. Université de Guyane, 2017.
16. Lewis, K., Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **2013**, *12* (5), 371-87.
17. Hoskisson, P. A.; Seipke, R. F., Cryptic or Silent? The Known Unknowns, Unknown Knowns, and Unknown Unknowns of Secondary Metabolism. *mBio* **2020**, *11* (5), 460-466.
18. Aigle, B.; Lautru, S.; Spitteller, D.; Dickschat, J. S.; Challis, G. L.; Leblond, P.;

- Pernodet, J. L., Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **2014**, *41* (2), 251-63.
19. Brahmachari, G., *Natural Products in Drug Discovery: Impacts and Opportunities - An Assessment*. 2011; p 1-199.
 20. White, R. A.; Callister, S. J.; Moore, R. J.; Baker, E. S.; Jansson, J. K., The past, present and future of microbiome analyses. *Nature protocols* **2016**, *11* (11), 2049-2053.
 21. Bertrand, S.; Bohni, N.; Schnee, S.; Schumpp, O.; Gindro, K.; Wolfender, J. L., Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology advances* **2014**, *32* (6), 1180-204.
 22. Boya, P. C.; Fernandez-Marin, H.; Mejia, L. C.; Spadafora, C.; Dorrestein, P. C.; Gutierrez, M., Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungus-growing ants. *Scientific reports* **2017**, *7* (1), 5604.
 23. Chagas, F. O.; Dias, L. G.; Pupo, M. T., A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. *Journal of chemical ecology* **2013**, *39* (10), 1335-42.
 24. Cho, J. Y.; Kim, M. S., Induction of antifouling diterpene production by *Streptomyces cinnabarinus* PK209 in co-culture with marine-derived *Alteromonas* sp. KNS-16. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2012**, *76* (10), 1849-54.
 25. Lewis, W. H.; Tahon, G.; Geesink, P.; Sousa, D. Z.; Ettema, T. J. G., Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature reviews. Microbiology* **2021**, *19* (4), 225-240.
 26. Du, W.; Li, L.; Nichols, K. P.; Ismagilov, R. F., SlipChip. *Lab on a chip* **2009**, *9* (16), 2286-92.
 27. Ge, Z.; Girguis, P. R.; Buie, C. R., Nanoporous microscale microbial incubators. *Lab on a chip* **2016**, *16* (3), 480-8.
 28. Lau, A. Y.; Lee, L. P.; Chan, J. W., An integrated optofluidic platform for Raman-activated cell sorting. *Lab on a chip* **2008**, *8* (7), 1116-20.
 29. Batani, G.; Bayer, K.; Boge, J.; Hentschel, U.; Thomas, T., Fluorescence in situ hybridization (FISH) and cell sorting of living bacteria. *Scientific reports* **2019**, *9* (1), 18618.
 30. Nichols, D.; Cahoon, N.; Trakhtenberg, E. M.; Pham, L.; Mehta, A.; Belanger, A.; Kanigan, T.; Lewis, K.; Epstein, S. S., Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Applied and environmental microbiology* **2010**, *76* (8), 2445-50.
 31. Berdy, B.; Spoering, A. L.; Ling, L. L.; Epstein, S. S., In situ cultivation of previously uncultivable microorganisms using the ichip. *Nature protocols* **2017**, *12* (10), 2232-2242.
 32. Jung, D.; Liu, L.; He, S., Application of in situ cultivation in marine microbial resource mining. *Marine Life Science & Technology* **2020**, *3* (2), 148-161.
 33. Aoi, Y.; Kinoshita, T.; Hata, T.; Ohta, H.; Obokata, H.; Tsuneda, S., Hollow-fiber membrane chamber as a device for in situ environmental cultivation. *Applied and environmental microbiology* **2009**, *75* (11), 3826-33.
 34. Schroeckh, V.; Scherlach, K.; Nützmann, H.-W.; Shelest, E.; Schmidt-Heck, W.; Schuemann, J.; Martin, K.; Hertweck, C.; Brakhage, A. A., Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (34), 14558-14563.
 35. Navarro-Munoz, J. C.; Selem-Mojica, N.; Mullowney, M. W.; Kautsar, S. A.;

Tryon, J. H.; Parkinson, E. I.; De Los Santos, E. L. C.; Yeong, M.; Cruz-Morales, P.; Abubucker, S.; Roeters, A.; Lokhorst, W.; Fernandez-Guerra, A.; Cappellini, L. T. D.; Goering, A. W.; Thomson, R. J.; Metcalf, W. W.; Kelleher, N. L.; Barona-Gomez, F.; Medema, M. H., A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature chemical biology* **2020**, *16* (1), 60-68.

36. Hemmerling, F.; Piel, J., Strategies to access biosynthetic novelty in bacterial genomes for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **2022**, *21* (5), 359-378.

37. Metzger, U.; Schall, C.; Zocher, G.; Unsöld, I.; Stec, E.; Li, S.-M.; Heide, L.; Stehle, T., The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (34), 14309-14314.

38. Coyle, C. M.; Panaccione, D. G., An ergot alkaloid biosynthesis gene and clustered hypothetical genes from *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology* **2005**, *71* (6), 3112-8.

39. Lima, S. T.; Fallon, T. R.; Cordoza, J. L.; Chekan, J. R.; Delbaje, E.; Hopiavuori, A. R.; Alvarenga, D. O.; Wood, S. M.; Luhavaya, H.; Baumgartner, J. T.; Dorr, F. A.; Etchegaray, A.; Pinto, E.; McKinnie, S. M. K.; Fiore, M. F.; Moore, B. S., Biosynthesis of Guanitoxin Enables Global Environmental Detection in Freshwater Cyanobacteria. *J Am Chem Soc* **2022**, *144* (21), 9372-9379.

40. Van der Hooft, J. J. J.; Mohimani, H.; Bauermeister, A.; Dorrestein, P. C.; Duncan, K. R.; Medema, M. H., Linking genomics and metabolomics to chart specialized metabolic diversity. *Chemical Society reviews* **2020**, *49* (11), 3297-3314.

41. Kautsar, S. A.; Blin, K.; Shaw, S.; Navarro-Munoz, J. C.; Terlouw, B. R.; van der Hooft, J. J. J.; van Santen, J. A.; Tracanna, V.; Suarez Duran, H. G.; Pascal Andreu, V.; Selem-Mojica, N.; Alanjary, M.; Robinson, S. L.; Lund, G.; Epstein, S. C.; Sisto, A. C.; Charkoudian, L. K.; Collemare, J.; Lington, R. G.; Weber, T.; Medema, M. H., MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic acids research* **2020**, *48* (D1), D454-D458.

42. Hautbergue, T.; Jamin, E. L.; Debrauwer, L.; Puel, O.; Oswald, I. P., From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. *Natural product reports* **2018**, *35* (2), 147-173.

43. Schneider, O.; Simic, N.; Aachmann, F. L.; Ruckert, C.; Kristiansen, K. A.; Kalinowski, J.; Jiang, Y.; Wang, L.; Jiang, C. L.; Lale, R.; Zotchev, S. B., Genome Mining of *Streptomyces* sp. YIM 130001 Isolated From Lichen Affords New Thiopeptide Antibiotic. *Frontiers in microbiology* **2018**, *9*, 3139.

44. Singer, G. A. C.; Hickey, D. A., Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. *Gene* **2003**, *317*, 39-47.

45. Gromiha, M. M., Important inter-residue contacts for enhancing the thermal stability of thermophilic proteins. *Biophysical Chemistry* **2001**, *91* (1), 71-77.

46. Vieille, C.; Epting, K. L.; Kelly, R. M.; Zeikus, J. G., Bivalent cations and amino-acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase. *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268* (23), 6291-6301.

47. Mahajan, G. B.; Balachandran, L., Sources of antibiotics: Hot springs. *Biochemical pharmacology* **2017**, *134*, 35-41.

48. Shrivata, L.; Satyanarayana, T., Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. *Frontiers in microbiology* **2015**, *6*, 1014.

49. Mehta, R.; Singhal, P.; Singh, H.; Damle, D.; Sharma, A. K., Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech* **2016**, *6* (1), 81.

50. Arena, A.; Gugliandolo, C.; Stassi, G.; Pavone, B.; Iannello, D.; Bisignano, G.; Maugeri, T. L., An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology letters* **2009**, *123* (2), 132-7.
51. Mizerakis, P.; Stathopoulou, P.; Tsiamis, G.; Baeshen, M. N.; Mahyoub, J. A.; Elazzazy, A. M.; Bellou, S.; Sakoulogeorga, E.; Triantaphyllidou, I.-E.; Mazioti, T.; Katsoris, P.; Aggelis, G., Bacterial diversity of the outflows of a Polichnitos (Lesvos, Greece) hot spring, laboratory studies of a Cyanobacterium sp. strain and potential medical applications. *Annals of Microbiology* **2017**, *67* (10), 643-654.
52. Kosznik-Kwasnicka, K.; Golec, P.; Jaroszewicz, W.; Lubomska, D.; Piechowicz, L., Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. *Microorganisms* **2022**, *10* (2), 222.
53. Herold, K.; Gollmick, F. A.; Groth, I.; Roth, M.; Menzel, K. D.; Mollmann, U.; Grafe, U.; Hertweck, C., Cervimycin A-D: a polyketide glycoside complex from a cave bacterium can defeat vancomycin resistance. *Chemistry* **2005**, *11* (19), 5523-30.
54. Paun, V. I.; Lavin, P.; Chifiriuc, M. C.; Purcarea, C., First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core. *Scientific reports* **2021**, *11* (1), 514.
55. Nakaew, N.; Pathom-aree, W.; Lumyong, S., Generic Diversity of Rare Actinomycetes from Thai Cave Soils and Their Possible Use as New Bioactive Compounds. *Actinomycetologica* **2009**, *23*, 21-26.
56. Hohmann, C.; Schneider, K.; Bruntner, C.; Irran, E.; Nicholson, G.; Bull, A. T.; Jones, A. L.; Brown, R.; Stach, J. E.; Goodfellow, M.; Beil, W.; Kramer, M.; Imhoff, J. F.; Sussmuth, R. D.; Fiedler, H. P., Caboxamycin, a new antibiotic of the benzoxazole family produced by the deep-sea strain *Streptomyces* sp. NTK 937. *J Antibiot (Tokyo)* **2009**, *62* (2), 99-104.
57. Imai, Y.; Meyer, K. J.; Iinishi, A.; Favre-Godal, Q.; Green, R.; Manuse, S.; Caboni, M.; Mori, M.; Niles, S.; Ghiglieri, M.; Honrao, C.; Ma, X.; Guo, J. J.; Makriyannis, A.; Linares-Otoya, L.; Böhringer, N.; Wuisan, Z. G.; Kaur, H.; Wu, R.; Mateus, A.; Typas, A.; Savitski, M. M.; Espinoza, J. L.; O'Rourke, A.; Nelson, K. E.; Hiller, S.; Noinaj, N.; Schäberle, T. F.; D'Onofrio, A.; Lewis, K., A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature* **2019**, *576* (7787), 459-464.
58. Tobias, N. J.; Shi, Y. M.; Bode, H. B., Refining the Natural Product Repertoire in Entomopathogenic Bacteria. *Trends in microbiology* **2018**, *26* (10), 833-840.
59. Watrous, J.; Roach, P.; Alexandrov, T.; Heath, B. S.; Yang, J. Y.; Kersten, R. D.; Voort, M. v. d.; Pogliano, K.; Gross, H.; Raaijmakers, J. M.; Moore, B. S.; Laskin, J.; Bandeira, N.; Dorrestein, P. C., Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109* (26), E1743-E1752.
60. Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kaponov, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crusemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrewe, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; P, C. A. B.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D.

- P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. O.; Pogliano, K.; Lington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N., Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology* **2016**, *34* (8), 828-837.
61. Floros, D. J.; Jensen, P. R.; Dorrestein, P. C.; Koyama, N., A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society* **2016**, *12* (9), 145.
62. Fox Ramos, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A., Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Natural product reports* **2019**, *36* (7), 960-980.
63. Buedenbender, L.; Robertson, L. P.; Lucantoni, L.; Avery, V. M.; Kurtboke, D. I.; Carroll, A. R., HSQC-TOCSY Fingerprinting-Directed Discovery of Antiplasmodial Polyketides from the Marine Ascidian-Derived *Streptomyces* sp. (USC-16018). *Marine drugs* **2018**, *16* (6), 189.
64. Buedenbender, L.; Habener, L. J.; Grkovic, T.; Kurtboke, D. I.; Duffy, S.; Avery, V. M.; Carroll, A. R., HSQC-TOCSY Fingerprinting for Prioritization of Polyketide- and Peptide-Producing Microbial Isolates. *J. Nat Prod* **2018**, *81* (4), 957-965.
65. Castro-Falcon, G.; Millan-Aguinaga, N.; Roullier, C.; Jensen, P. R.; Hughes, C. C., Nitrosopyridine Probe To Detect Polyketide Natural Products with Conjugated Alkenes: Discovery of Novodaryamide and Nocarditriene. *ACS chemical biology* **2018**, *13* (11), 3097-3106.
66. Cox, C. L.; Tietz, J. I.; Sokolowski, K.; Melby, J. O.; Doroghazi, J. R.; Mitchell, D. A., Nucleophilic 1,4-additions for natural product discovery. *ACS chemical biology* **2014**, *9* (9), 2014-22.
67. Riva, E.; Wilkening, I.; Gazzola, S.; Li, W. M.; Smith, L.; Leadlay, P. F.; Tosin, M., Chemical probes for the functionalization of polyketide intermediates. *Angewandte Chemie* **2014**, *53* (44), 11944-9.
68. Simon-Colin, C.; Alain, K.; Colin, S.; Cozien, J.; Costa, B.; Guezenec, J. G.; Ragueneas, G. H., A novel mcl PHA-producing bacterium, *Pseudomonas guezennei* sp. nov., isolated from a 'kopara' mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. *Journal of applied microbiology* **2008**, *104* (2), 581-6.
69. Darwin, C., *The structure and distribution of coral reefs. Being the first part of the Geology of the voyage of the Beagle, under the command of Capt. Fitzroy, R.N. during the years 1832 to 1836.* London : Smith, Elder, : London, 1842.
70. Labrosse, S. Des îles hautes aux atolls : une histoire du plancher océanique 2010. <https://planet-terre.ens-lyon.fr/ressource/ile-haute-atoll.xml>.
71. Droxler, A. W.; Jorry, S. J., The origin of modern atolls: Challenging Darwin's deeply ingrained theory. *Annual Review of Marine Science* **2021**, *13*, 537-573.
72. Lacombe, P.; Charleux, F.; Ollier, C.; Orempuller, J.; Raapoto, J. M.; Laurent, M.; Paia, M.; Vernaudon, J.; Teikitumenava, E., *50 ans de recherche pour le*

développement en Polynésie française. IRD: Marseille, 2013; p 141.

73. Raguénès, G.; Moppert, X.; Richert, L.; Ratiskol, J.; Payri, C.; Costa, B.; Guezennec, J., A Novel Exopolymer-Producing Bacterium, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae*, Isolated from a "Kopara" Mat Located in Rangiroa, an Atoll of French Polynesia. *Current microbiology* **2004**, *49*, 145-51.

74. Che, L. M.; Andréfouët, S.; Bothorel, V.; Guezennec, M.; Rougeaux, H.; Guezennec, J.; Deslandes, E.; Trichet, J.; Matheron, R.; Champion, T. L.; Payri, C.; Caumette, P., Physical, chemical, and microbiological characteristics of microbial mats (KOPARA) in the South Pacific atolls of French Polynesia. *Canadian Journal of Microbiology* **2001**, *47* (11), 994-1012.

75. Rougerie, F., Les mares à kopara : pièges à phosphates des atolls. *Tahiti Pacifique* **1995**, (47), 42-43.

76. Guézennec, J.; Moppert, X.; Raguénès, G.; Richert, L.; Costa, B.; Simon-Colin, C., Microbial mats in French Polynesia and their biotechnological applications. *Process Biochemistry* **2011**, *46* (1), 16-22.

77. Charpy-Roubaud, C.; Larkum, A. W. D., Dinitrogen fixation by exposed communities on the rim of Tikehau atoll (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Coral Reefs* **2005**, *24* (4), 622-628.

78. Richert, L.; Roland, L.; Annie, H.; Claude, P., Cyanobacterial populations that build 'kopara' microbial mats in Rangiroa, Tuamotu Archipelago, French Polynesia. *European Journal of Phycology (0967-0262) (Taylor & Francis), 2006-08*, Vol. 41, N. 3, P. 259-279 **2006**, 41.

79. Berdy, J., Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)* **2012**, *65* (8), 385-95.

80. Le Goff, G.; Lopes, P.; Arcile, G.; Vlachou, P.; Van Elslande, E.; Retailleau, P.; Gallard, J. F.; Weis, M.; Benayahu, Y.; Fokialakis, N.; Ouazzani, J., Impact of the Cultivation Technique on the Production of Secondary Metabolites by *Chrysosporium lobatum* TM-237-S5, Isolated from the Sponge *Acanthella cavernosa*. *Marine drugs* **2019**, *17* (12), 678.

81. 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*, 395.

82. Nothias, L. F.; Petras, D.; Schmid, R.; Duhrkop, K.; Rainer, J.; Sarvepalli, A.; Protsyuk, I.; Ernst, M.; Tsugawa, H.; Fleischauer, M.; Aicheler, F.; Aksenov, A. A.; Alka, O.; Allard, P. M.; Barsch, A.; Cachet, X.; Caraballo-Rodriguez, A. M.; Da Silva, R. R.; Dang, T.; Garg, N.; Gauglitz, J. M.; Gurevich, A.; Isaac, G.; Jarmusch, A. K.; Kamenik, Z.; Kang, K. B.; Kessler, N.; Koester, I.; Korf, A.; Le Gouellec, A.; Ludwig, M.; Martin, H. C.; McCall, L. I.; McSayles, J.; Meyer, S. W.; Mohimani, H.; Morsy, M.; Moyne, O.; Neumann, S.; Neuweger, H.; Nguyen, N. H.; Nothias-Esposito, M.; Paolini, J.; Phelan, V. V.; Pluskal, T.; Quinn, R. A.; Rogers, S.; Shrestha, B.; Tripathi, A.; van der Hooff, J. J. J.; Vargas, F.; Weldon, K. C.; Witting, M.; Yang, H.; Zhang, Z.; Zubeil, F.; Kohlbacher, O.; Bocker, S.; Alexandrov, T.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C., Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature methods* **2020**, *17* (9), 905-908.

83. Allard, P. M.; Péresse, T.; Bisson, J.; Gindro, K.; Marcourt, L.; Pham, V. C.; Roussi, F.; Litaudon, M.; Wolfender, J. L., Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Analytical chemistry* **2016**, *88* (6), 3317-23.

84. Rutz, A.; Dounoue-Kubo, M.; Ollivier, S.; Bisson, J.; Bagheri, M.; Saesong, T.;

Ebrahimi, S. N.; Ingkaninan, K.; Wolfender, J. L.; Allard, P. M., Taxonomically Informed Scoring Enhances Confidence in Natural Products Annotation. *Frontiers in plant science* **2019**, *10*, 1329.

85. da Silva, R. R.; Wang, M.; Nothias, L. F.; van der Hooft, J. J. J.; Caraballo-Rodriguez, A. M.; Fox, E.; Balunas, M. J.; Klassen, J. L.; Lopes, N. P.; Dorrestein, P. C., Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. *PLoS computational biology* **2018**, *14* (4), e1006089.

86. Rong, X.; Guo, Y.; Huang, Y., Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *solvifaciens*. *Systematic and applied microbiology* **2009**, *32* (5), 314-22.

87. Mai, P. Y.; Le Goff, G.; Poupon, E.; Lopes, P.; Moppert, X.; Costa, B.; Beniddir, M. A.; Ouazzani, J., Solid-Phase Extraction Embedded Dialysis (SPEED), an Innovative Procedure for the Investigation of Microbial Specialized Metabolites. *Marine drugs* **2021**, *19* (7), 371.

88. Lamichhane, S.; Sen, P.; Dickens, A. M.; Hyötyläinen, T.; Orešič, M., An Overview of Metabolomics Data Analysis: Current Tools and Future Perspectives. **2018**, *82*, 387-413.

89. Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kaponov, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W. T.; Crusemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderon, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C. C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrewe, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C. C.; Yang, Y. L.; Humpf, H. U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; P, C. A. B.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.; Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodriguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P. M.; Phapale, P.; Nothias, L. F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J. L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D. T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Muller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. O.; Pogliano, K.; Lington, R. G.; Gutierrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N., Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnology* **2016**, *34* (8), 828-837.

90. Liu, J.; Zhu, X.; Kim, S. J.; Zhang, W., Antimycin-type depsipeptides: discovery, biosynthesis, chemical synthesis, and bioactivities. *Natural product reports* **2016**, *33* (10), 1146-65.

91. Li, H.; Huang, H.; Hou, L.; Ju, J.; Li, W., Discovery of Antimycin-Type Depsipeptides from a wbl Gene Mutant Strain of Deepsea-Derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66 and Their Effects on Pro-inflammatory Cytokine Production. *Frontiers in microbiology* **2017**, *8*, 678.

92. Tsuchida, T.; Sawa, R.; Iinuma, H.; Nishida, C.; Kinoshita, N.; Takahashi, Y.;

- Naganawa, H.; Sawa, T.; Hamada, M.; Takeuchi, T., Tetrodecamycin, a new antimicrobial antibiotic from *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* **1994**, *47* (3), 386-8.
93. Tsuchida, T.; Iinuma, H.; Nishida, C.; Kinoshita, N.; Sawa, T.; Hamada, M.; Takeuchi, T., Tetrodecamycin and dihydrotetrodecamycin, new antimicrobial antibiotics against *Pasteurella piscicida* produced by *Streptomyces nashvillensis* MJ885-mF8. I. Taxonomy, fermentation, isolation, characterization and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **1995**, *48* (10), 1104-9.
94. Tsuchida, T.; Iinuma, H.; Sawa, R.; Takahashi, Y.; Nakamura, H.; Nakamura, K. T.; Sawa, T.; Naganawa, H.; Takeuchi, T., Tetrodecamycin and dihydrotetrodecamycin, new antimicrobial antibiotics against *Pasteurella piscicida* produced by *Streptomyces nashvillensis* MJ885-mF8. II. Structure determination. *J Antibiot (Tokyo)* **1995**, *48* (10), 1110-4.
95. Liu, R. X.; Ma, S. F.; Chen, Y. L.; Ma, L. F.; Wang, J. D.; Zhan, Z. J., Tetrodecadazinone, a novel tetrodecamycin-pyridazinone hybrid with anti-liver fibrosis activity from *Streptomyces* sp. HU051. *Bioorganic chemistry* **2022**, *119*, 105573.
96. Liu, J.; Liu, A.; Hu, Y., Enzymatic dimerization in the biosynthetic pathway of microbial natural products. *Natural product reports* **2021**, *38* (8), 1469-1505.
97. Poplata, S.; Troster, A.; Zou, Y. Q.; Bach, T., Recent Advances in the Synthesis of Cyclobutanes by Olefin [2+2] Photocycloaddition Reactions. *Chemical reviews* **2016**, *116* (17), 9748-815.
98. Ermanis, K.; Parkes, K. E. B.; Agback, T.; Goodman, J. M., The optimal DFT approach in DP4 NMR structure analysis - pushing the limits of relative configuration elucidation. *Org Biomol Chem* **2019**, *17* (24), 5886-5890.
99. Yan, L. L.; Han, N. N.; Zhang, Y. Q.; Yu, L. Y.; Chen, J.; Wei, Y. Z.; Li, Q. P.; Tao, L.; Zheng, G. H.; Yang, S. E.; Jiang, C. X.; Zhang, X. D.; Huang, Q.; Habdin, X.; Hu, Q. B.; Li, Z.; Liu, S. W.; Zhang, Z. Z.; He, Q. Y.; Si, S. Y.; Sun, C. H., Antimycin A18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant. *J Antibiot (Tokyo)* **2010**, *63* (5), 259-61.
100. Xu, L. Y.; Quan, X. S.; Wang, C.; Sheng, H. F.; Zhou, G. X.; Lin, B. R.; Jiang, R. W.; Yao, X. S., Antimycins A(19) and A(20), two new antimycins produced by marine actinomycete *Streptomyces antibioticus* H74-18. *J Antibiot (Tokyo)* **2011**, *64* (10), 661-665.
101. Wang, F.; Fu, S. N.; Bao, Y. X.; Yang, Y.; Shen, H. F.; Lin, B. R.; Zhou, G. X., Kitamycin C, a new antimycin-type antibiotic from *Streptomyces antibioticus* strain 200-09. *Natural product research* **2017**, *31* (15), 1819-1824.
102. Vieweg, L.; Reichau, S.; Schobert, R.; Leadlay, P. F.; Sussmuth, R. D., Recent advances in the field of bioactive tetronates. *Natural product reports* **2014**, *31* (11), 1554-84.
103. Chaverri, P.; Samuels, G., *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. *Mycological Progress* **2002**, *1*, 283-286.
104. Vinale, F.; Marra, R.; Scala, F.; Ghisalberti, E. L.; Lorito, M.; Sivasithamparam, K., Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in applied microbiology* **2006**, *43* (2), 143-8.
105. Laakso, J. A.; Rauli, R.; McElhaney-Feser, G. E.; Actor, P.; Underiner, T. L.; Hotovec, B. J.; Mocek, U.; Cihlar, R. L.; Broedel, S. E., Jr., CT2108A and B: New fatty acid synthase inhibitors as antifungal agents. *J Nat Prod* **2003**, *66* (8), 1041-6.
106. Zhang, D.; Li, X.; Kang, J. S.; Choi, H. D.; Jung, J. H.; Son, B. W., Redoxcitrinin, a biogenetic precursor of citrinin from marine isolate of fungus *Penicillium* sp. *J*

Microbiol Biotechnol **2007**, *17* (5), 865-7.

107. Zhang; Dahai; Xianguo, L.; Jung Sook, K.; Hong Dae, C., Redoxcitinin, a Biogenetic Precursor of Citrinin from Marine Isolate of Fungus *Penicillium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *17* (5), 865-867.

108. Pavesi, C.; Flon, V.; Mann, S.; Leleu, S.; Prado, S.; Franck, X., Biosynthesis of azaphilones: a review. *Natural product reports* **2021**, *38* (6), 1058-1071.

109. Gao, J. M.; Yang, S. X.; Qin, J. C., Azaphilones: chemistry and biology. *Chemical reviews* **2013**, *113* (7), 4755-811.

110. Gerke, J.; Bayram, O.; Feussner, K.; Landesfeind, M.; Shelest, E.; Feussner, I.; Braus, G. H., Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Applied and environmental microbiology* **2012**, *78* (23), 8234-44.

111. Cox, R. J.; Skellam, E. J., *1.09 - Fungal Non-Reducing Polyketide Synthases*. Elsevier: Oxford, 2020; p 266-312.

112. Ahuja, M.; Chiang, Y. M.; Chang, S. L.; Praseuth, M. B.; Entwistle, R.; Sanchez, J. F.; Lo, H. C.; Yeh, H. H.; Oakley, B. R.; Wang, C. C., Illuminating the diversity of aromatic polyketide synthases in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (19), 8212-21.

113. Suzuki, T.; Tanemura, K.; Okada, C.; Arai, T. L. K.; Awaji, A.; Shimizu, T.; Horaguchi, T., Synthesis of 7-acetyloxy-3,7-dimethyl-7,8-dihydro-6H-isochromene-6,8-dione and its analogues. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2001**, *38* (6), 1409-1418.

114. Storm, P. A.; Herbst, D. A.; Maier, T.; Townsend, C. A., Functional and Structural Analysis of Programmed C-Methylation in the Biosynthesis of the Fungal Polyketide Citrinin. *Cell chemical biology* **2017**, *24* (3), 316-325.

115. Banfi, D.; Patiny, L., www.nmrdb.org: Resurrecting and Processing NMR Spectra On-line. *CHIMIA* **2008**, *62* (4), 280.

116. Asai, T.; Yamamoto, T.; Oshima, Y., Aromatic Polyketide Production in *Cordyceps indigotica*, an Entomopathogenic Fungus, Induced by Exposure to a Histone Deacetylase Inhibitor. *Organic letters* **2012**, *14* (8), 2006-2009.

117. Wu, G.; Dentinger, B. T. M.; Nielson, J. R.; Peterson, R. T.; Winter, J. M., Emerimicins V-X, 15-Residue Peptaibols Discovered from an *Acremonium* sp. through Integrated Genomic and Chemical Approaches. *J Nat Prod* **2021**, *84* (4), 1113-1126.

118. Inostroza, A.; Lara, L.; Paz, C.; Perez, A.; Galleguillos, F.; Hernandez, V.; Becerra, J.; Gonzalez-Rocha, G.; Silva, M., Antibiotic activity of Emerimicin IV isolated from *Emericellopsis minima* from Talcahuano Bay, Chile. *Natural product research* **2018**, *32* (11), 1361-1364.

119. Argoudelis, A. D.; Johnson, L. E., Emerimicins II, 3 and IV, antibiotics produced by *Emericellopsis microspora* in media supplemented with trans-4-n-propyl-L-proline. *J Antibiot (Tokyo)* **1974**, *27* (4), 274-82.

120. Slomczynska, U.; Beusen, D. D.; Zabrocki, J.; Kociolek, K.; Redlinski, A.; Reusser, F.; Hutton, W. C.; Leplawy, M. T.; Marshall, G. R., Emerimicins III and IV and their ethylalanine¹² epimers. Facilitated chemical-enzymatic synthesis and a qualitative evaluation of their solution structures. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (11), 4095-4106.

121. Mihailović, M. L.; Mamuzić, R. I.; Žigić-Mamuzić, L.; Bošnjak, J.; Čeković, Ž., Assignment of cis-trans configuration to constitutionally symmetrical 2,5-dialkyl-tetrahydrofurans. *Tetrahedron* **1967**, *23* (1), 215-226.

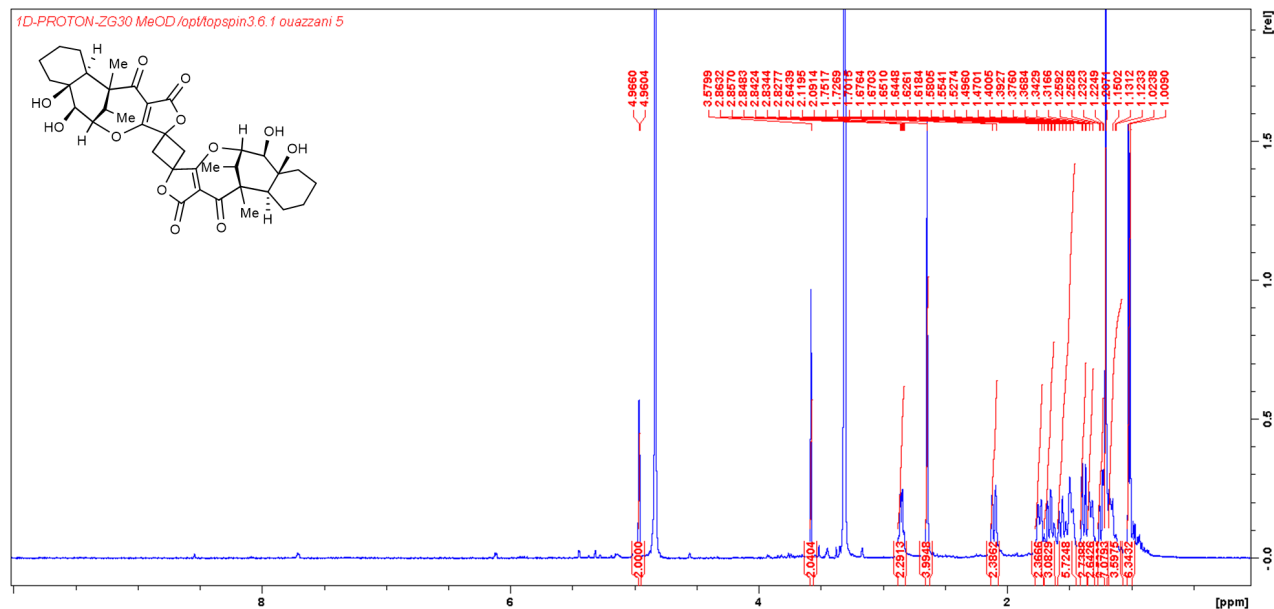
122. Komaki, H.; Ichikawa, N.; Hosoyama, A.; Takahashi-Nakaguchi, A.; Matsuzawa,

- T.; Suzuki, K.-i.; Fujita, N.; Gono, T., Genome based analysis of type-I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in seven strains of five representative *Nocardia* species. *BMC Genomics* **2014**, *15* (1), 323.
123. Luo, Q.; Hiessl, S.; Steinbuchel, A., Functional diversity of *Nocardia* in metabolism. *Environmental microbiology* **2014**, *16* (1), 29-48.
124. Zeinali, M.; Vossoughi, M.; Ardestani, S. K., Naphthalene metabolism in *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic microorganism. *Chemosphere* **2008**, *72* (6), 905-9.
125. Mikami, Y.; Yu, S. F.; Yazawa, K.; Fukushima, K.; Maeda, A.; Uno, J.; Terao, K.; Saito, N.; Kubo, A.; Suzuki, K., A toxic substance produced by *Nocardia otitidiscaviarum* isolated from cutaneous nocardiosis. *Mycopathologia* **1990**, *112* (2), 113-8.
126. Miyairi, N.; Sakai, H.; Konomi, T.; Imanaka, H., Enterocin, a new antibiotic taxonomy, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1976**, *29* (3), 227-35.
127. Saurav, K.; Zhang, Q.-b.; Li, S.; Zhang, W.-j.; Tian, X.-P.; Li, H.; Zhang, H., Isolation and characterisation of Enterocins from marine *Streptomyces* sp. SCSIO 11863. *Natural Product Research and Development* **2014**, (26), 1216-1220.
128. Casaus, P.; Nilsen, T.; Cintas, L. M.; Nes, I. F.; Hernández, P. E.; Holo, H., Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* **1997**, *143* (Pt 7), 2287-2294.
129. Wu, Y.; Pang, X.; Wu, Y.; Liu, X.; Zhang, X., Enterocins: Classification, Synthesis, Antibacterial Mechanisms and Food Applications. *Molecules* **2022**, *27* (7), 2258.
130. Cowled, M. S.; Vuong, D.; Crombie, A.; Lacey, E.; Karuso, P.; Piggott, A. M., The chemical gymnastics of enterocin: evidence for stereodivergence in Nature. *Org Biomol Chem* **2020**, *18* (30), 5879-5890.
131. Koser, L.; Grassin, C.; Merten, C.; Bach, T., Absolute Configuration of the Polyketide Natural Product (-)-Enterocin. *Organic letters* **2022**, *24* (38), 6903-6907.
132. Lentzen, G.; Schwarz, T., Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Applied microbiology and biotechnology* **2006**, *72* (4), 623-34.
133. Becker, J.; Wittmann, C., Microbial production of extremolytes - high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. *Current opinion in biotechnology* **2020**, *65*, 118-128.
134. Quiros-Guerrero, L.-M.; Nothias, L.-F.; Gaudry, A.; Marcourt, L.; Allard, P.-M.; Rutz, A.; David, B.; Queiroz, E. F.; Wolfender, J.-L., Inventa: a computational tool to discover chemical novelty in natural extracts libraries. *bioRxiv* **2022**.
135. Le Goff, G.; Martin, M. T.; Iorga, B. I.; Adelin, E.; Servy, C.; Cortial, S.; Ouazzani, J., Isolation and characterization of unusual hydrazides from *Streptomyces* sp. impact of the cultivation support and extraction procedure. *J Nat Prod* **2013**, *76* (2), 142-9.
136. Chambers, M. C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D. L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; Hoff, K.; Kessner, D.; Tasman, N.; Shulman, N.; Frewen, B.; Baker, T. A.; Brusniak, M. Y.; Paulse, C.; Creasy, D.; Flashner, L.; Kani, K.; Moulding, C.; Seymour, S. L.; Nuwaysir, L. M.; Lefebvre, B.; Kuhlmann, F.; Roark, J.; Rainer, P.; Detlev, S.; Hemenway, T.; Huhmer, A.; Langridge, J.; Connolly, B.; Chadick, T.; Holly, K.; Eckels, J.; Deutsch, E. W.; Moritz, R. L.; Katz, J. E.; Agus, D. B.; MacCoss, M.; Tabb, D. L.; Mallick, P., A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature biotechnology* **2012**, *30* (10), 918-20.

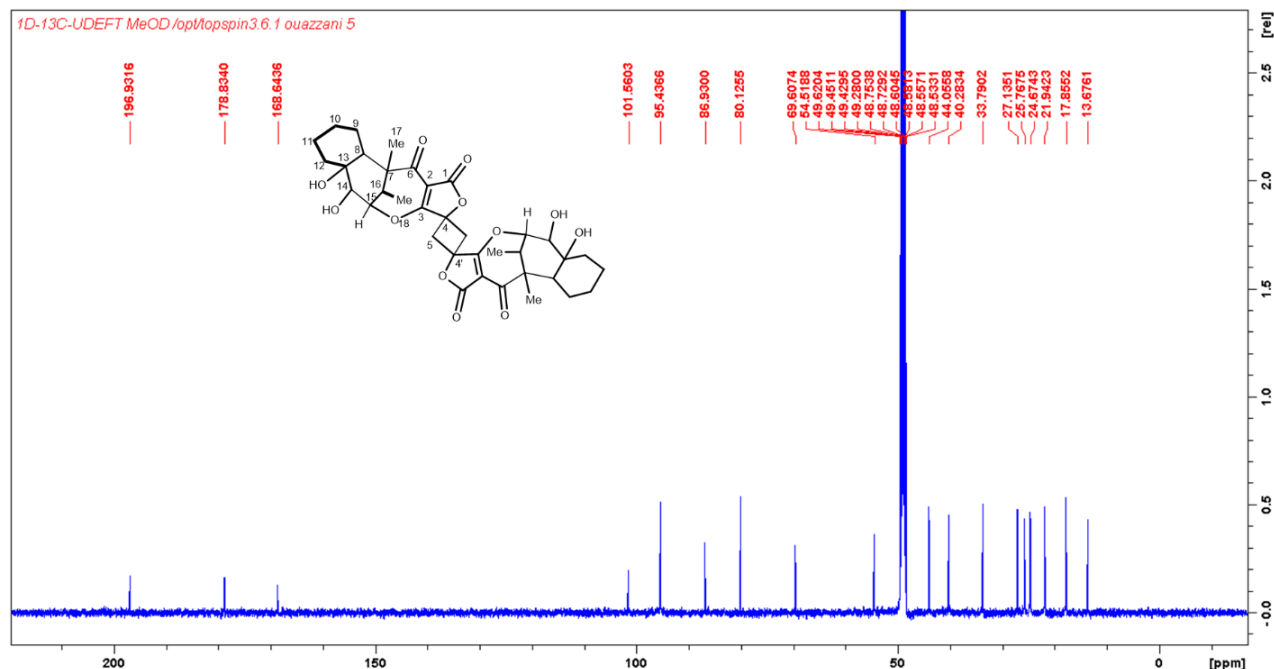
137. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N. S.; Wang, J. T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T., Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **2003**, *13* (11), 2498-504.

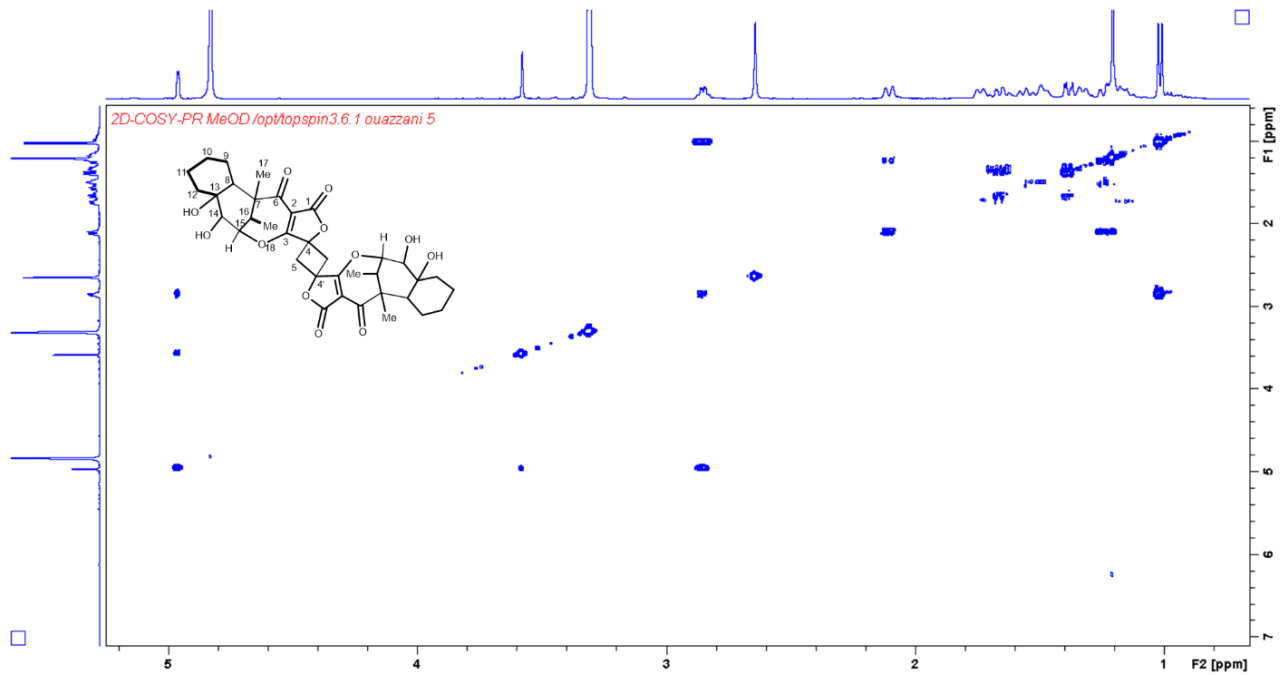
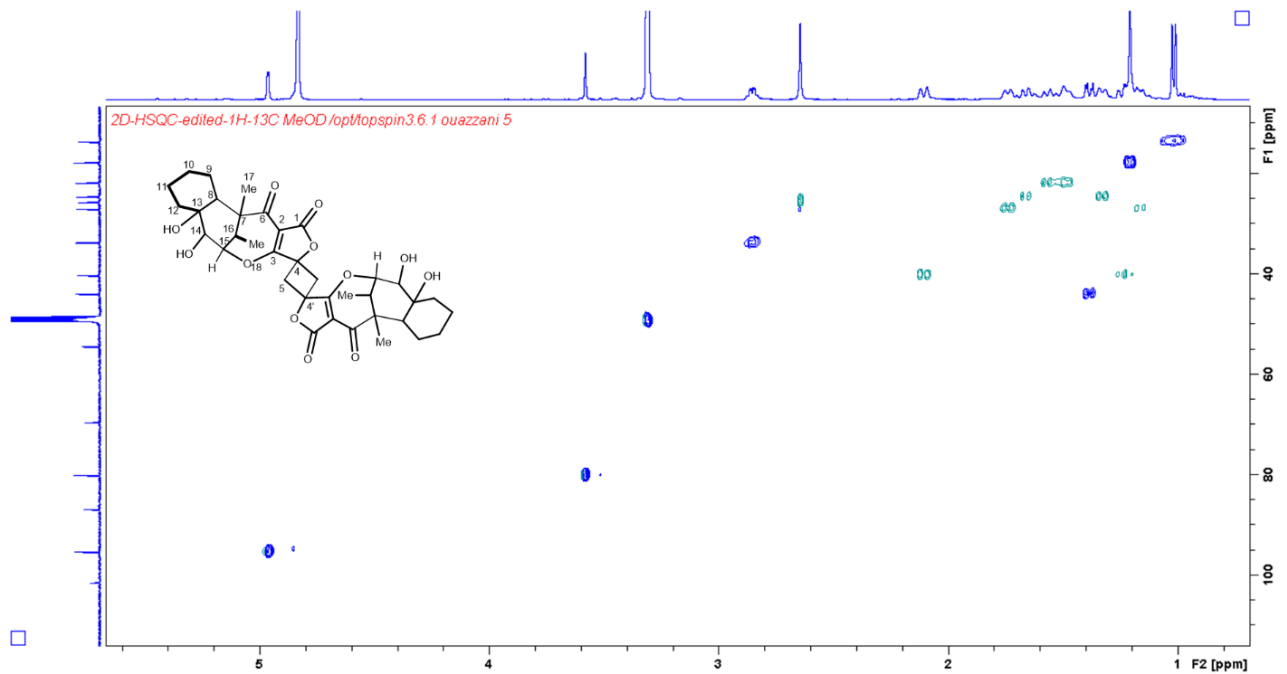
ANNEXES

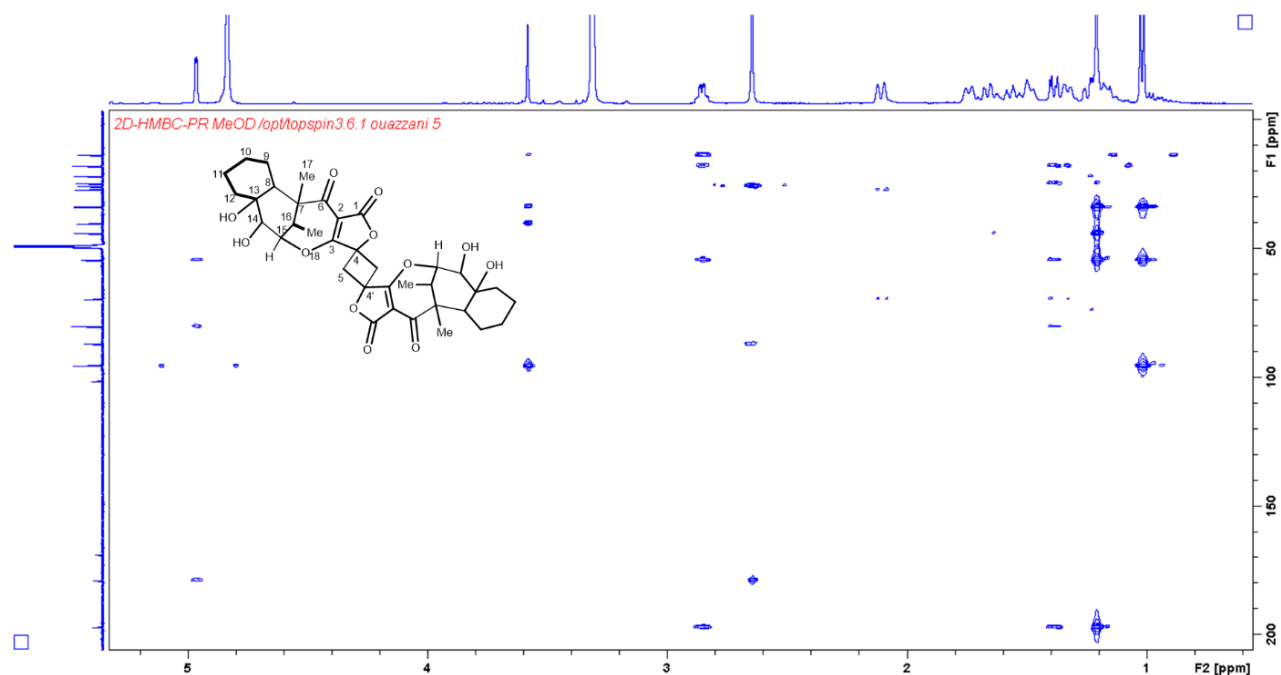
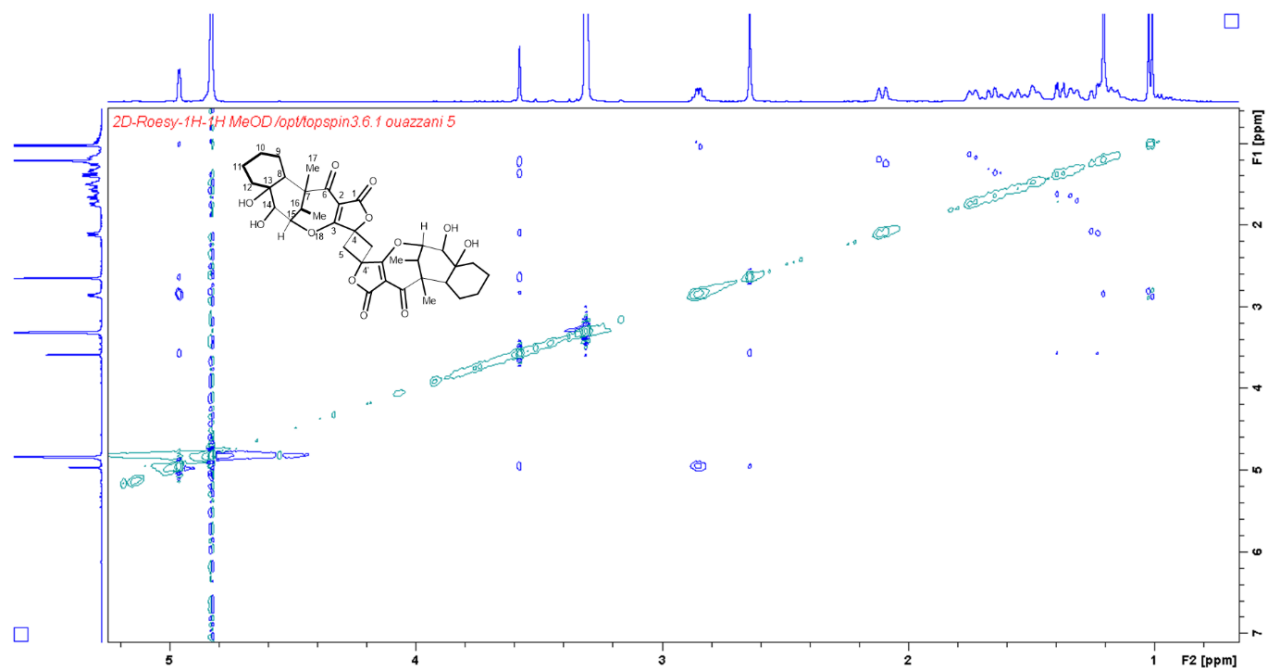
Annexe S1 : Spectre ^1H RMN du composé **2** (500 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)

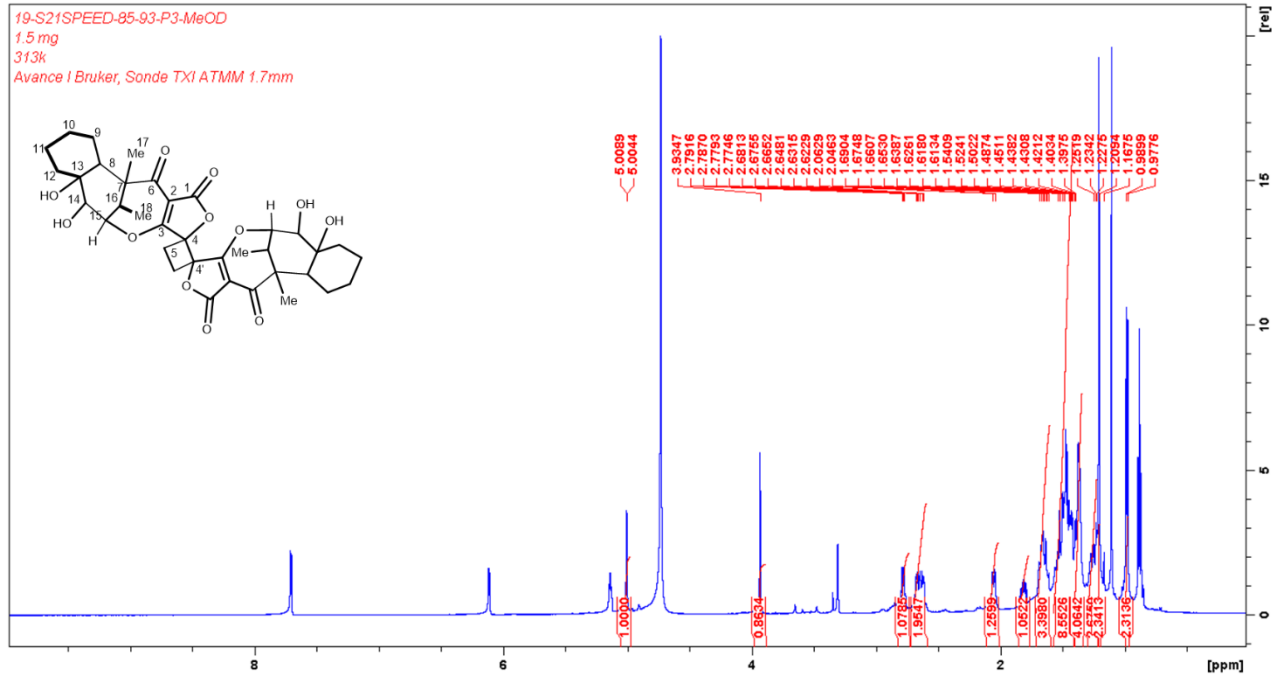
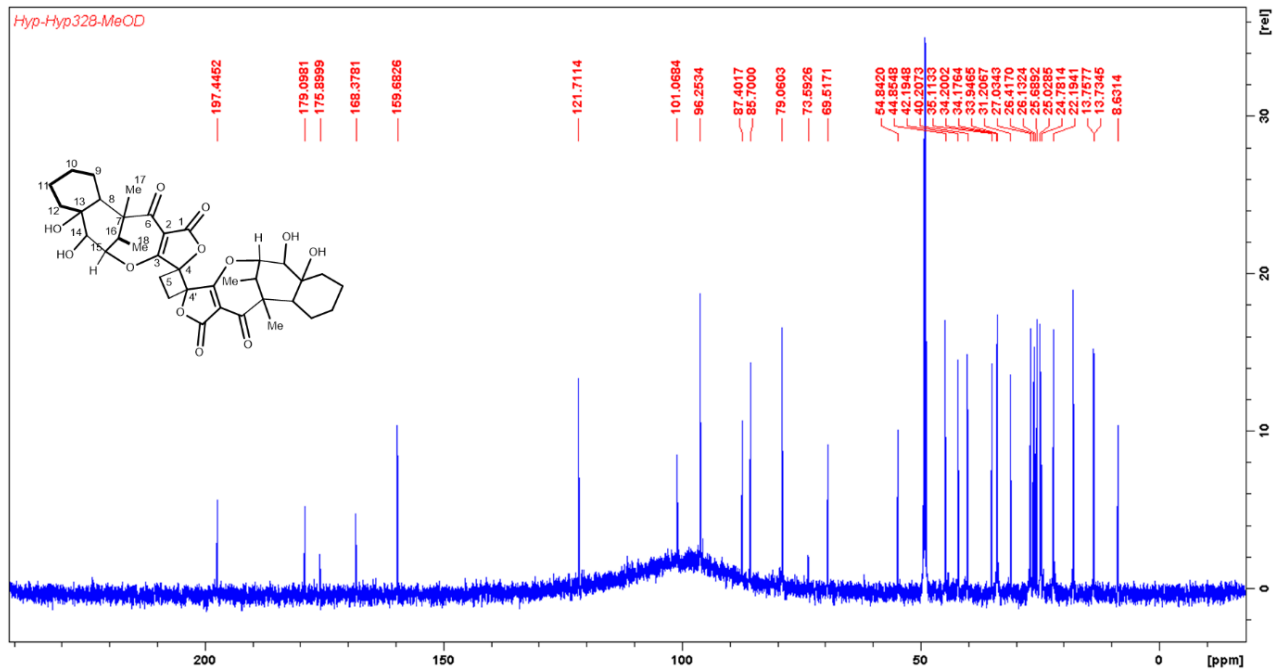


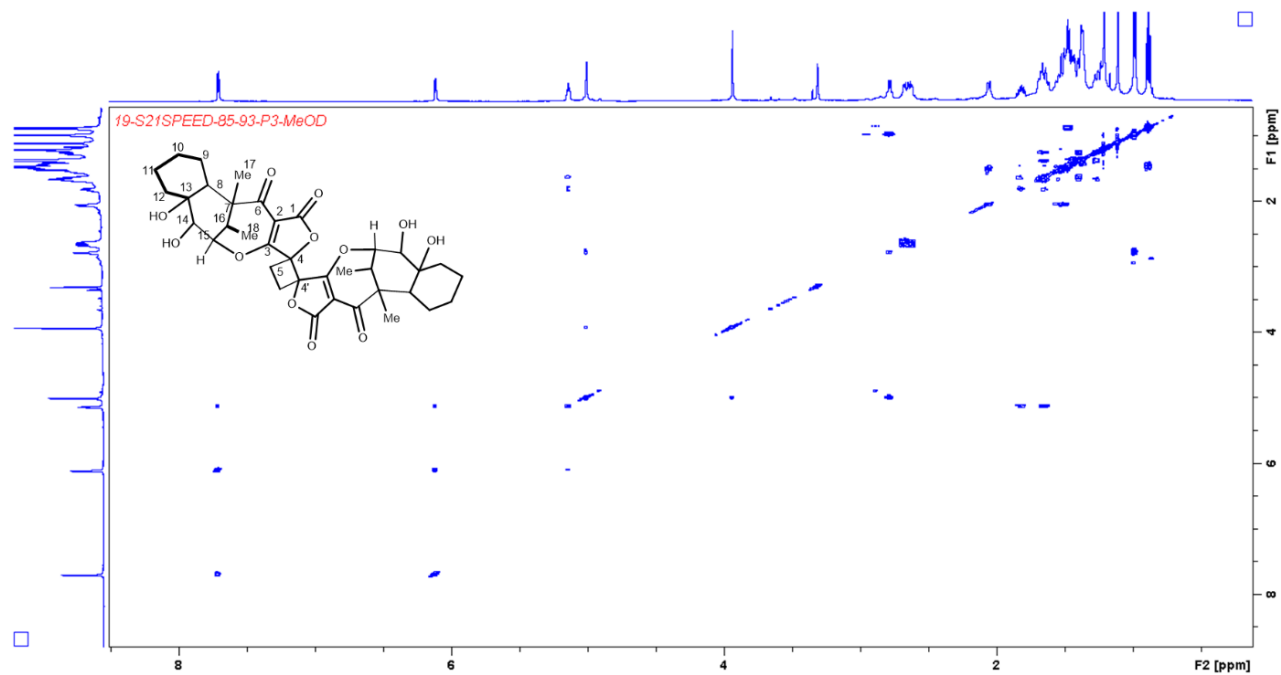
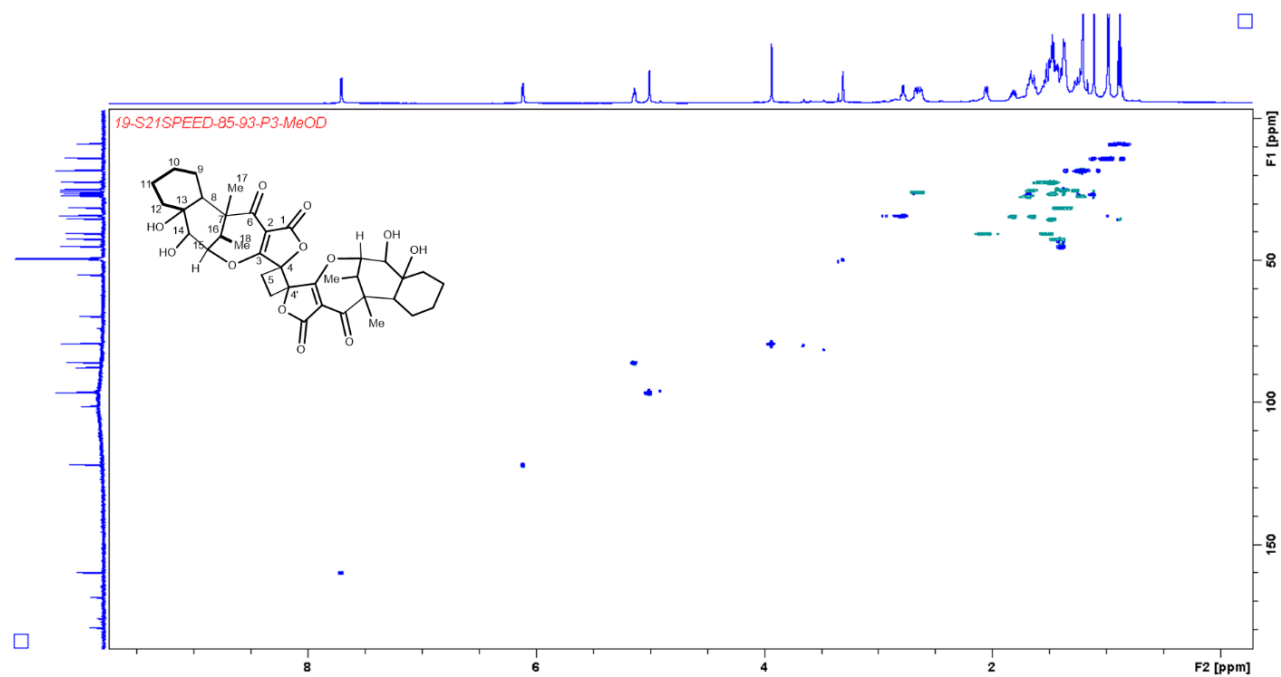
Annexe S2 : Spectre ^{13}C RMN du composé **2** (125 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)

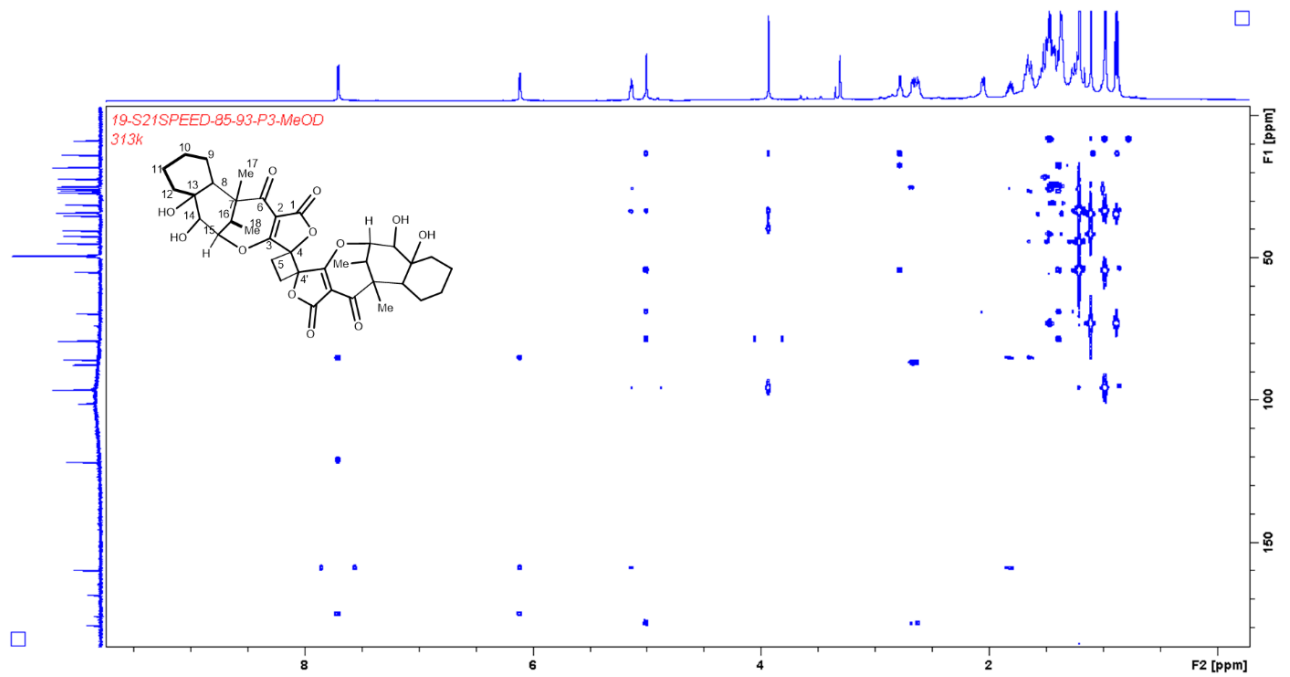
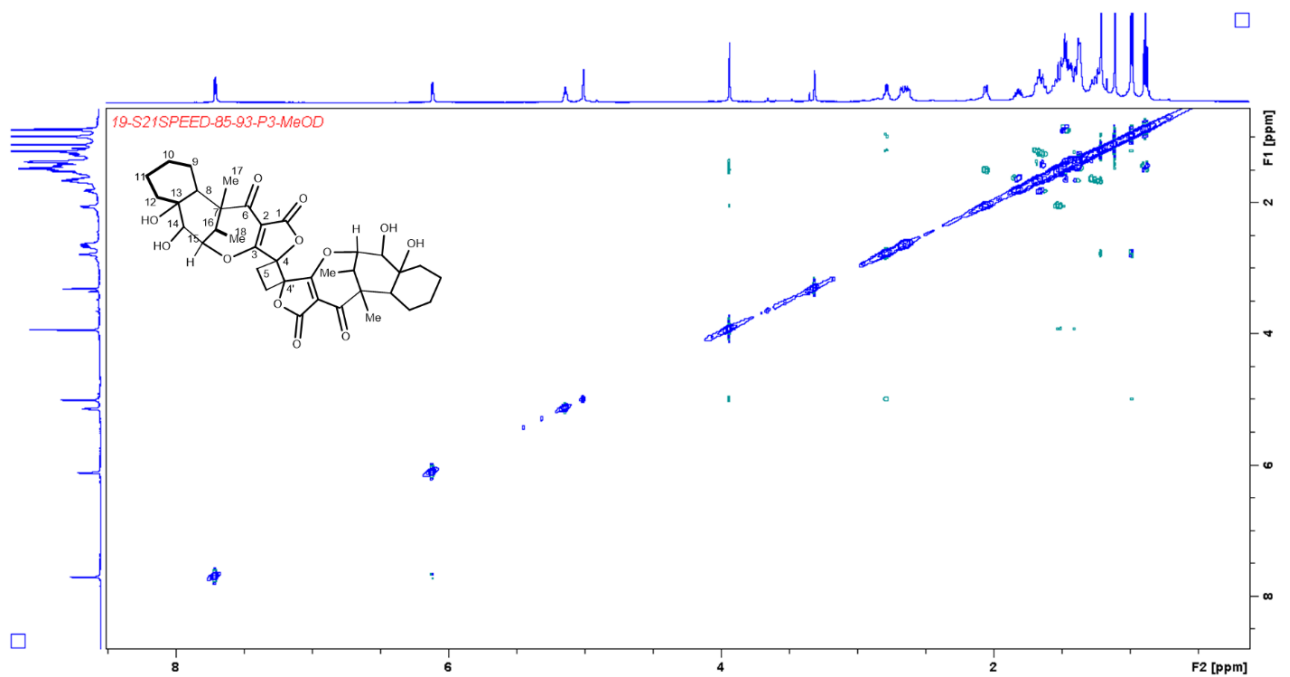


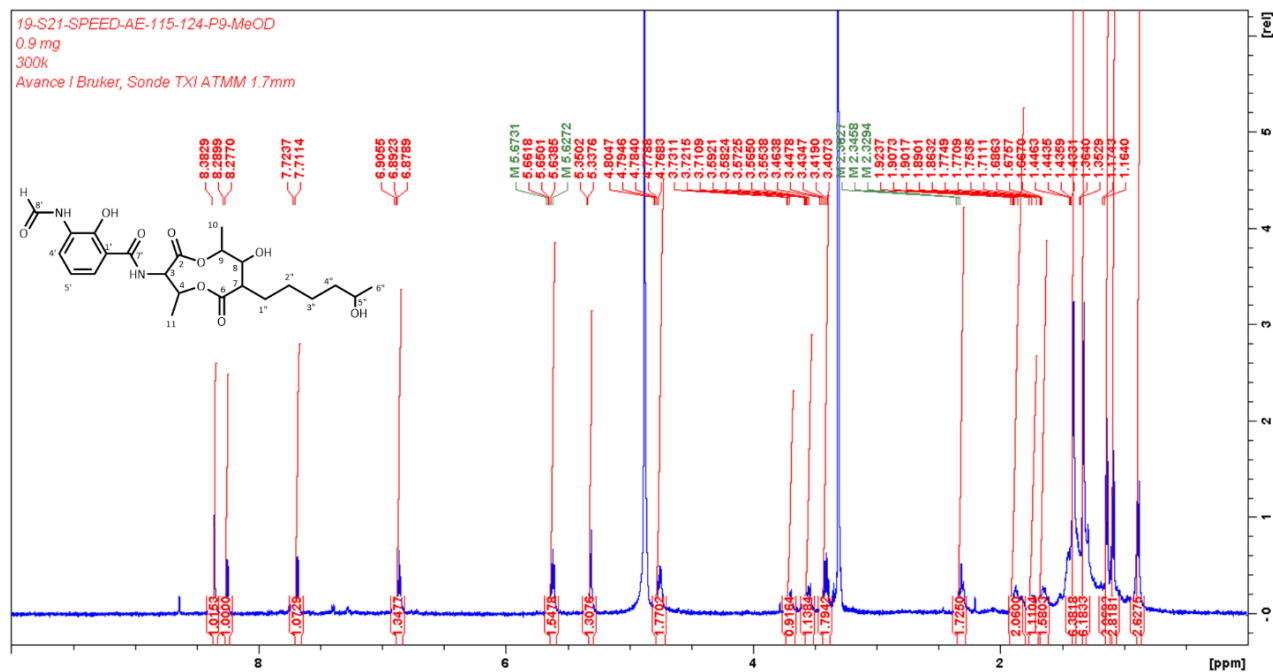
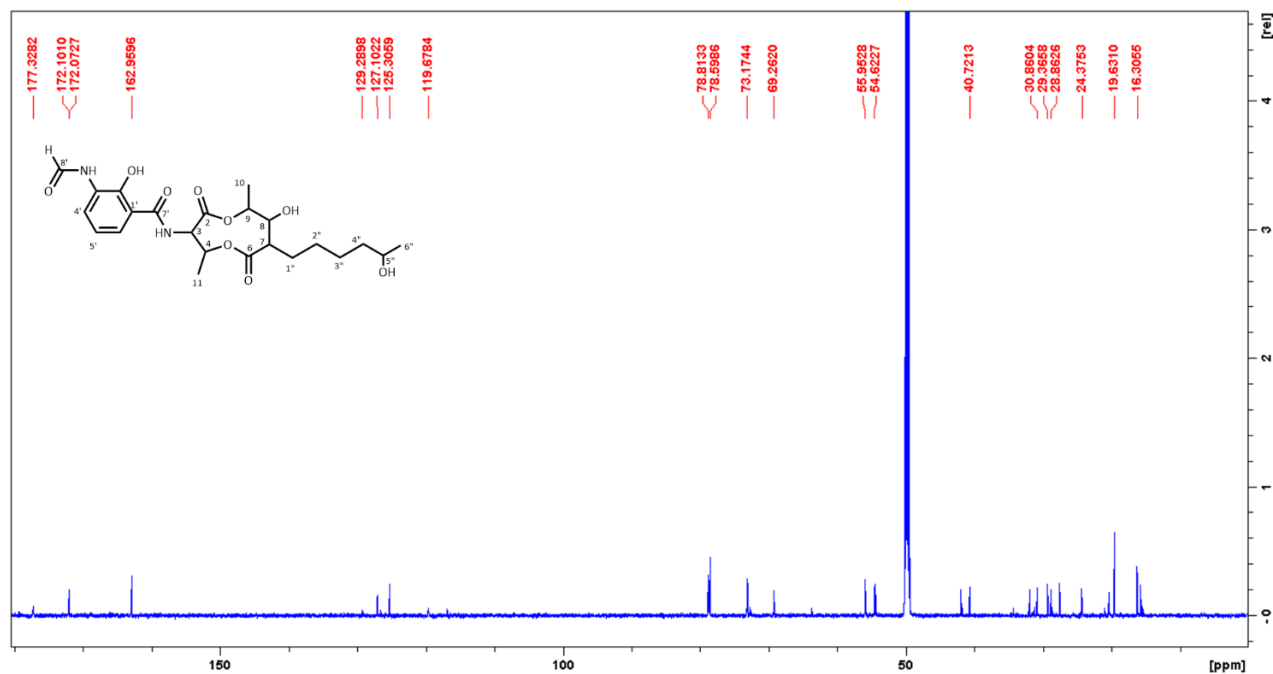
Annexe S3 : Spectre COSY du composé **2** (500 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S4 : Spectre HSQC du composé **2** (500 MHz, CH₃OH-d₄)

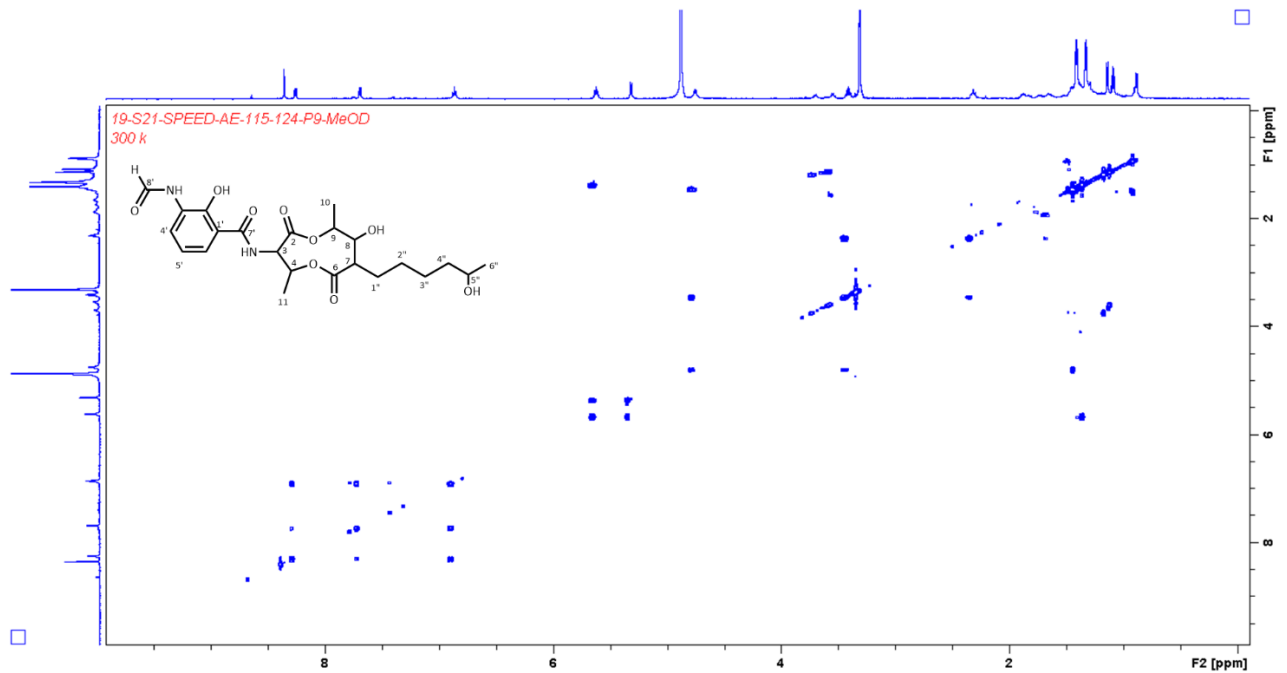
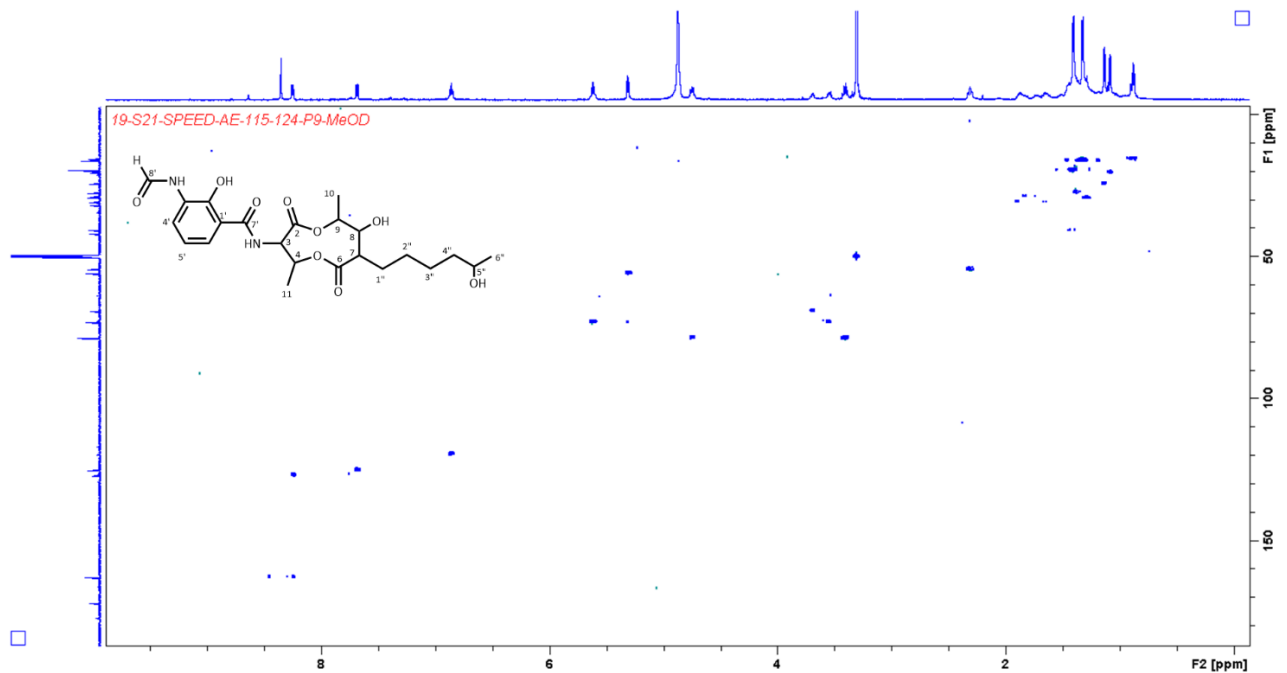
Annexe S5 : Spectre HMBC du composé **2** (500 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S6 : Spectre ROESY du composé **2** (500 MHz, CH₃OH-d₄)

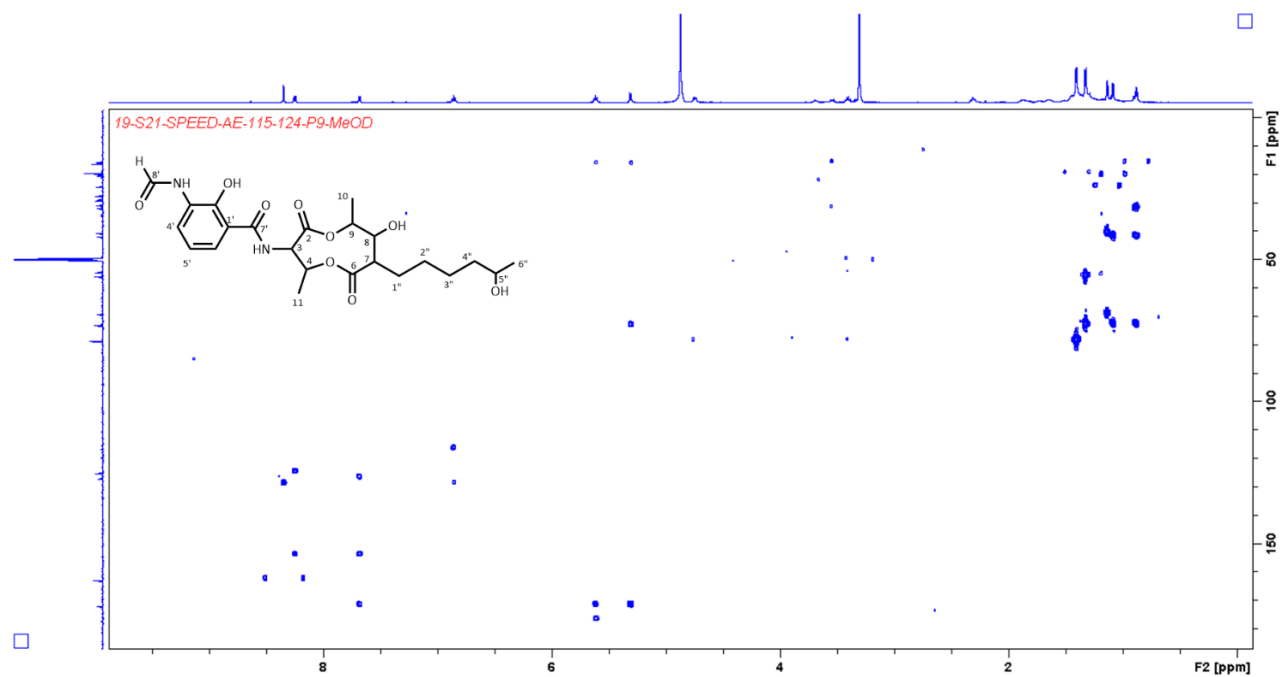
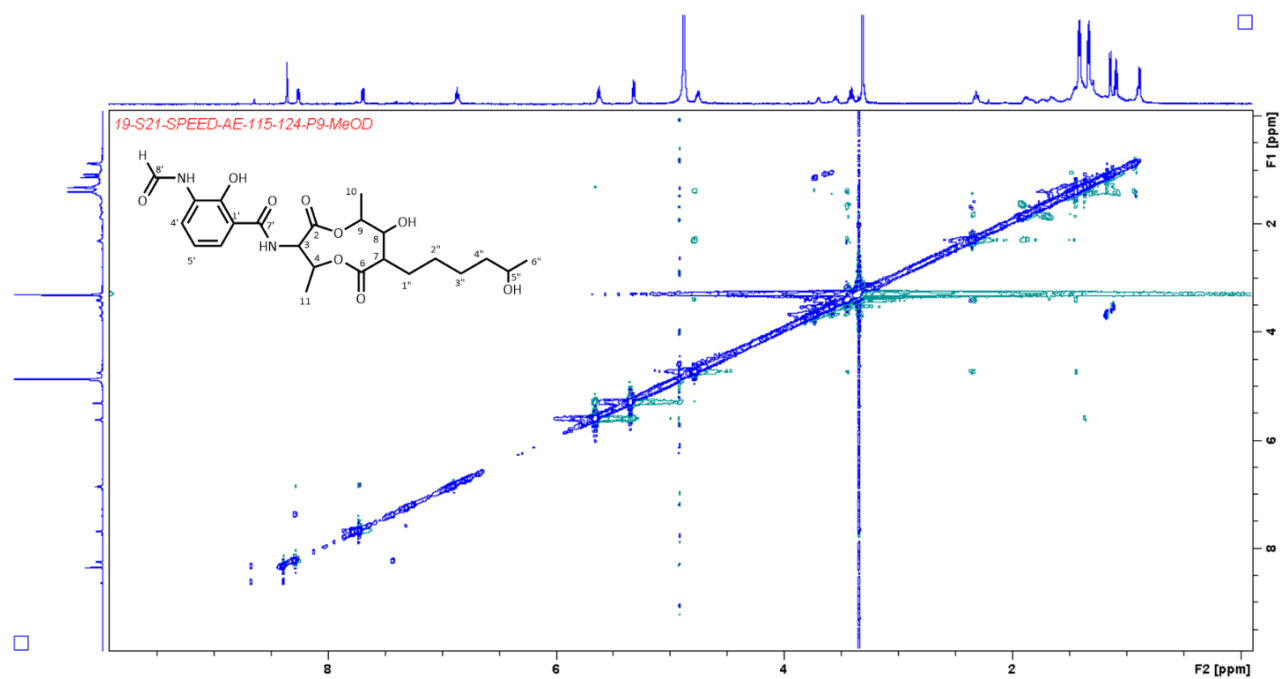
Annexe S7 : Spectre ^1H RMN du composé **3** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)Annexe S8 : Spectre ^{13}C RMN du composé **3** (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)

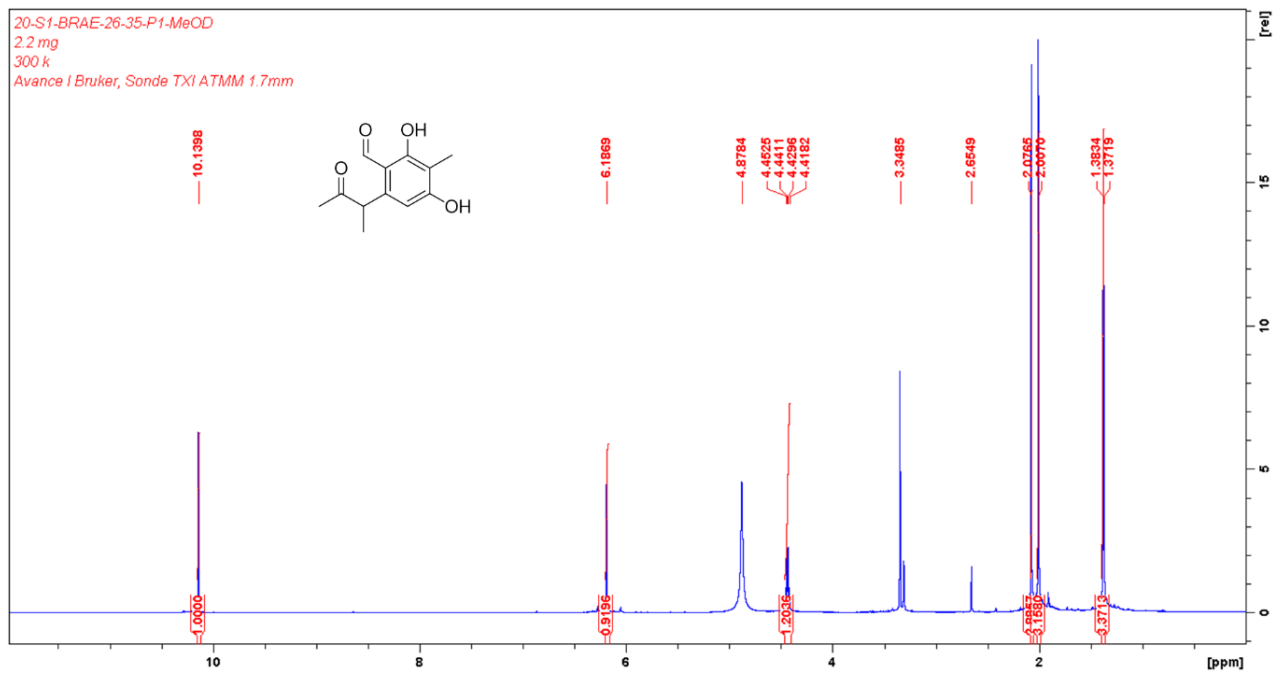
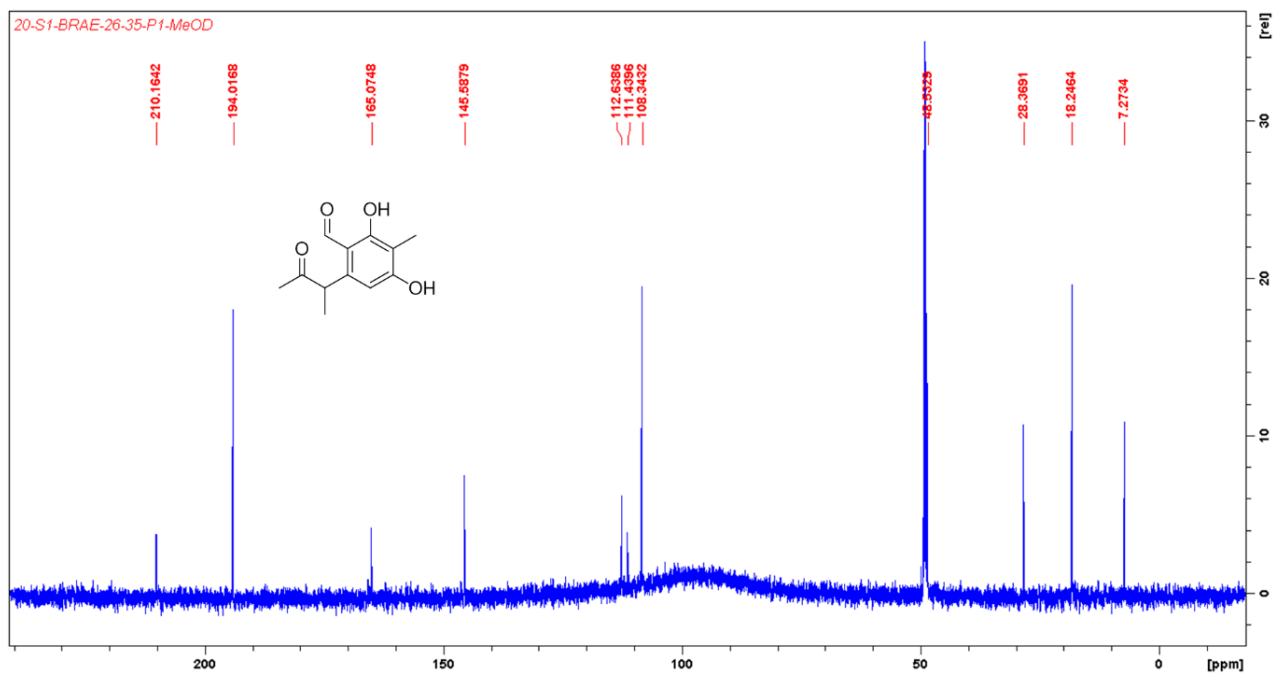
Annexe S9 : Spectre COSY du composé 3 (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S10 : Spectre HSQC du composé 3 (600 MHz, CH₃OH-d₄)

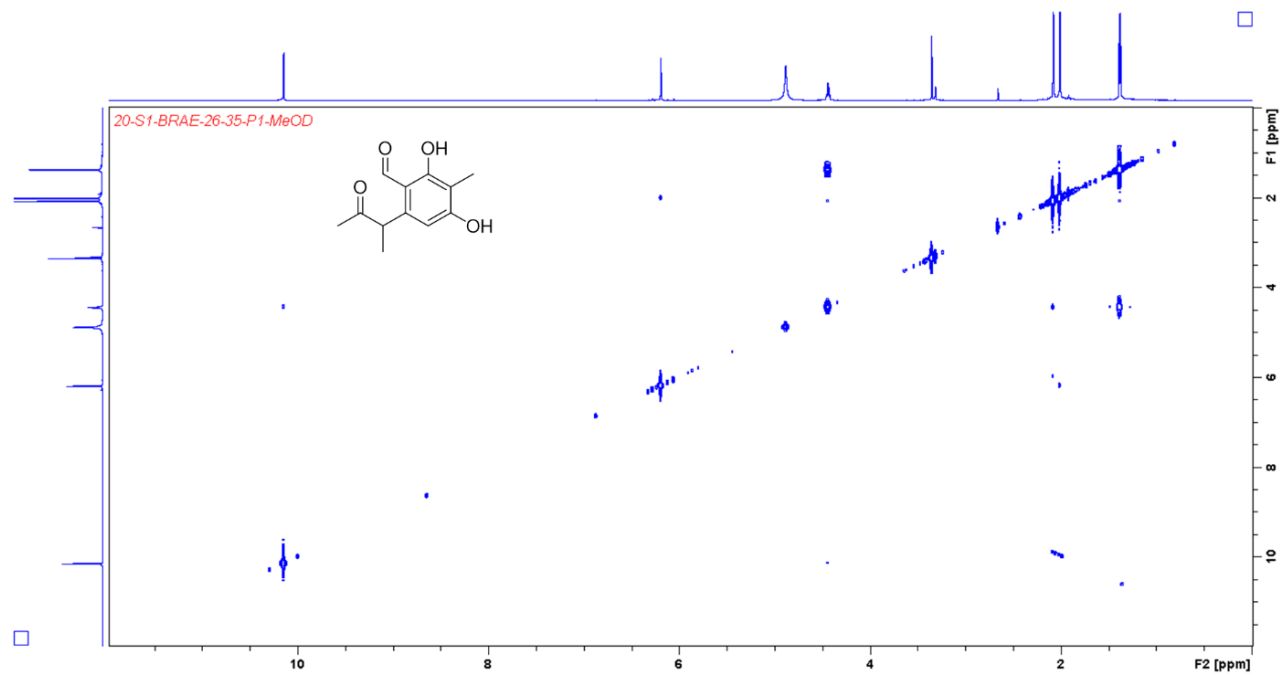
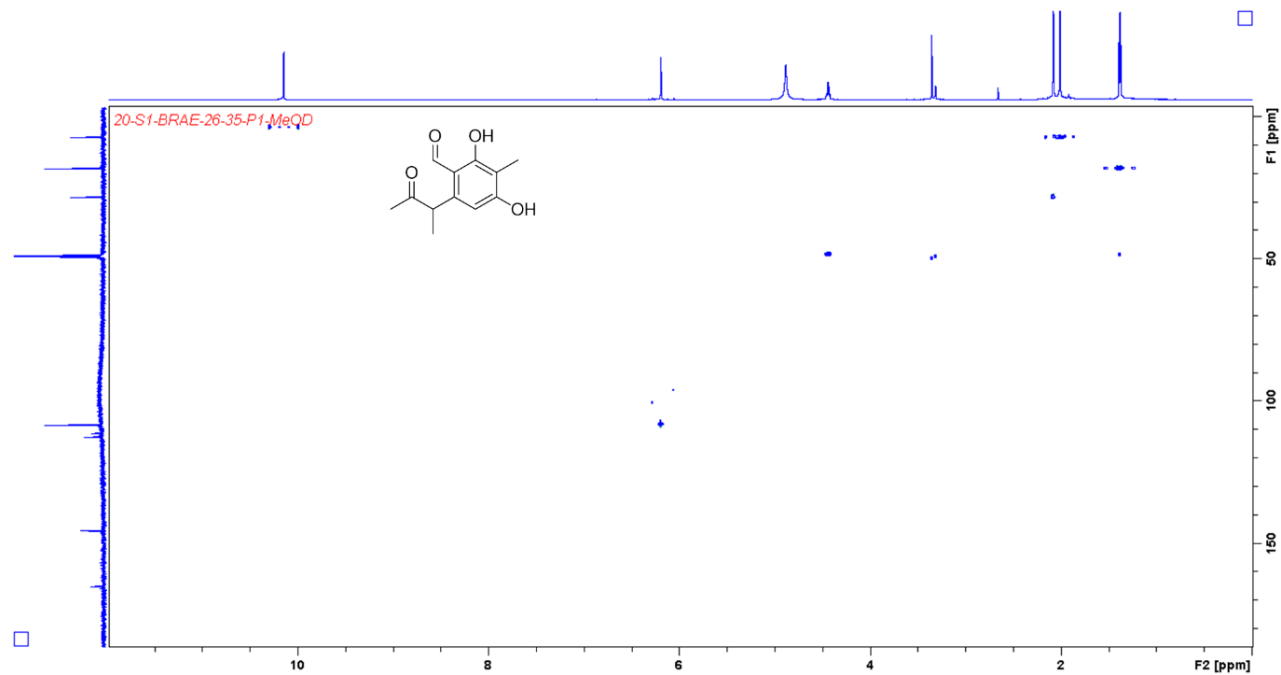
Annexe S11 : Spectre HMBC du composé **3** (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S12 : Spectre ROESY du composé **3** (600 MHz, CH₃OH-d₄)

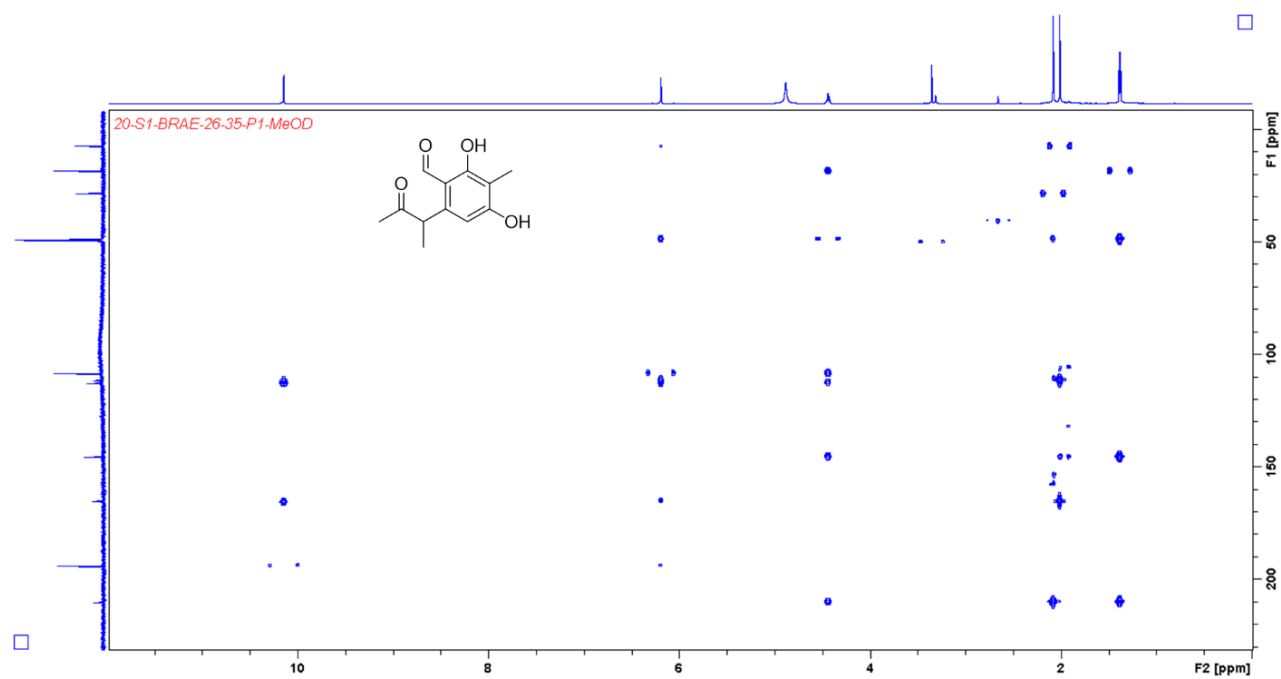
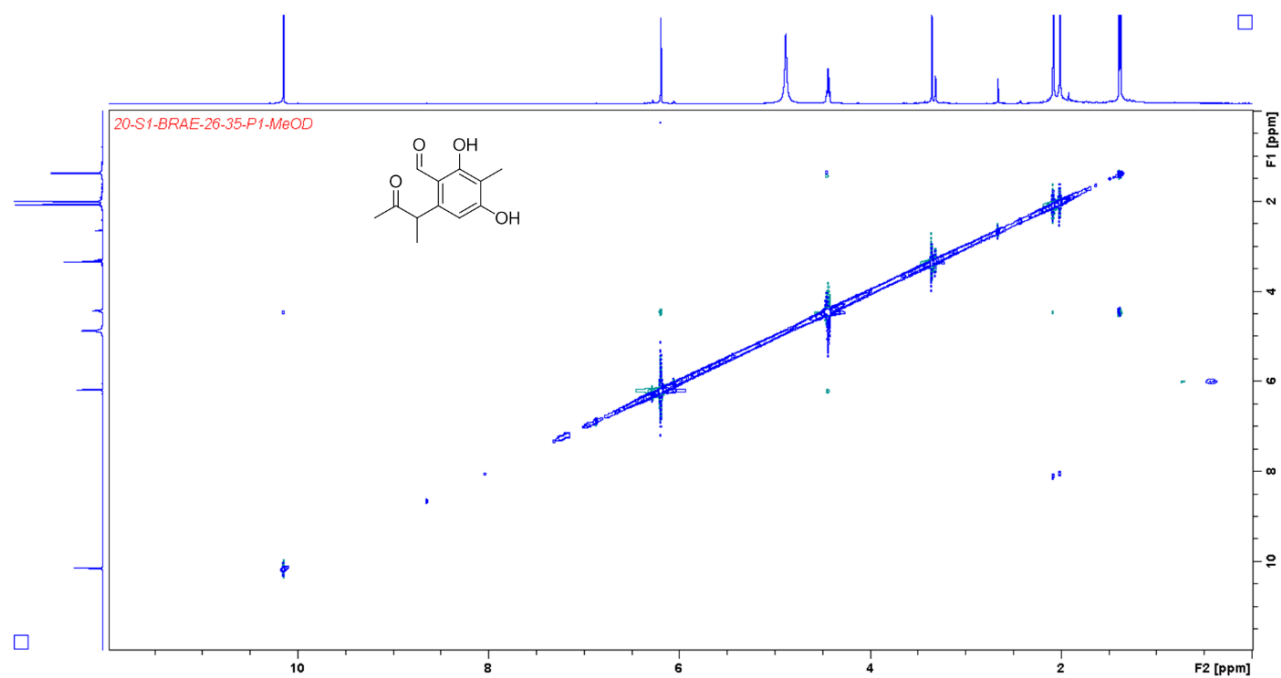
Annexe S13 : Spectre ^1H RMN du composé 4 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)Annexe S14 : Spectre ^{13}C RMN du composé 4 (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)

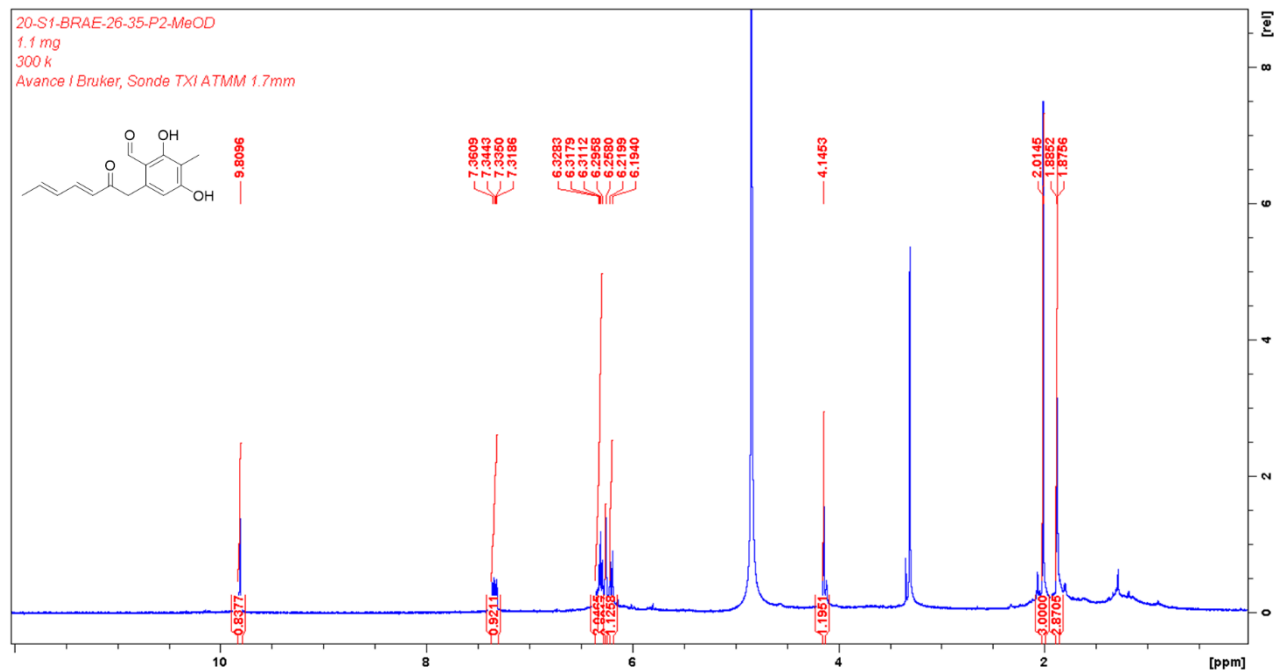
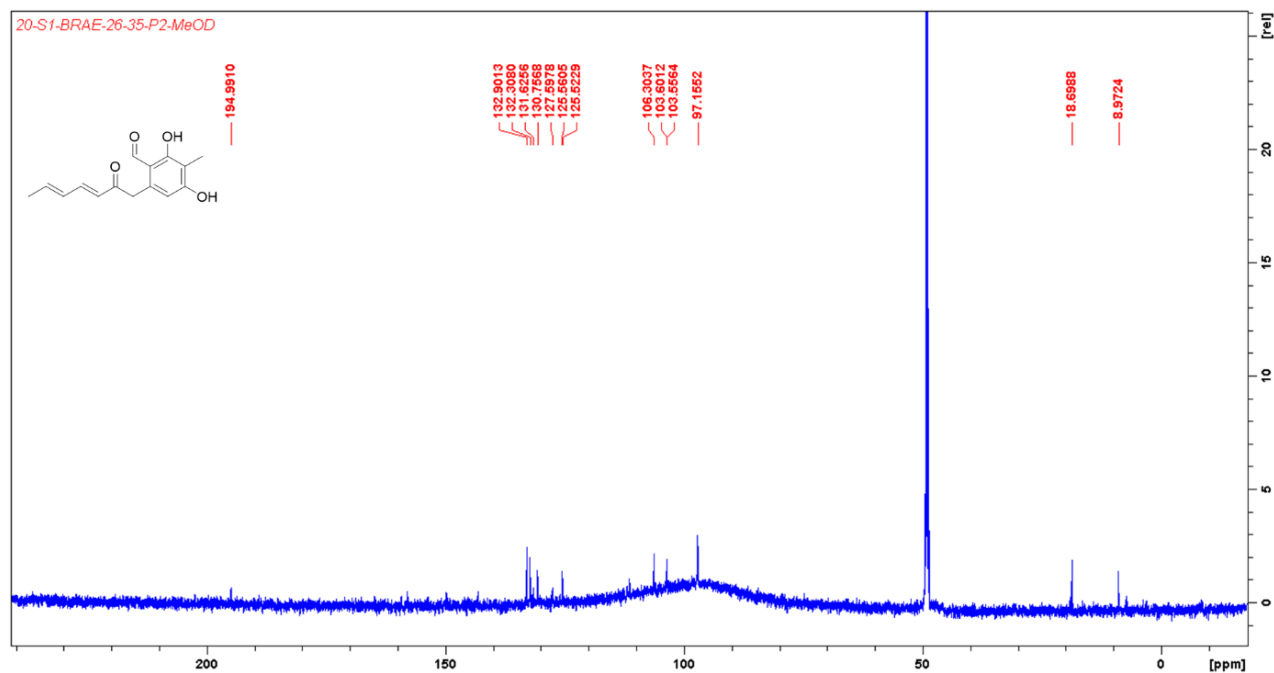
Annexe S15 : Spectre COSY du composé **4** (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S16 : Spectre HSQC du composé **4** (600 MHz, CH₃OH-d₄)

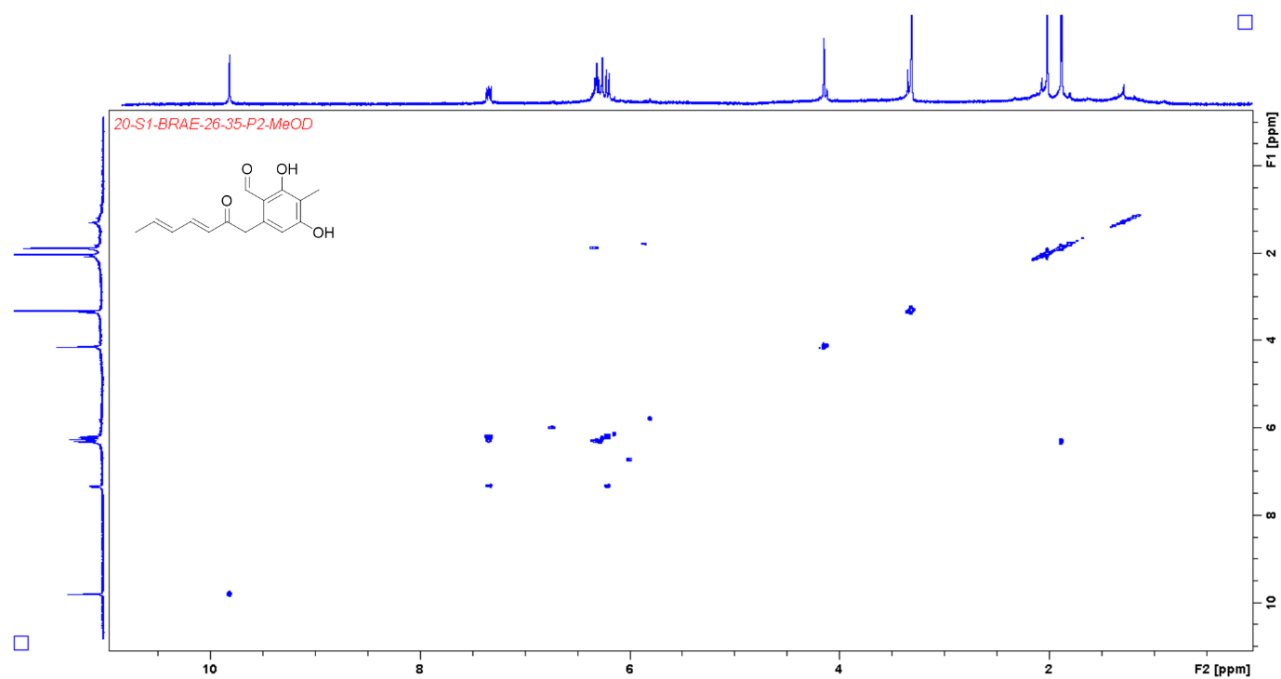
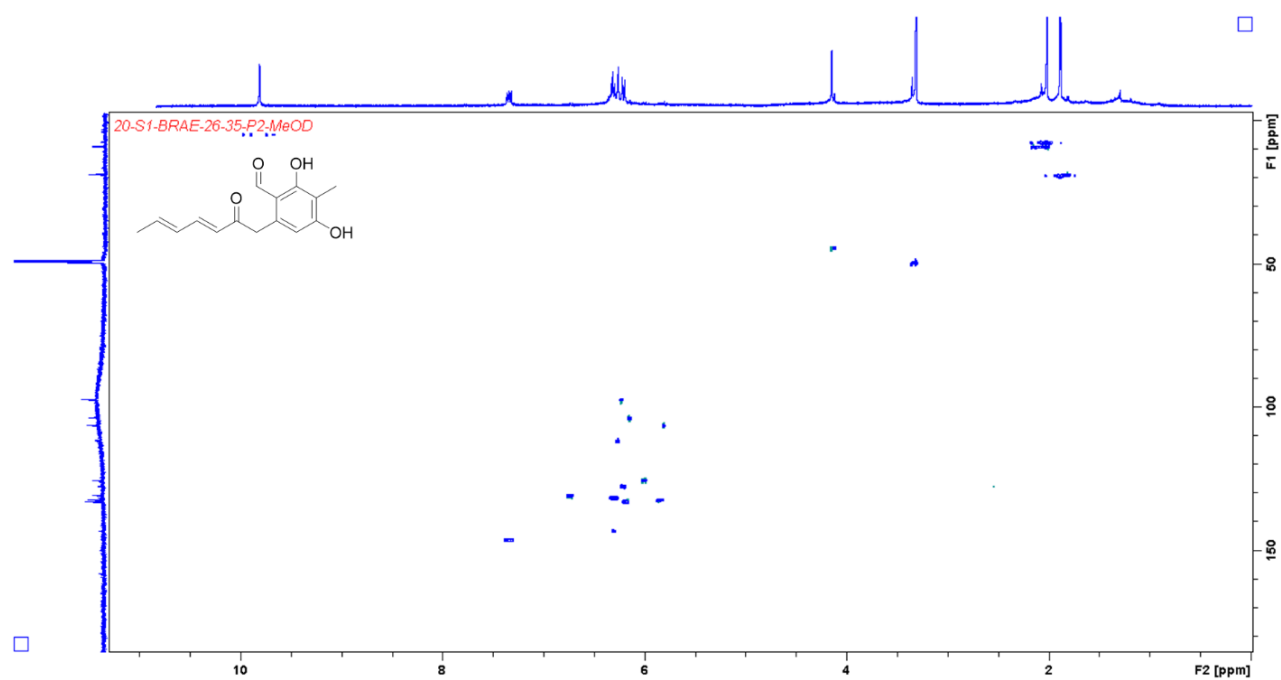
Annexe S17 : Spectre HMBC du composé **4** (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S18 : Spectre ROESY du composé **4** (600 MHz, CH₃OH-d₄)

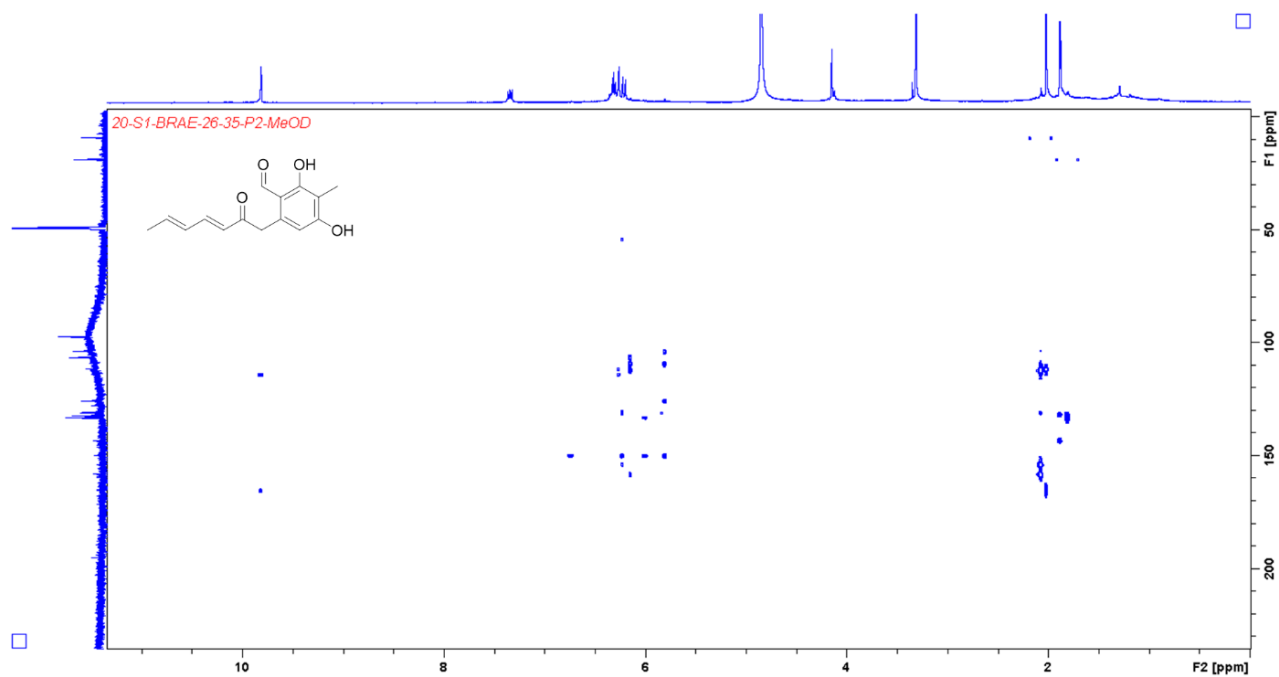
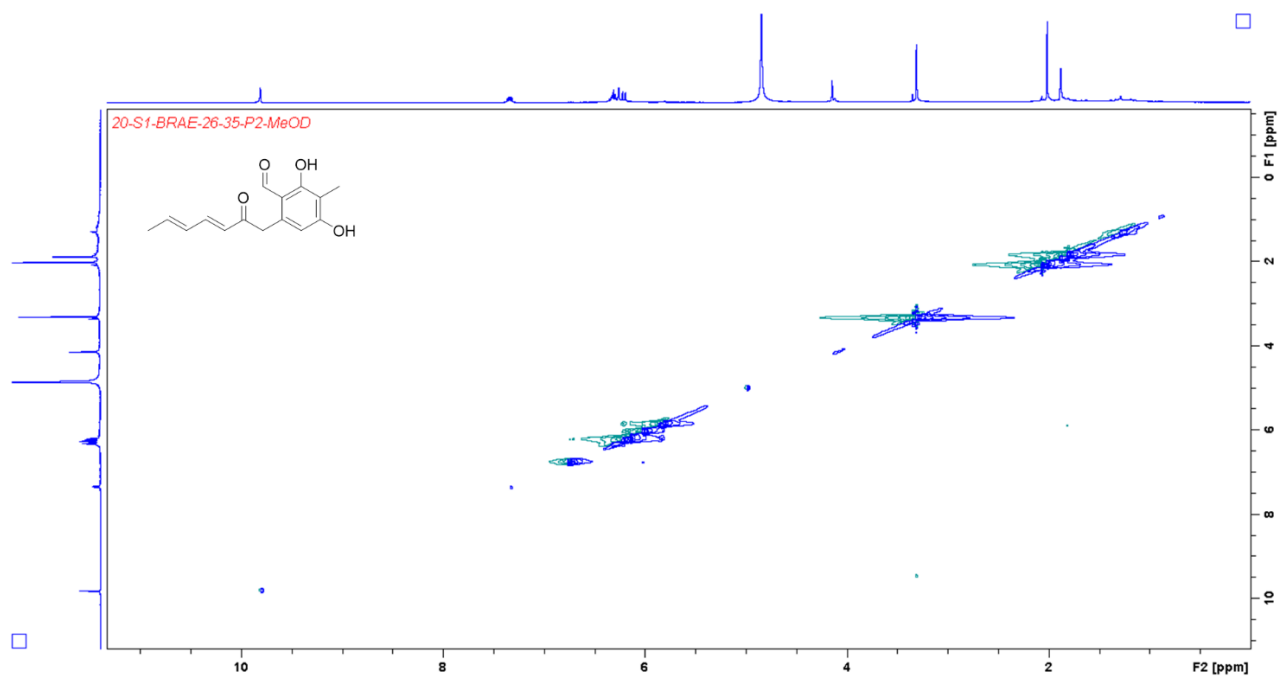
Annexe S19 : Spectre ^1H RMN du composé **5** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)Annexe S20 : Spectre ^{13}C RMN du composé **5** (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)

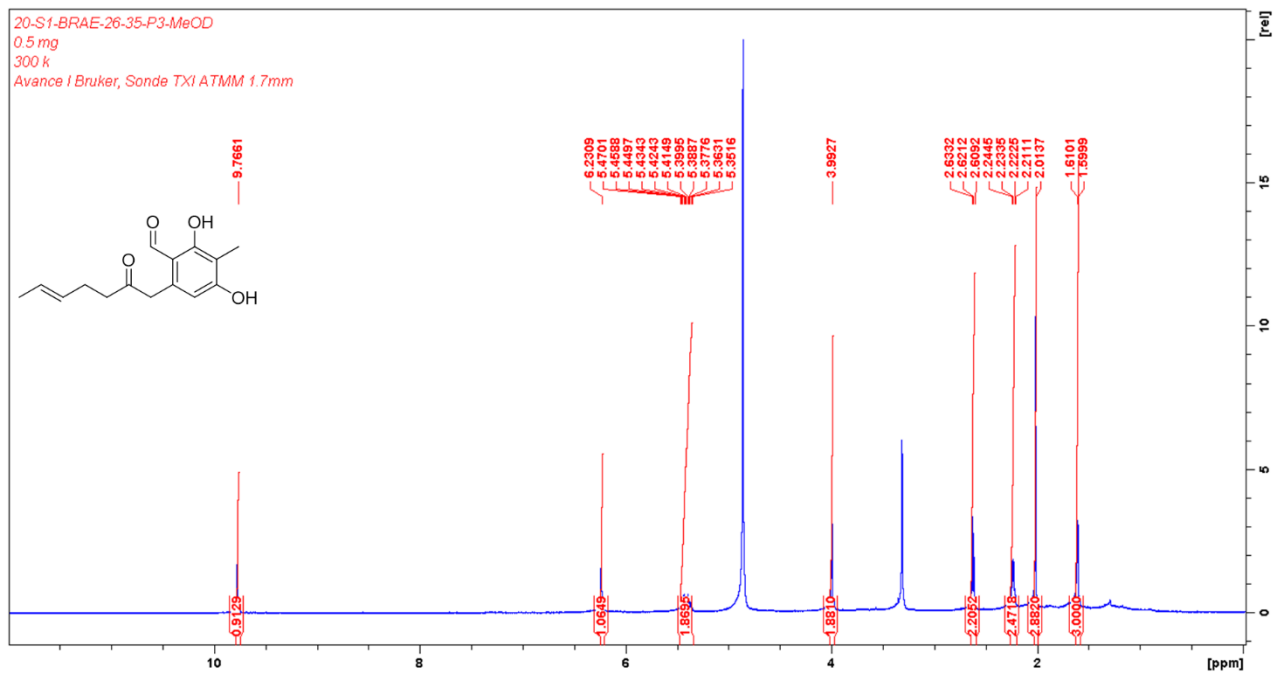
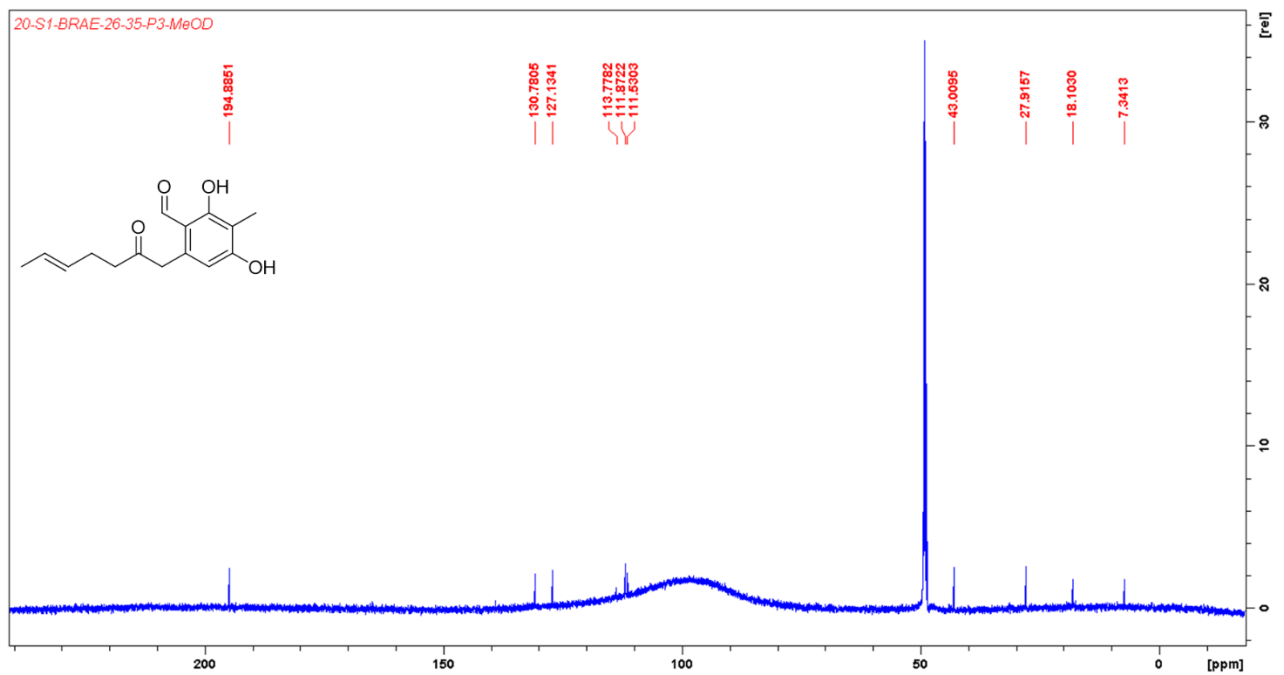
Annexe S21 : Spectre COSY du composé **5** (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S22 : Spectre HSQC du composé **5** (600 MHz, CH₃OH-d₄)

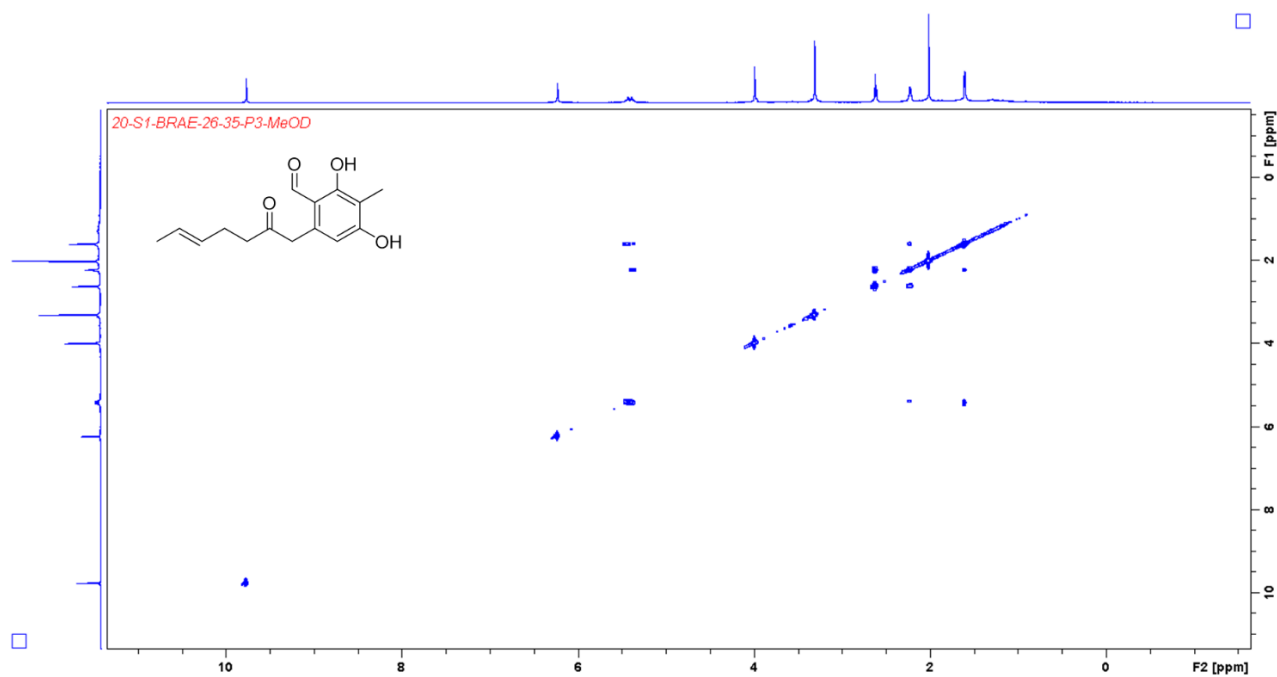
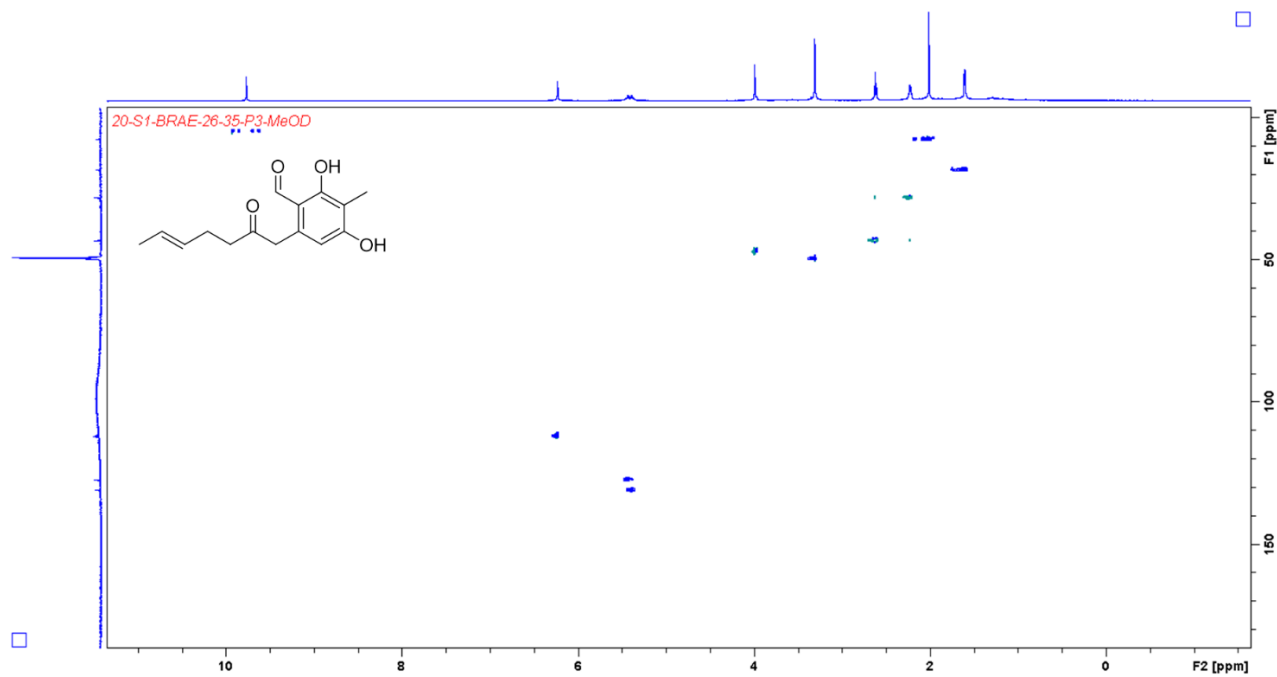
Annexe S23 : Spectre HMBC du composé **5** (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S24 : Spectre NOESY du composé **5** (600 MHz, CH₃OH-d₄)

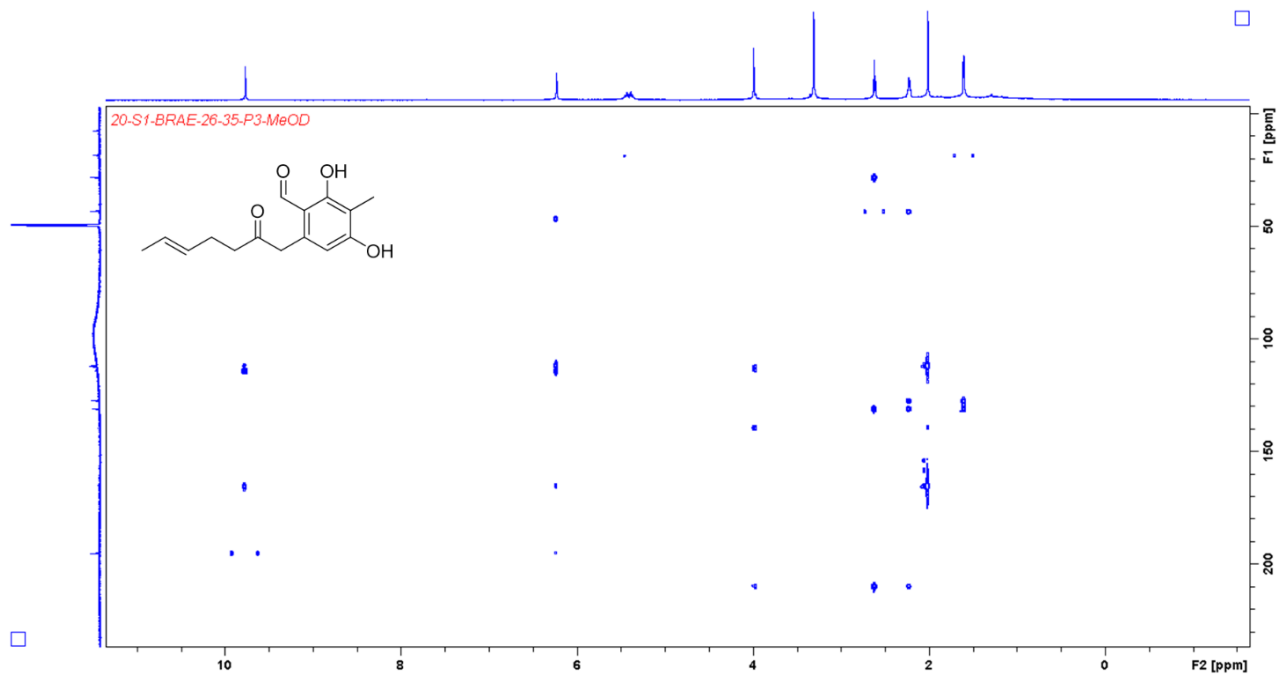
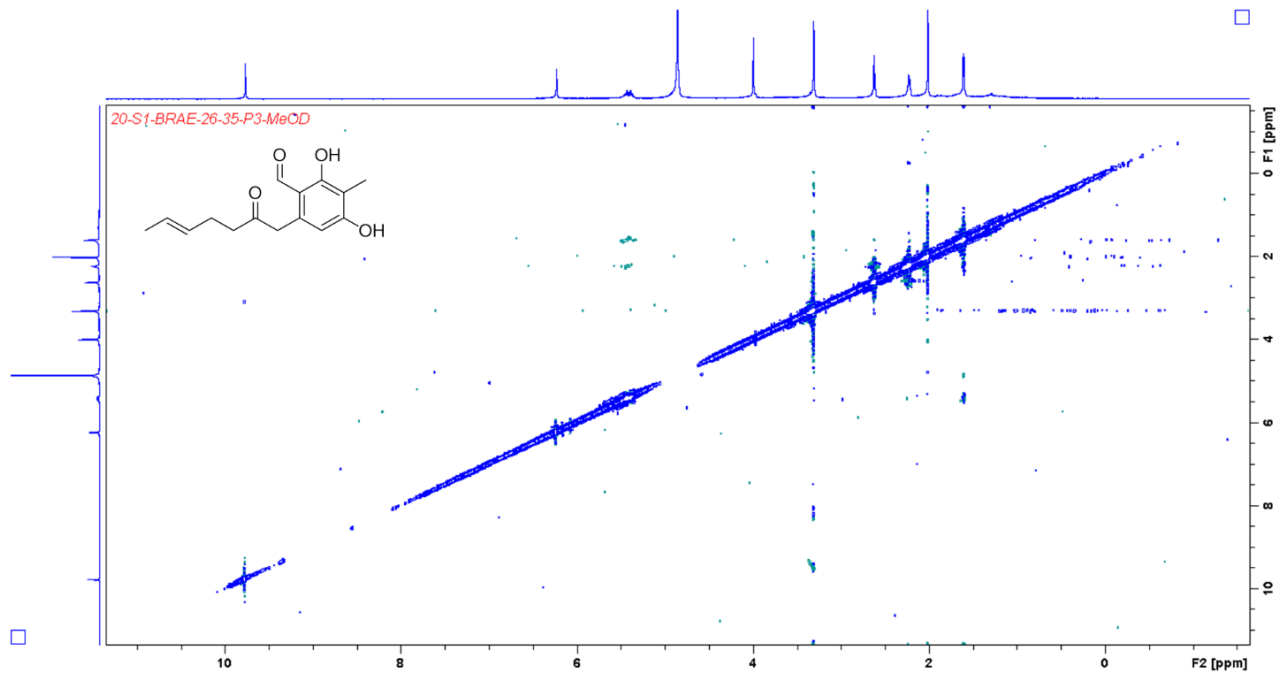
Annexe S25 : Spectre ^1H RMN du composé **6** (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)Annexe S26 : Spectre ^{13}C RMN du composé **6** (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)

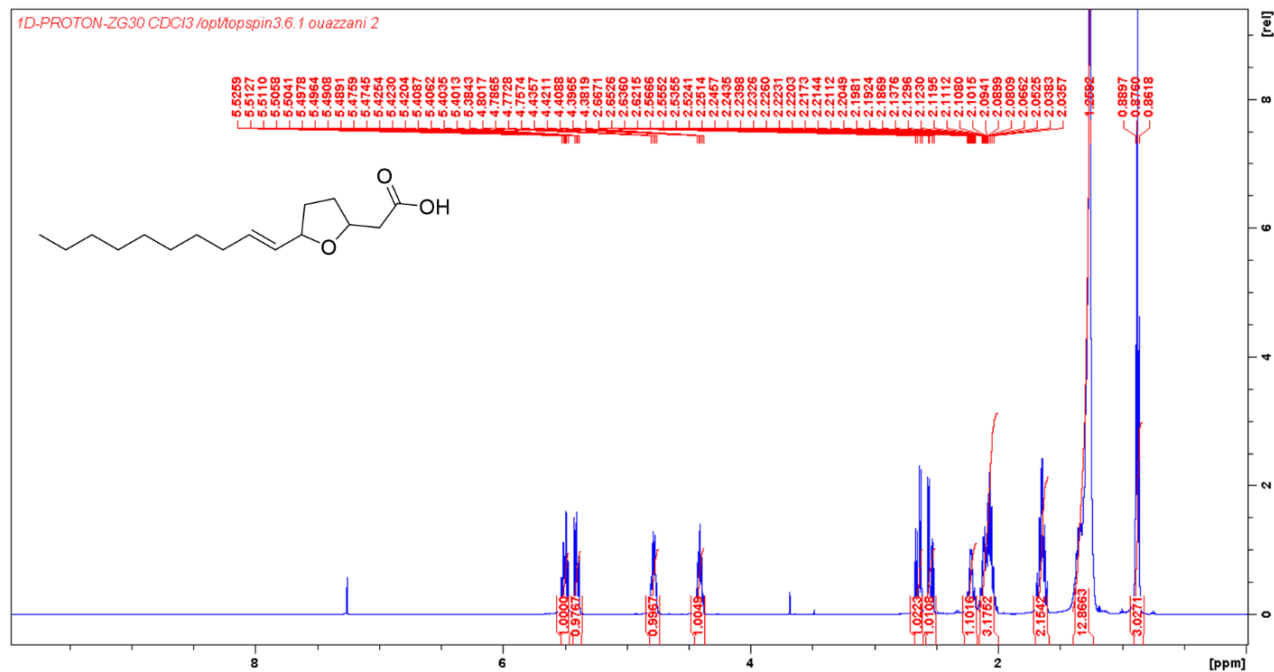
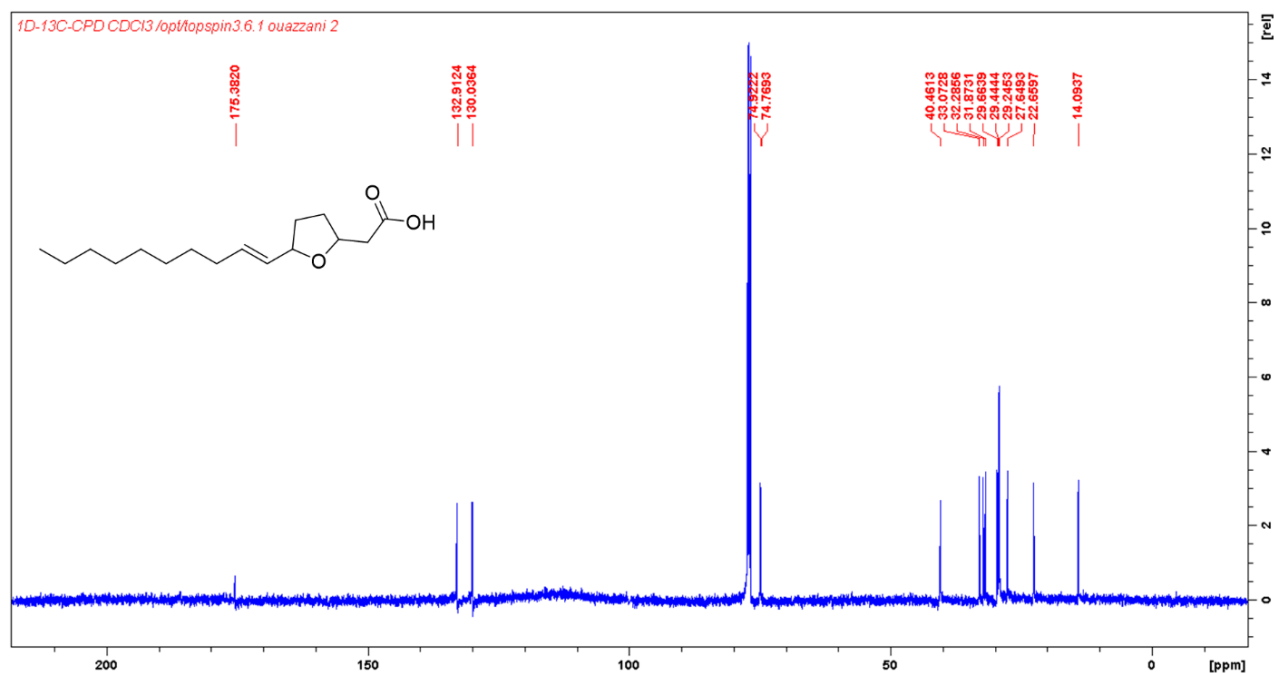
Annexe S27 : Spectre COSY du composé **6** (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S28 : Spectre HSQC du composé **6** (600 MHz, CH₃OH-d₄)

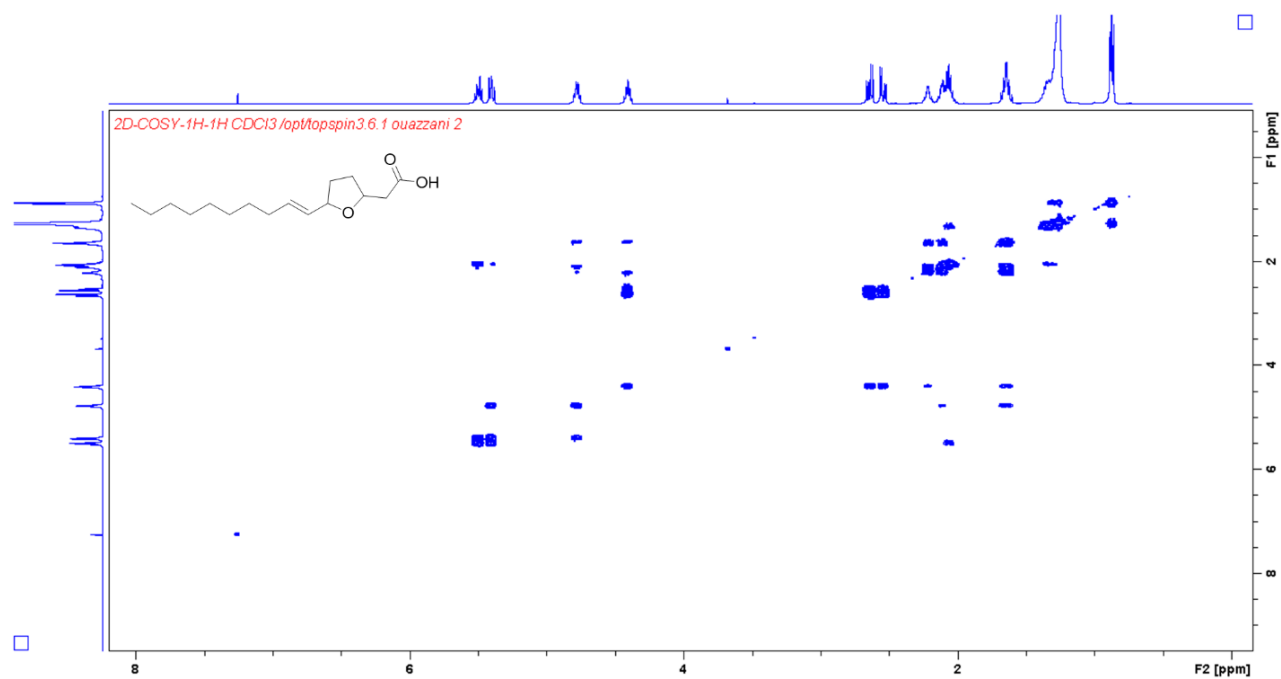
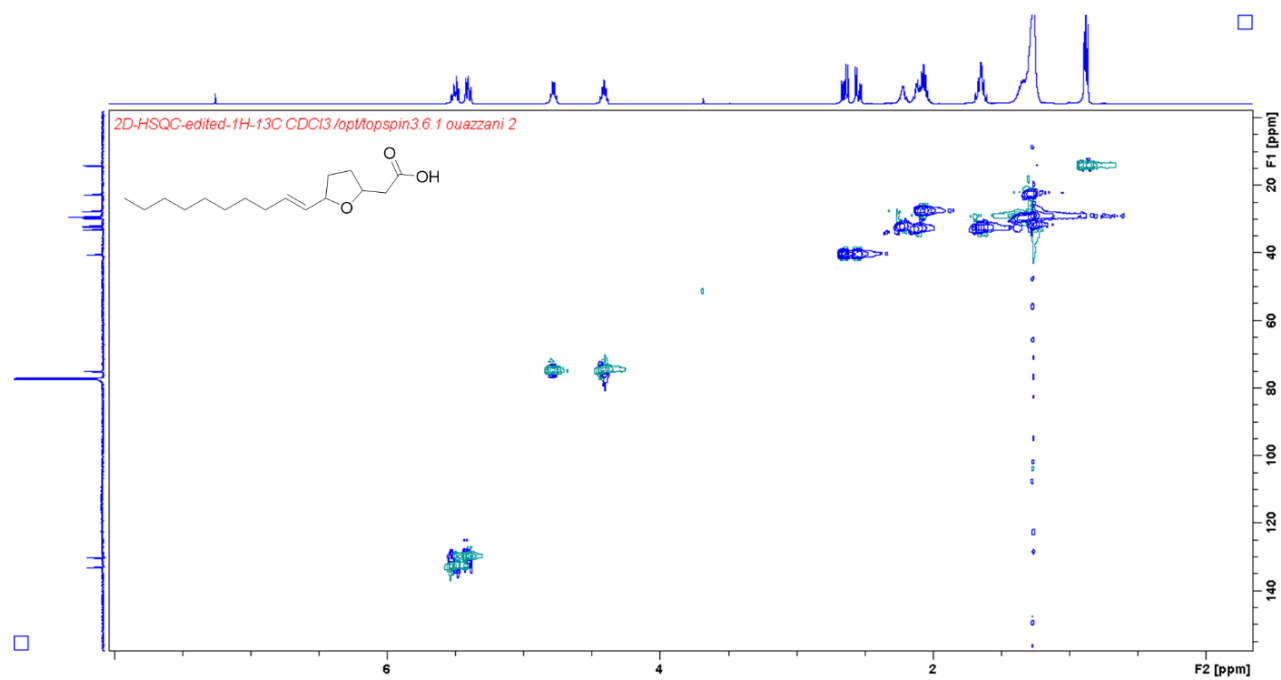
Annexe S29 : Spectre HMBC du composé **6** (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S30 : Spectre NOESY du composé **6** (600 MHz, CH₃OH-d₄)

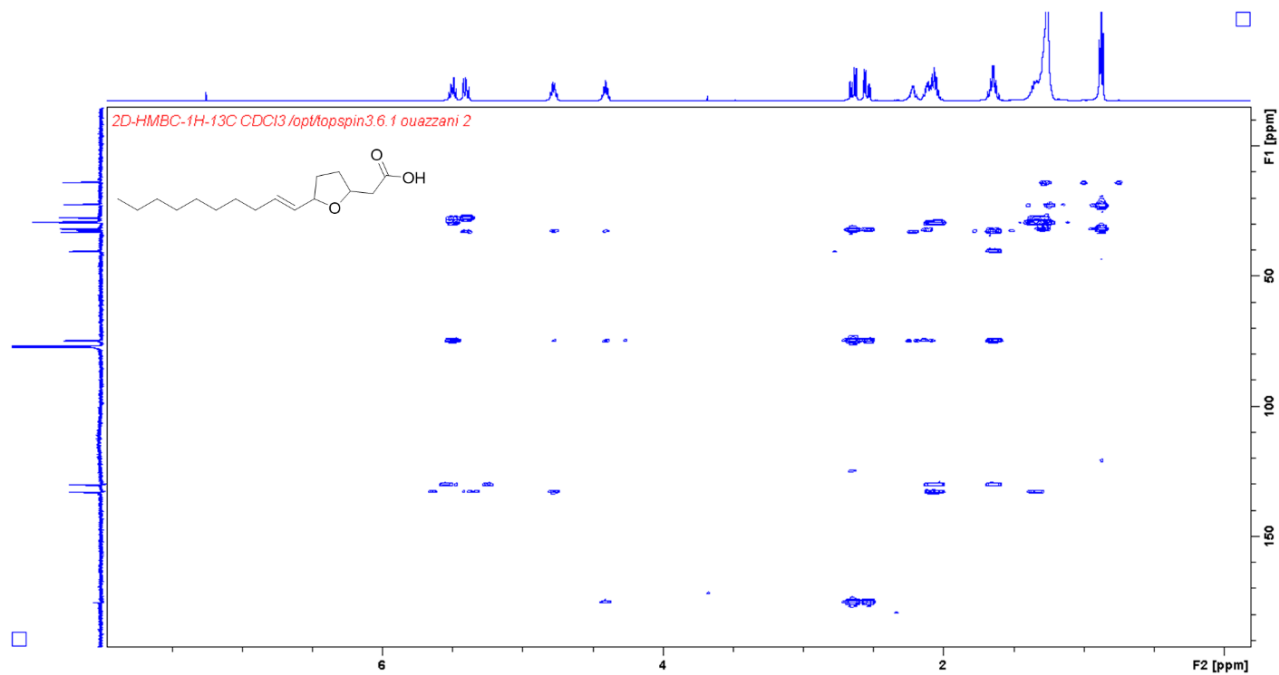
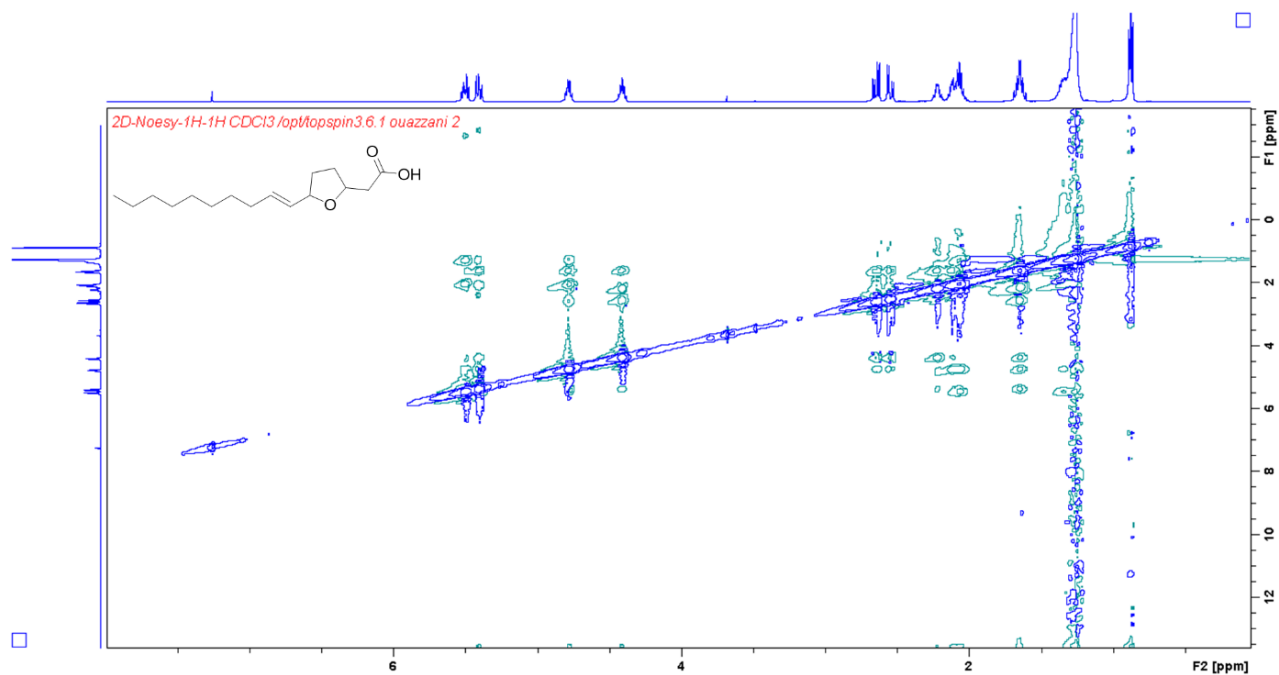
Annexe S31 : Spectre ^1H RMN du composé 7 (600 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)Annexe S32 : Spectre ^{13}C RMN du composé 7 (150 MHz, $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$)

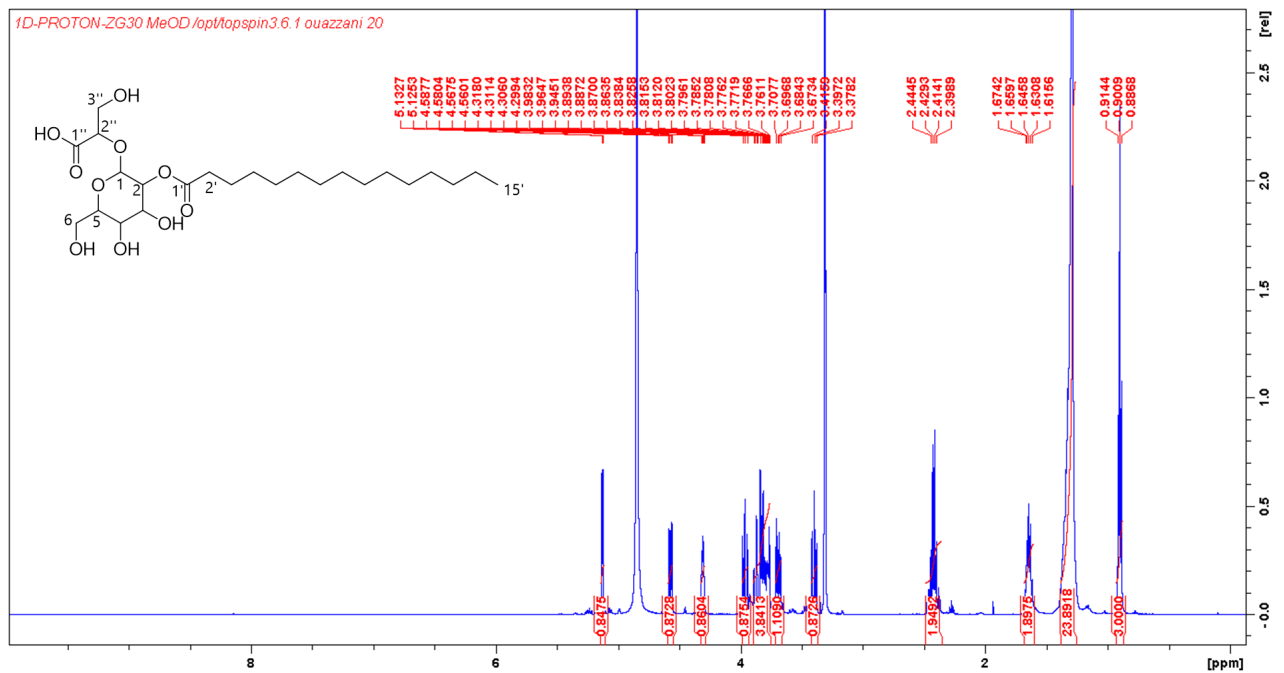
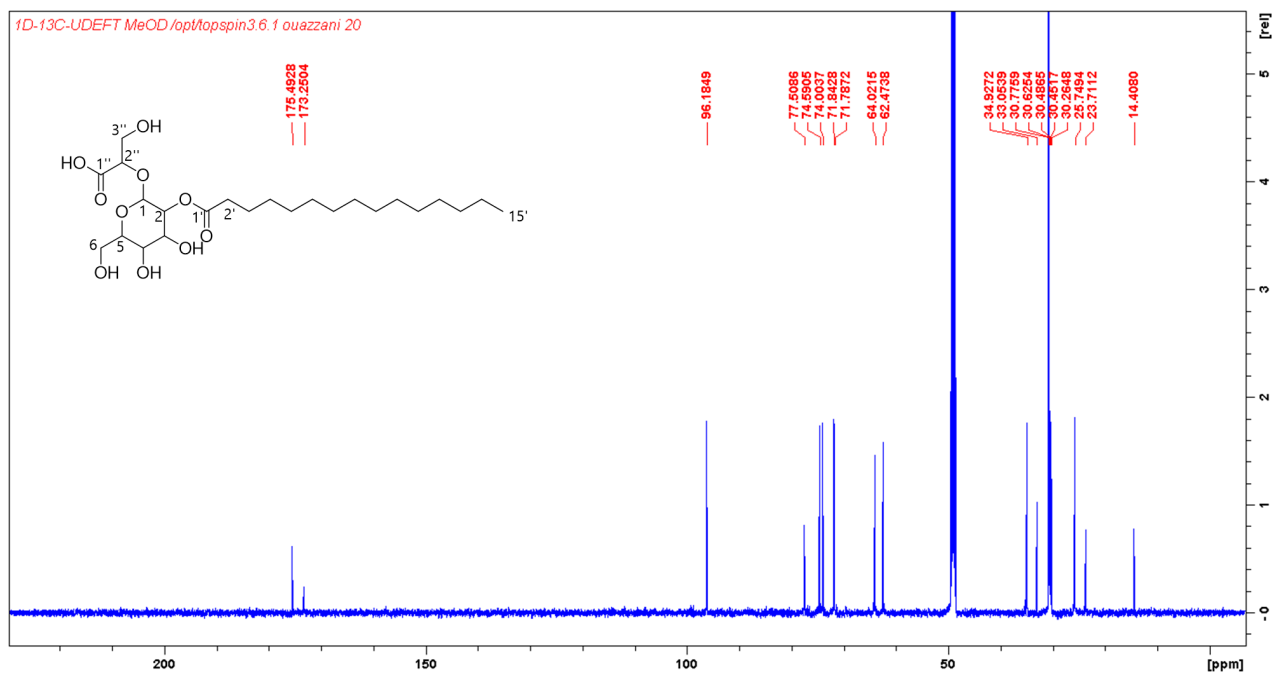
Annexe S33 : Spectre COSY du composé 7 (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S34 : Spectre HSQC du composé 7 (600 MHz, CH₃OH-d₄)

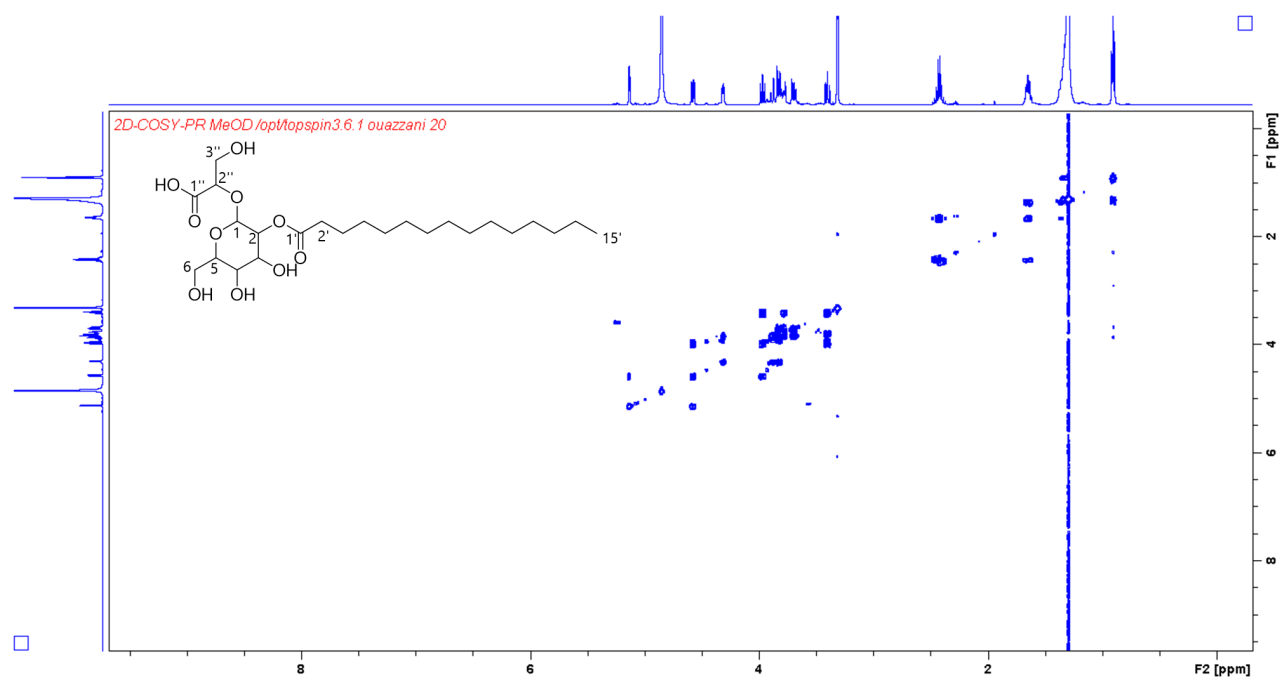
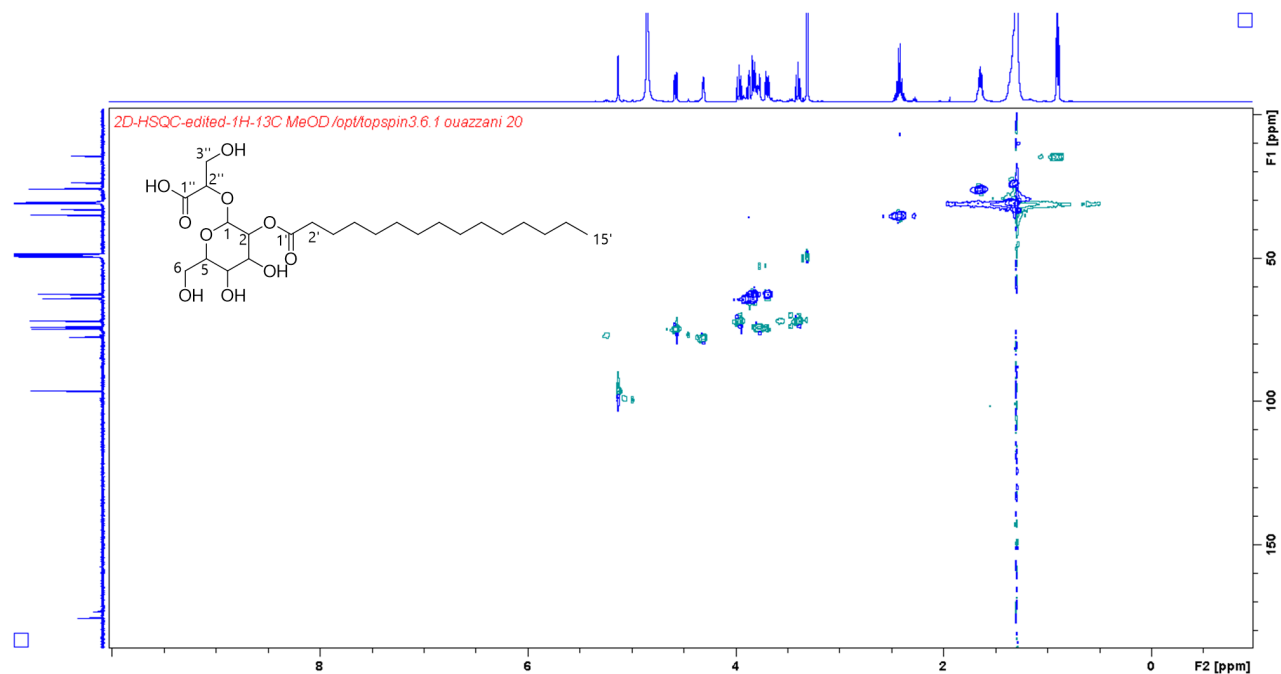
Annexe S35 : Spectre HMBC du composé 7 (600 MHz, CH₃OH-d₄)Annexe S36 : Spectre NOESY du composé 7 (600 MHz, CH₃OH-d₄)

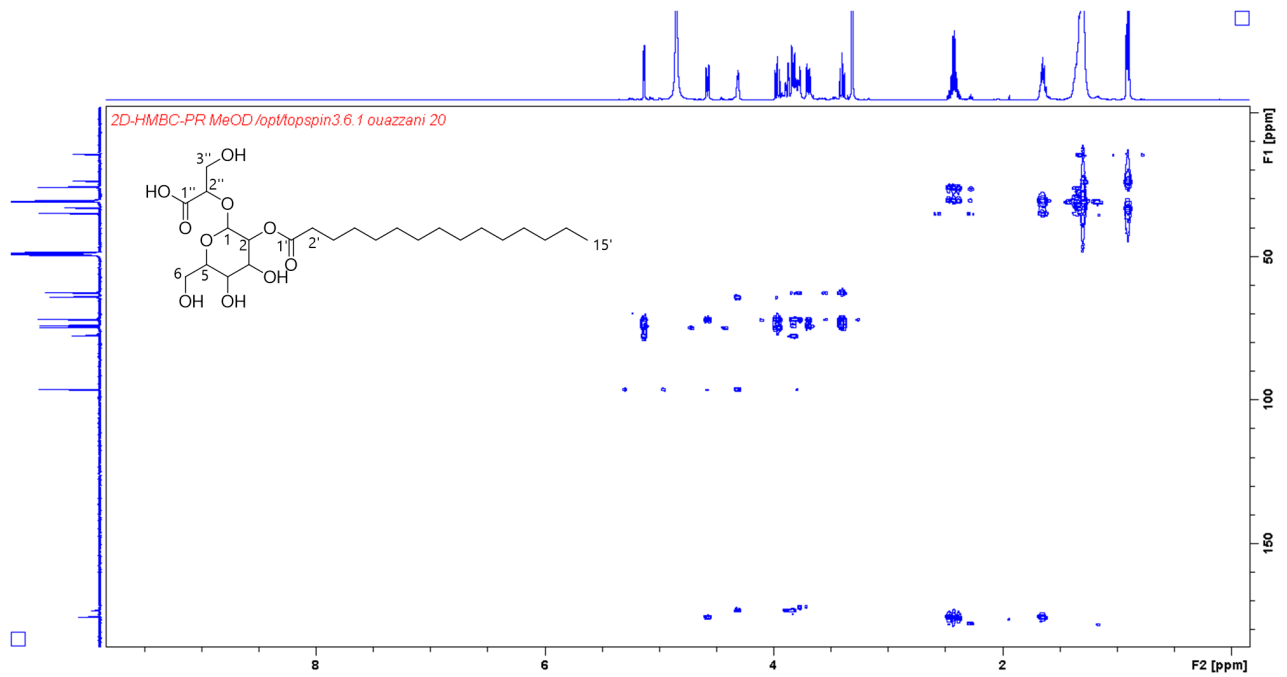
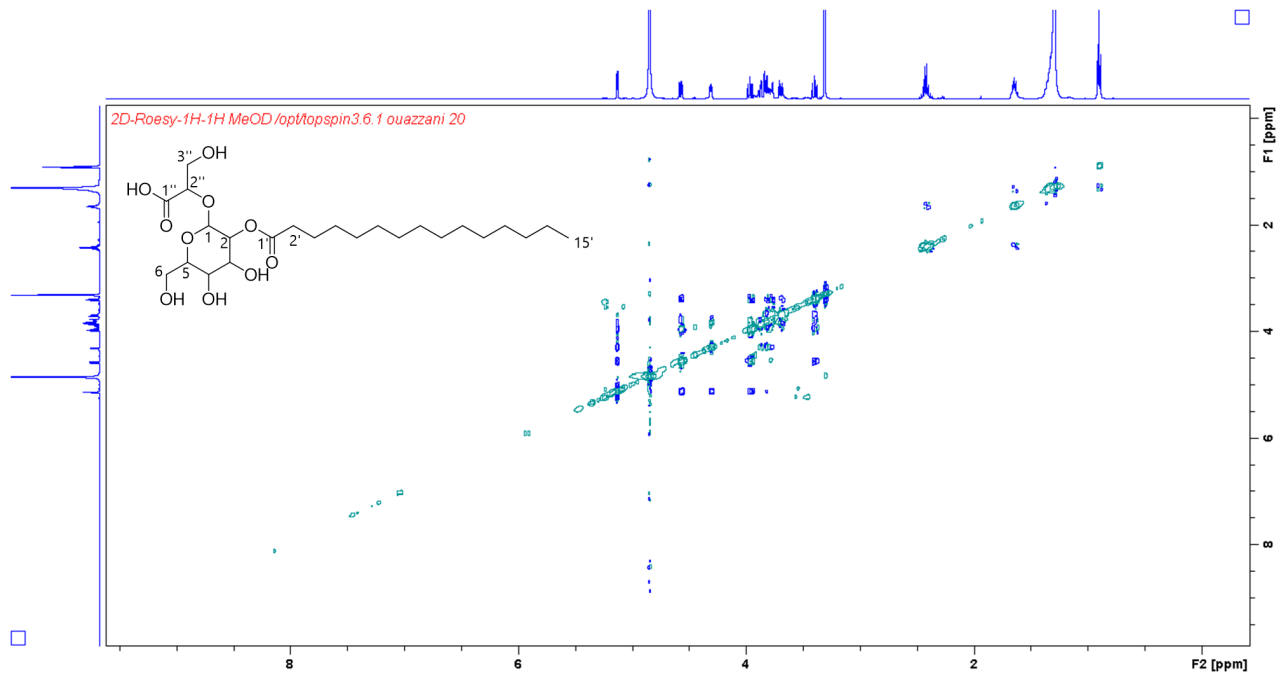
Annexe S37 : Spectre ^1H RMN du composé 11 (500 MHz, CDCl_3)Annexe S38 : Spectre ^{13}C RMN du composé 11 (125 MHz, CDCl_3)

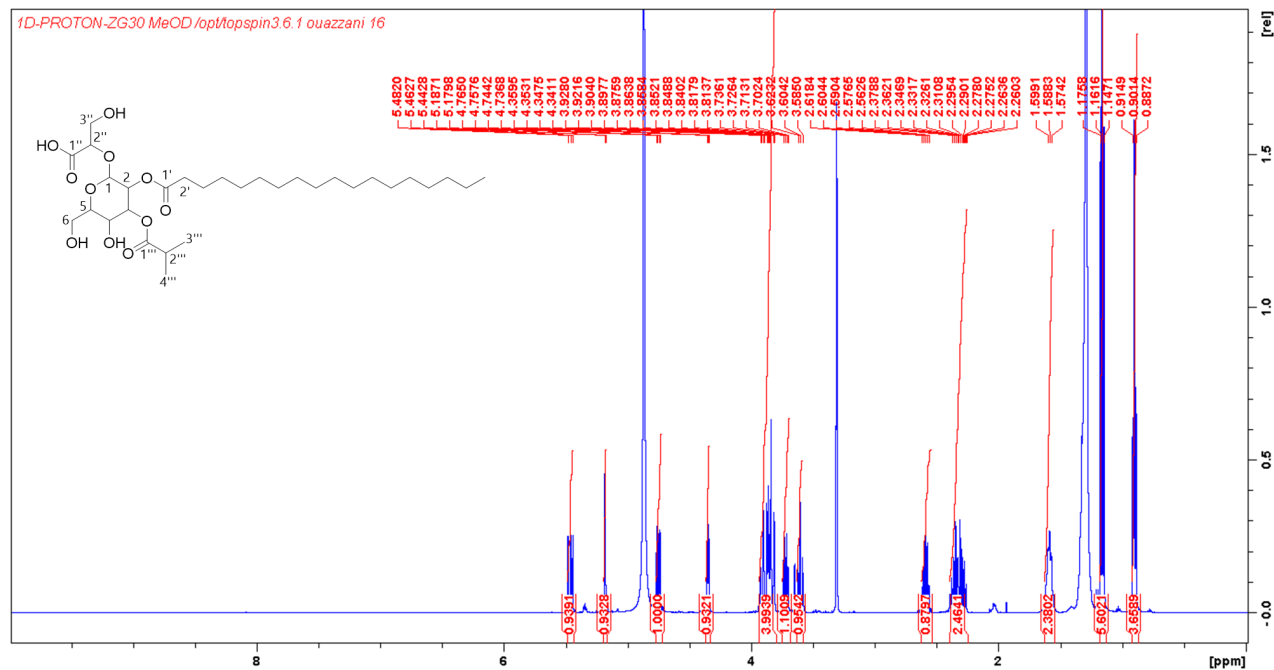
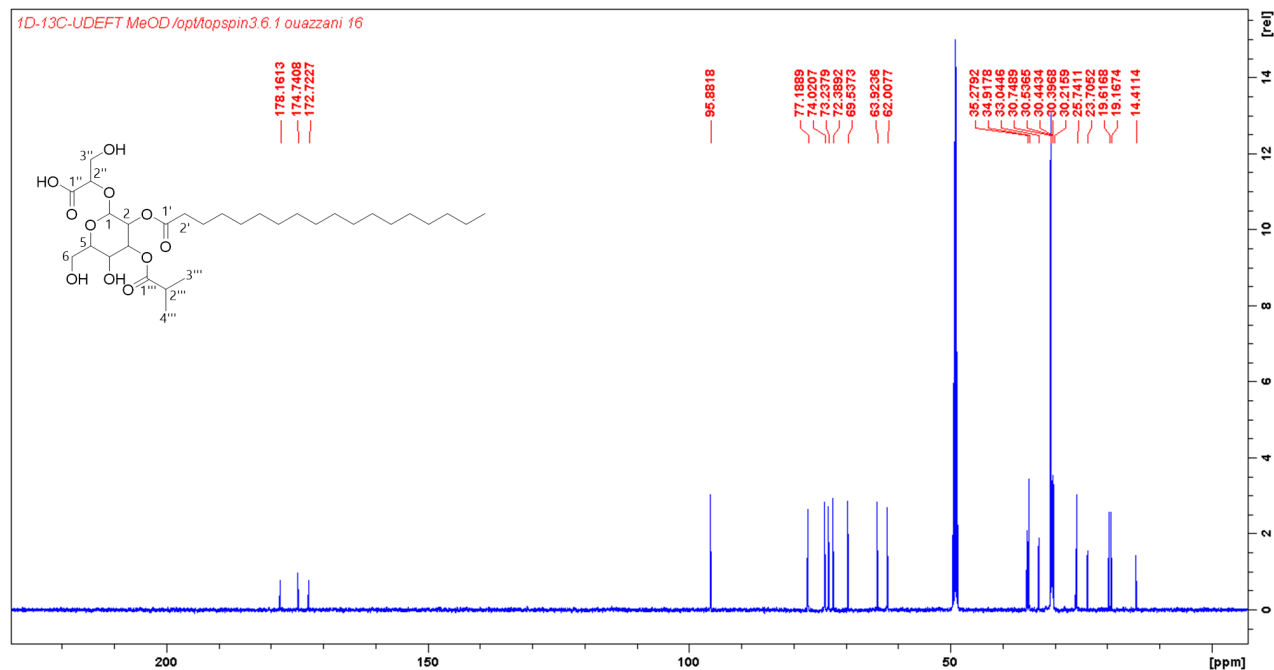
Annexe S39 : Spectre COSY du composé **11** (500 MHz, CDCl₃)Annexe S40 : Spectre HSQC du composé **11** (500 MHz, CDCl₃)

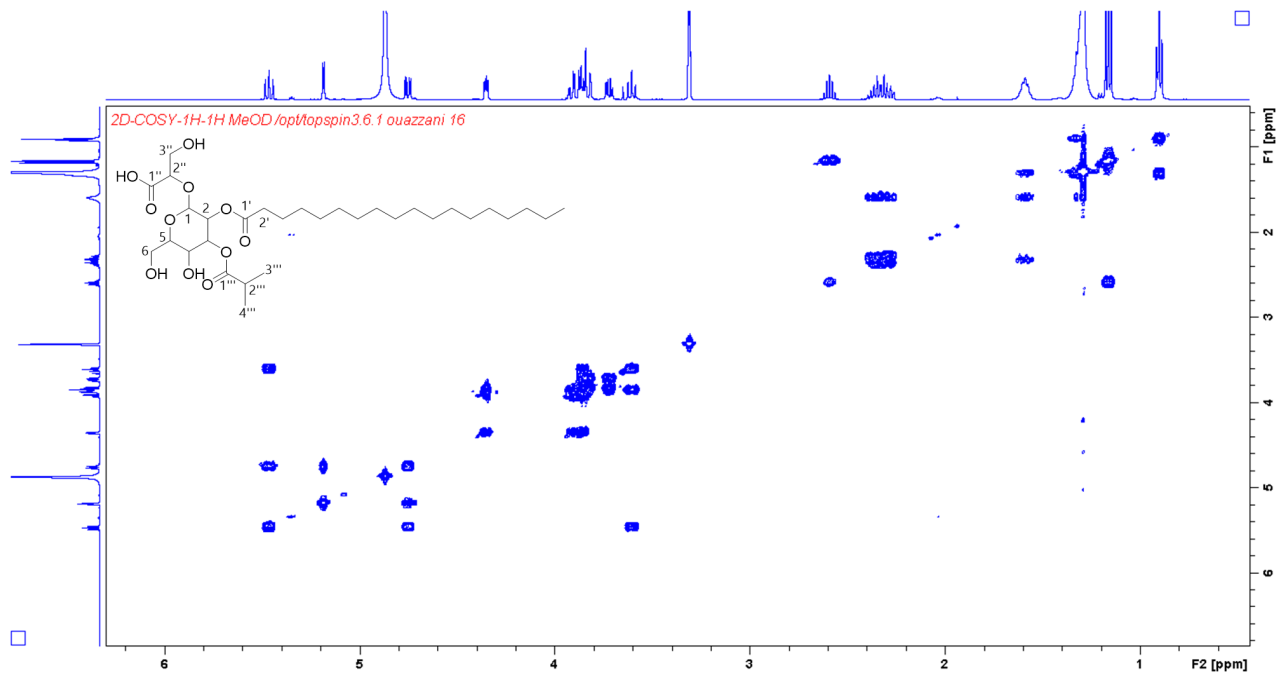
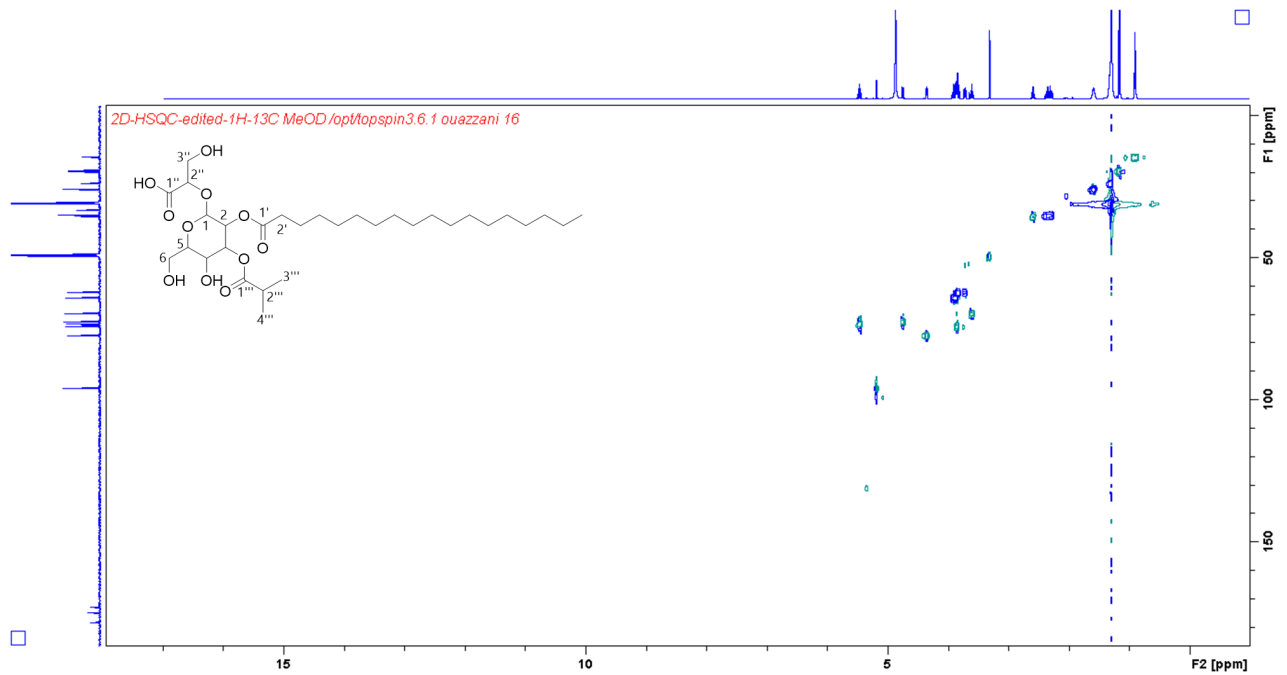
Annexe S41 : Spectre HMBC du composé **11** (500 MHz, CDCl₃)Annexe S42 : Spectre NOESY du composé **11** (500 MHz, CDCl₃)

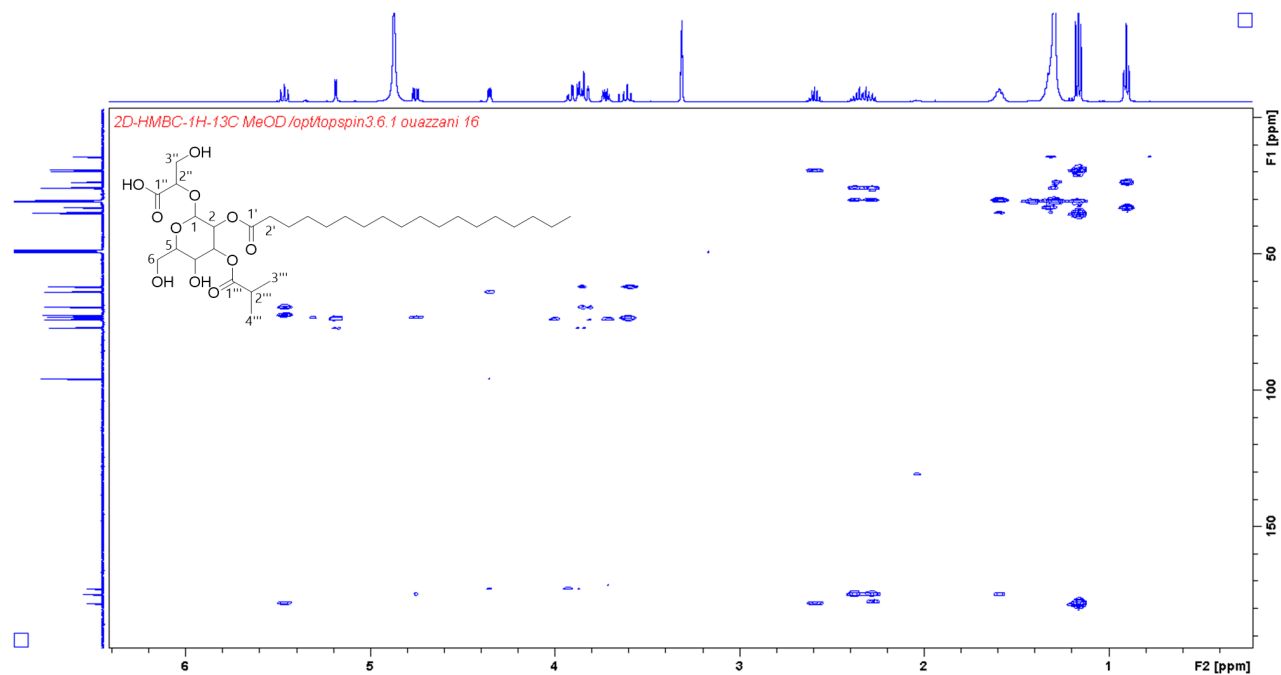
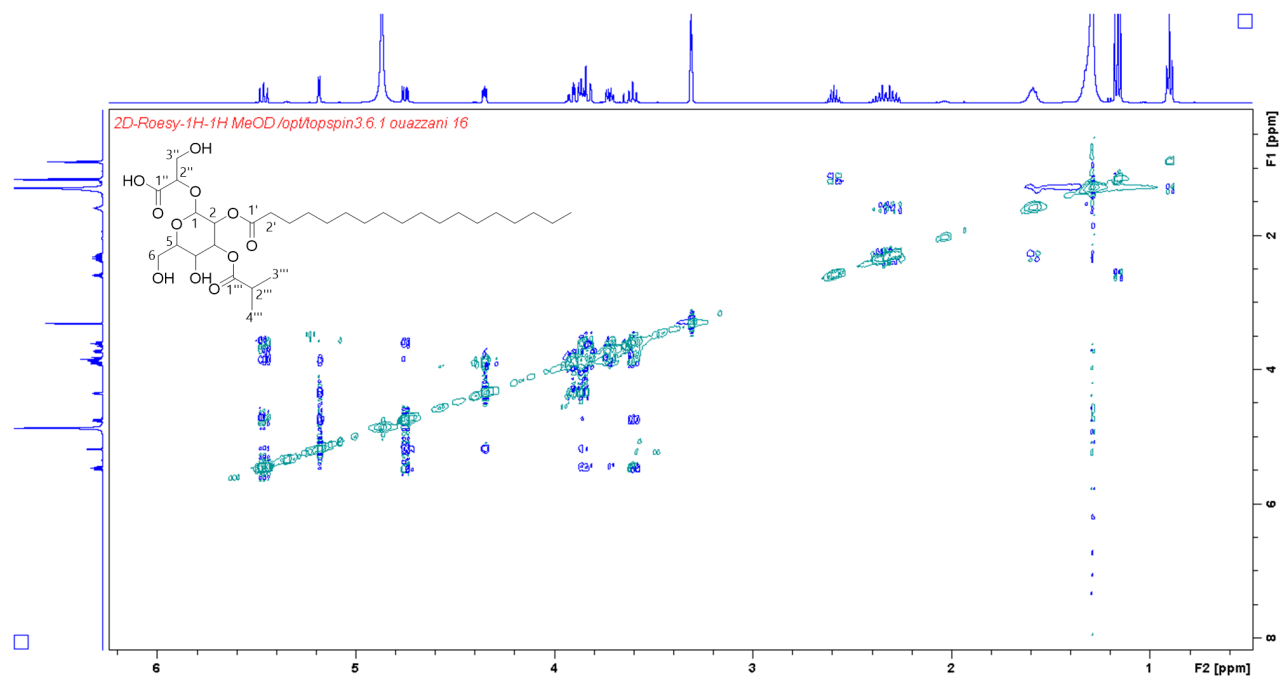
Annexe S43 : Spectre ^1H RMN du composé **12** (500 MHz, MeOH- d_4)Annexe S44 : Spectre ^{13}C RMN du composé **12** (125 MHz, MeOH- d_4)

Annexe S45 : Spectre COSY du composé **12** (500 MHz, MeOH-d₄)Annexe S46 : Spectre HSQC du composé **12** (500 MHz, MeOH-d₄)

Annexe S47 : Spectre HMBC du composé **12** (500 MHz, MeOH-d₄)Annexe S48 : Spectre ROESY du composé **12** (500 MHz, MeOH-d₄)

Annexe S49 : Spectre ^1H RMN du composé 13 (500 MHz, MeOH- d_4)Annexe S50 : Spectre ^{13}C RMN du composé 13 (500 MHz, MeOH- d_4)

Annexe S51 : Spectre COSY du composé **13** (500 MHz, MeOH-d₄)Annexe S52 : Spectre HSQC du composé **13** (500 MHz, MeOH-d₄)

Annexe S53 : Spectre HMBC du composé **13** (500 MHz, MeOH-d₄)Annexe S54 : Spectre ROESY du composé **13** (500 MHz, MeOH-d₄)

VALORISATION SCIENTIFIQUE

VALORISATION SCIENTIFIQUE

PUBLICATIONS

- THESIS

2022 Spirobistetrodecamycins A and B: Spontaneous Dimeric Spiro-Fused Vinyl Cyclobutanes of Tetrodecamycin - Phuong-Y Mai, Erwan Poupon, Jamal Ouazzani, Philippe Lopes, Pascal Retailleau, Jean-François Gallard, Karine Leblanc, Xavier Moppert, Bernard Costa, Géraldine Le Goff, and Mehdi A. Beniddir (*in preparation*)

2021 Solid-Phase Extraction Embedded Dialysis (SPEED), an Innovative Procedure for the Investigation of Microbial Specialized Metabolites - Phuong-Y Mai, Géraldine Le Goff, Erwan Poupon, Philippe Lopes, Xavier Moppert, Bernard Costa, Mehdi A Beniddir, Jamal Ouazzani

Mar. Drugs **2021**, 19(7), 371; <https://doi.org/10.3390/md19070371>

- INTERSHIP

2021 Chlorinated bianthrone from the cyanolichen *Nephroma laevigatum* - Aurélie Lagarde, Lengo Mambu, Phuong-Y Mai, Yves Champavier, Jean-Luc Stigliani, Mehdi A Beniddir, Marion Millot

Fitoterapia **2021**, 149, 104811; <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104811>

2019 Identification of Antimicrobial Compounds from *Sandwithia guyanensis*-Associated Endophyte Using Molecular Network Approach - Phuong-Y Mai, Marceau Levasseur, Didier Buisson, David Touboul, Véronique Eparvier

Plants **2020**, 9(1), 47; <https://doi.org/10.3390/plants9010047>

SYMPOSIUM AND WEBINAR

2022 Invited Speaker at 60th anniversary of Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN)

2022 Invited Speaker for the 5th Webinar on metabolomics - Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF)

COMMUNICATIONS AND POSTER

2022 Bibliographic seminars of CNRS-ICSN - Metabolic modulation of tumours with engineered bacteria for immunotherapy - Canale, F.P., Basso, C., Antonini, G. et al.

Nature **598**, 662–666 (2021)

2022 Poster: Targeted chemical space exploration of Polynesian Kopara mats microorganisms - Phuong-Y Mai et *al.*
Summer School METABIODIVEX, Aussois, France

2021 Oral Communication: Targeted chemical space exploration of Polynesian Kopara mats microorganisms - BioCIS PhD day
CY Cergy Paris Université.

