HAL
open science

Métabolites secondaires de champignons de sédiments marins profonds : criblages génétique et fonctionnel et caractérisation structurale de molécules antimicrobiennes

Marion Navarri

To cite this version:

Marion Navarri. Métabolites secondaires de champignons de sédiments marins profonds : criblages génétique et fonctionnel et caractérisation structurale de molécules antimicrobiennes. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2016. Français. NNT : 2016BRES0127 . tel-01523767

HAL Id: tel-01523767

https://theses.hal.science/tel-01523767

Submitted on 16 May 2017

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.

université de bretagne occidentale

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire

présentée par

Marion Navarri

Préparée au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (EA 3882)

Métabolites secondaires de champignons de sédiments marins profonds: criblages génétique et fonctionnel et caractérisation structurale de molécules antimicrobiennes

Thèse soutenue le 16 Décembre 2016

devant le jury composé de :

Soizic PRADO
Professeur, Museum National d'Histoire Naturelle - CNRS - UMR 7245, *Rapporteur*

Yves françois POUCHUS
Professeur, Molécule Mer Santé (EA 2160), *Rapporteur*

Ali AL-MOURABIT
Directeur de Recherche, Institut de Chimie des Sciences Naturelles - CNRS - UPR 2301, *Examinateur*

Georges BARBIER
Professeur, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (EA 3882), *Directeur de Thèse*

Gaëtan BURGAUD
Docteur, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (EA 3882), *Encadrant de Thèse*

Yannick FLEURY
Docteur, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (EA 3882), *Encadrant de Thèse*

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, avec le soutien financier du projet européen MaCuMBA (Marine Microorganisms : Cultivation Methods for improving their Biotechnological Application) et de la région Bretagne.

Dans un premier temps, j'adresse mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ces travaux. Je leur suis reconnaissante du temps et de l'énergie qu'ils vont y consacrer.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Catherine Rouiller et Ali Al Mourabit pour leurs avis sur les résultats obtenus à mi-parcours, et leurs conseils pour finaliser cette thèse.

Je remercie le directeur du laboratoire, le professeur Emmanuel Coton ainsi que les directeurs de sites, le professeur Jérôme Mounier, à Plouzané, et le professeur Ivan Leguérinel, à Quimper, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et dans leurs équipes de recherche respectives.

Je remercie également le professeur Georges Barbier, mon directeur de thèse, pour son regard neuf apporté au fur et à mesure des travaux et pour l'aide qu'il m'a apportée au cours de ces trois années.

Mes remerciements vont maintenant à ceux qui ont encadré ces travaux au quotidien : les docteurs Gaëtan Burgaud et Yannick Fleury. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en me laissant travailler sur ce projet. Merci également pour le partage de vos connaissances scientifiques et pour vos conseils avisés qui m'ont permis d'avancer et de m'améliorer au fil des ans. Merci à vous deux pour votre disponibilité de tous les instants, votre investissement sans faille et pour m'avoir guidée dans les méandres de la thèse aussi bien sur le plan expérimental que rédactionnel. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Ayant travaillé sur les différents sites du LUBEM, je tiens à remercier les différentes personnes qui ont participé de près ou de loin dans ce projet :

A Plouzané,

Mes remerciements vont à Laurence, sans qui ce travail n'aurait pas été le même. Ta pédagogie, ton calme et optimisme à toute épreuve m'ont permis d'avancer sereinement.

Merci également à Amélie, ingénieur d'étude, pour avoir répondu présente au moment où je te sollicitais, même quand le moment était mal choisi.

Je tiens également à remercier les techniciens pour leur disponibilité, le temps qu'ils m'ont consacré et l'aide qu'ils m'ont apportée : Christophe, merci de m'avoir donné les milieux qui m'ont si souvent dépannée. Danielle et Elisabeth, merci à vous pour les produits et/ou consommables que j'ai cherchés si longtemps et que vous avez trouvés en trente secondes. Sylvie, merci pour les quelques litres de milieux et les centaines de boîtes que tu m'as préparée. Stella, un grand merci pour m'avoir tant aidé aussi bien sur le plan professionnel, dans le côté obscur de la biologie moléculaire que personnel. Merci pour tous les bons moments passés à rire qui m'ont permis de m'évader.

Je tiens à dire merci aux doctorants que j'ai pu côtoyer, Vanessa, Kévin, Céline, Marlène, Guillaume, et Stéphanie, qui ont soutenu. Vous aviez raison, 3 ans c'est court ! Merci à vous pour tous vos conseils et pour les moments que nous avons passés ensemble. Bonne continuation à tous.

Je tiens également à remercier l'équipe de l'administration pour sa bonne humeur communicative. Marielle, merci pour ta disponibilité. Marie-Hélène, un grand merci à toi, pour ta gentillesse et tes conseils culinaires avisés. Aujourd'hui la blanquette de veau n'a plus de secret pour moi !

Je remercie également toute l'équipe de foot en salle, qui n'est autre que constituée du personnel du LUBEM (Enseignant-chercheurs, ingénieurs, doctorants, stagiaires...) de m'avoir intégrée dans l'équipe malgré mes pieds carrés. Grâce à vous mes soirées du jeudi passaient plus vite. Merci pour cette expérience footbalistique.

A Quimper,

Un grand merci à Camille, pour toute l'aide que tu as su m'apporter au cours de ses deux dernières années passées. Ta pédagogie et tes conseils m'ont permis de mieux comprendre la spectromètrie de masse. Merci également pour ces moments cultes passés à chanter « broyage broyage » (sur un air de Désirless).

Merci à Benjamin, pour le soutien et l'aide que tu m'as apportée au cours de mes années quimpéroises.

Je remercie également Louis et Olivier, parce que l'un ne va pas sans l'autre, pour votre soutien et vos encouragements quotidiens sur le plan professionnel, mais aussi sur plan sportif alors que j'étais à la traîne lors de notre unique sortie VTT de 30km autour de Cap Coz, vous m'aviez attendue (et mise KO !). Depuis je me suis entrainée et je suis opérationnelle pour retenter l'aventure !

Merci également aux doctorants quimpérois, Narjes, Clément T et Clément O qui ont récemment soutenu puis Emilie en dernière année de thèse et Lucie post-doctorante, pour tous les moments de rigolades passés ensemble et qui ont fait défilé le quotidien. Plus particulièrement merci à Clément Offret, mon collègue de bureau, on s'est soutenu pendant 2 ans, on a partagé de très bons moments, mais aussi de longs moments de solitude (à deux) l'été dans le bâtiment G, au cours desquels nous avons co-écrit « je craque » (sur un air de Lara Fabian).

Merci également à Florie et Vincent, ingénieurs de projet, sans qui les heures passées en salle de bioch' n'auraient pas aboutie aux extraordinaires reprises de Cookie Dingler « ne te laisse pas aller » et Gilbert Montagné « on va aimer ». Grâce à vous les journées biochimie ont été moins longues.

Stéphanie, aujourd'hui tu es partie pour de meilleurs horizons. Je tiens tout de même à te remercier pour m'avoir accueillie, présenté le fonctionnement du laboratoire et formé à l'utilisation des différents appareils.

Je tiens également à remercier Anne Levant, pour son sourire quotidien et sa disponibilité à toutes épreuves.

Merci à tous les Quakers, pour avoir chassé PinPin le Lapin tous les midis. Il vous fallait bien un bon dernier. Il va maintenant falloir que vous trouviez une autre cible.

Un énorme merci à Denis Rousseaux, technicien à l'IUT Quimper, et fournisseur officiel d'azote liquide. Sans toi « broyage broyage » n'auraient pu être écrit. Denis garde ton sourire et ta bonne humeur qui m'ont tant fait rire.

Les extérieurs

Je tiens maintenant à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ces trois années. Tout d'abord, merci à Stéphanie Renard, secrétaire au LM2E, pour avoir entièrement gérer la partie administrative du projet.

Je tiens également à dire merci à Thomas Guillemette, enseignant-chercheur à l'université d'Angers, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci de m'avoir consacrée du temps et guidée avec la néphélométrie Laser.

Un grand merci à Arnaud Bondon, directeur de recherche au CNRS, pour toutes les analyses RMN réalisées en un temps record.

Je tiens à remercier Catherine Roullier et Samuel Bertrand, enseignants-chercheurs à l'université de Nantes, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et pour le temps qu'ils m'ont accordé pour m'initier au processus de déréplication des métabolites et au traitement des données.

Je remercie Alexis Bazire, enseignant-chercheur à l'Université de Bretagne Sud, pour m'avoir initiée aux activités antibiotfilms.

Merci également à Stéphane Bach et l'ensemble de son équipe, ingénieur de recherche à la station biologique de Roscoff, pour l'analyse de l'activité anti-kinase des molécules caractérisées au cours de ce projet.

Une pensée également pour tous les stagiaires qui ont participé de près ou de loin à ce projet. Hélène, David, Goulven et Karine, merci pour votre aide, votre gentillesse et votre bonne humeur. Bonne continuation pour la suite. Karine un grand merci pour ses moments inoubliables passés à produire le single mycélium de Maître M. Aujourd'hui tu peux compter sur 4 couplets.

Merci à mes amis qui ont traversé la France pour me faire décompresser. Merci à ma famille sans qui je ne serai pas arrivée jusque-là. Votre soutien, et votre optimisme m'ont permis d'apercevoir la lumière au bout du tunnel. Julien un énorme merci à toi qui m'a soutenu et précieusement aidé au quotidien durant ces derniers mois.

SOMMAIRE

Table des illustrations 3

Liste des tableaux 4

Liste des abréviations 5

Préambule 7

Introduction 13

Travaux de recherche 55

Chapitre 1 : Richesse de la biodiversité fongique et adaptation physiologique des champignons de sédiments marins 57

Chapitre 2 : Criblage d'activités antimicrobiennes et extraction des composés bioactifs de champignons de sédiments marins profonds 85

Chapitre 3 : Molécules bioactives produites par Oidiodendron griseum UBOCC-A-114129 isolé de sédiments marins profonds 101

Chapitre 4 : Déréplication métabolique 121

Discussion générale et perspectives 127

Bibliographie 145

Valorisation des travaux de recherche 175

Annexe 183

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Nombre d'antimicrobiens nouvellement autorisés par la FDA et incidence des souches résistantes isolées en Union Européenne 10
Figure 2 : Aspects chronologiques de l'autorisation de mise sur le marché des antibiotiques par la FDA et de l'apparition des premières résistances aux antibiotiques 11
Figure 3 : Evolution de la structure des céphalosporines 16
Figure 4 : Les différentes étapes du processus de déréplication 21
Figure 5 : Les molécules marines et les organismes producteurs 23
Figure 6 : Différents écosystèmes océaniques 25
Figure 7 : Origine des molécules marines, isolées d'écosystèmes situés à plus de 50m de profondeur 30
Figure 8 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'ADN codant l'ARNr 18S fongique. 35
Figure 9 : Nombre de métabolites de champignons marins décrits chaque année 38
Figure 10 : Structure de l'herqueidiketal 39
Figure 11 : Famille de molécules actives chez les champignons marins 41
Figure 12 : Comparaison des mécanismes de synthèse des polycétides fongique et bactérien 42
Figure 13 : Structures de l'acide osellinique et de la griseofulvine 43
Figure 14 : Organisation de la voie de biosynthèse de la griseofulvine 44
Figure 15 : Structure de la PKS de type III 44
Figure 16 : Les différents types de NRPS 46
Figure 17 : Organisation de la voie de biosynthèse de la céphalosporine C 47
Figure 18 : Biosynthèse des précurseurs des terpenoides 48
Figure 19 : Organisation de la voie de biosynthèse de la pleuromutiline 50
Figure 20 : Premières étapes communes à la synthèse des ergots d'alcaloïdes 51
Figure 21 : Organisation de la voie de biosynthèse des fumigaclavines 52
Figure 22 : Chromatogramme de l'extrait de PDA 0,2% de *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097 et spectre de fragmentation du composé à 320Da 119
Figure 23 : Structure de l'acide mycophénolique 120
Figure 24 : Chromatogramme de l'extrait de PDA 0,2% de *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109 et spectre de fragmentation du composé à 542Da 120

Figure 25 : Structure de la rugulosine 120
Figure 26 : Analyse en composante multiple de la répartition des métabolites produits par les différents isolats dans les différents extraits. 124
Figure 27 : Analyse en composante multiple de la répartition des métabolites produits par les différents isolats avec suppression des variables rares 124
Figure 28 : Diagramme de Venn démontrant la distribution des métabolites secondaires en fonction des conditions de culture et d'analyse 125
Figure 29 : Nombre d'isolats cultivés après une étape d'enrichissement sous une pression 130
Figure 30 : Schéma de la stratégie élaborer pour sélectionner les isolats d'intérêt 132
Figure 31 : Schéma de la stratégie suivie pour sélectionner les isolats fongiques à activité antimicrobienne et accéder aux composés antimicrobiens 135
Figure 32 : Nouvelle stratégie proposée pour caractériser des molécules naturelles originales.... 141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classement, par le CDC, des micro-organismes multi-résistants représentant une menace pour la santé publique 8
Tableau 2 : Liste des composés d'origine marine ou des dérivés de molécules marines autorisés sur le marché par la FDA et/ou L'EMA 22
Tableau 3 : Extraits analysés en déréplication 123

LISTE DES ABREVIATIONS

CDC : Centre for Disease Control and Prevention

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

EMA : European Medicine Agency

FDA : Food and Drug Administration

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IC_{50} : Concentration d'un composé inhibant 50 % de l'effet observé

IODP : Integrated Oceans Drilling Program

LC-DAD-HRMS : Liquid Chromatography-Diode Array Detector-High Resolution Mass Spectrometer

MaCuMBA : Marine microorganisms: Cultivation Methods for improving their Biotechnological Applications

MS : Mass Spectrometer

NRPS : Non Ribosomal Peptide synthetase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONU : Organisation des Nations Unies

OSMAC : One Strain, MAny Compounds

PCR :Polymerase Chain Reaction

PKS : PolyKetide Synthase

RMN : Résonance magnétique nucléaire

TPS : Terpene Synthase

PREAMBULE

L'émergence de micro-organismes résistants aux antimicrobiens représente un problème mondial de santé publique. La résistance aux antibiotiques ou antibiorésistance menace l'efficacité des antimicrobiens existants. L'Organisation Mondiale de la santé (OMS) alerte la population sur les conséquences désastreuses de la résistance aux antibiotiques (World Health Organization, 2014). Même l'Organisation des Nations Unies (ONU), qui n'intervient que très rarement sur les questions de santé, avertit des dangers de l'antibiorésistance. Ban Ki-moon secrétaire général de l'ONU, déclare lors de l'assemblée générale du 21 septembre 2016 : « Antimicrobial resistance poses a fundamental, long-term threat to human health ». L'antibiorésistance affaiblit l'arsenal thérapeutique et compromet également indirectement d'autres avancées médicales acquises. En effet, les antibiotiques jouent un rôle clé dans la prévention et/ou le traitement des infections en lien avec les traitements de chimiothérapie, de maladies chroniques comme le diabète, ou de chirurgies complexes comme des transplantations d'organes ou de chirurgie cardiaque (Rossolini *et al.*, 2014).

La résistance des micro-organismes aux antibiotiques peut être innée ou acquise. Dans le premier cas, la résistance est incluse dans le patrimoine génétique. L'espèce est naturellement résistante à une ou plusieurs classes d'antibiotiques. Dans le second cas, la souche microbienne a subi une mutation chromosomique ou acquis un(de) nouveau(x) gène(s), par transfert horizontal, se traduisant par la résistance à un ou plusieurs antibiotiques (Tenover, 2006). Ce transfert horizontal de gènes, vecteur de résistances, est particulièrement préoccupant et attire de plus en plus l'attention des pouvoirs publics. Récemment, le cas du plasmide *mcr-1*, vecteur de résistance à la colistine, a été mis en évidence (Liu *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2016). La colistine représentait l'antibiotique de dernière intention pour traiter les infections aux entérobactéries résistantes aux carbapénèmes. L'utilisation abusive des antibiotiques, surtout à des concentrations sub-optimales, exerce une pression de sélection sur les micro-organismes, favorisant l'apparition et la prolifération des germes résistants voire multi-résistants (résistants à plusieurs antibiotiques). La transmission des gènes de résistance à des micro-organismes jusqu'alors sensibles est possible par transfert horizontal (Laxminarayan *et al.*, 2013). Par conséquent, le nombre de micro-organismes pathogènes ou opportunistes résistants à un ou plusieurs agents antimicrobiens ne cesse d'augmenter.

Récemment, le Centre for Disease Control and prevention (CDC) a classé les micro-organismes pathogènes multi-résistants en fonction du niveau de menace en utilisant 7 facteurs : l'impact clinique, l'impact économique, l'incidence, la projection à 10 ans de l'incidence, la transmissibilité, la disponibilité d'antibiotiques effectifs et les barrières de prévention (Tableau 1). Ce classement a permis de constituer 3 groupes (« urgent », « sérieux » et « préoccupant ») comprenant principalement des bactéries et une levure, *Candida albicans*.

Tableau 1 : Classement, par le CDC, des micro-organismes multi-résistants représentant une menace pour la santé publique (adapté de (CDC, 2013))

Menace urgente	*Clostridium difficile*
	Enterobactéries résistantes aux carbapénèmes
	Neisseria gonorrhoeae résistante aux antibiotiques, particulièrement la céphalosporine
Menace sérieuse	*Acinetobacter* multirésistants
	Campylobacter résistants
	Candida résistantes au fluconazole
	Enterobactéries sécrétant des β-lactamases à spectre large
	Enterococcus résistants à la vancomycine
	Pseudomonas aeruginosa multirésistants
	Salmonella typhique et non typhique résistantes
	Shigella résistantes
	Staphylococcus aureus résistants à la méthicilline
	Streptococcus pneumonia résistants
	Mycobacterium tuberculosis multirésistants et extrêmement résistants
Menace préoccupante	*Staphylococcus aureus* résistants à la vancomycine
	Groupe A de *Streptococcus* résistant à l'érythromycine
	Groupe B de *Streptococcus* résistant à la clindamycine

L'impact de l'antibiorésistance en santé publique est considérable. Environ 700 000 décès sont attribuables chaque année à des infections liées à des micro-organismes résistants, dont 23 000 aux Etats-Unis (CDC, 2013) et 25 000 en Europe (European Centre for Disease Prevention and Control, 2009). D'après les estimations, basées sur des modèles prédictifs, d'ici 2050, l'antibiorésistance sera la première cause de mortalité mondiale, entrainant plus de 10 millions de décès par an, dont près de 5 millions en Asie, 4 millions en Afrique, 400 000 en Europe et 300 000 en Amérique du Nord, devançant largement le nombre de décès dus au cancer (AMR Review, 2014).

Plusieurs études ont tenté de déterminer le coût de cette antibiorésistance. En effet, les patients infectés par des germes résistants sont plus fréquemment et plus longuement hospitalisés. De plus, leur traitement nécessite des protocoles thérapeutiques plus onéreux. Au sein de l'Union Européenne, le surcoût attribué à l'antibiorésistance s'élèverait à 1,5 milliards d'euros (ECDC & EMA, 2009). Aux Etats-Unis, il atteindrait les 55 milliards de dollars (Roberts *et al.*, 2009; CDC, 2013).

Ce phénomène d'antibiorésistance impacte non seulement le système de santé mis en place au fil des ans mais également son économie.

Les causes de l'antibiorésistance sont multiples : une surconsommation d'antibiotiques liée à des prescriptions inappropriées, des usages préventifs comme dans les élevages intensifs, une dispersion de résidus d'antibiotiques dans l'environnement favorisant la création de niches microbiennes résistantes. Dès 1945, Sir Alexander Fleming, à l'origine de la découverte de la pénicilline et donc de l'ère moderne des antibiotiques, signalait des risque liés à l'utilisation intensive des antibiotiques (Fleming, 1945).

L'émergence rapide des antibiorésistances provient également de la crise de l'innovation dans l'industrie pharmaceutique et notamment du manque de renouvellement des molécules antimicrobiennes. Le développement de nouveaux antimicrobiens n'est plus considéré comme un investissement rentable par les industries pharmaceutiques. Les antibiotiques sont utilisés sur de courtes périodes et sont curatifs, contrairement à d'autres molécules traitant des maladies chroniques. Ainsi, sur les 18 plus grandes entreprises pharmaceutiques, 15 ont abandonné le développement d'agents antimicrobiens (Bartlett *et al.*, 2013). Dès lors, le nombre de nouveaux antibiotiques autorisés sur le marché ne cesse de diminuer et reste faible (Munos, 2009) alors qu'en parallèle, le nombre de souches résistantes à un ou plusieurs antimicrobiens augmente depuis le début du 21ème siècle (Figure 1). Depuis la fin des années 80, il aura fallu attendre une dizaine d'année pour voir la commercialisation de nouvelles molécules avec des mécanismes d'actions légèrement différents : le linézolide (inhibition de la synthèse protéique), la daptomycine (perturbation de l'intégrité membranaire) et la retapamuline (inhibition de la synthèse protéique en plusieurs points), ont été respectivement approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) en 2000, 2003 et 2007.

Dans ce contexte, un groupe de travail pour la préservation des antibiotiques a récemment été créé par le Ministère des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes. Il a identifié quatre axes majeurs pour limiter l'émergence et la dissémination des résistances microbiennes (Carlet & Le Coz, 2015) :

- approfondir les recherches, en particulier sur de nouveaux produits luttant contre l'antibiorésistance,

- suivre l'évolution globale du phénomène via des indicateurs normalisés et partagés,
- améliorer l'usage des antibiotiques,
- accroître la sensibilisation des populations au bon usage des antibiotiques.

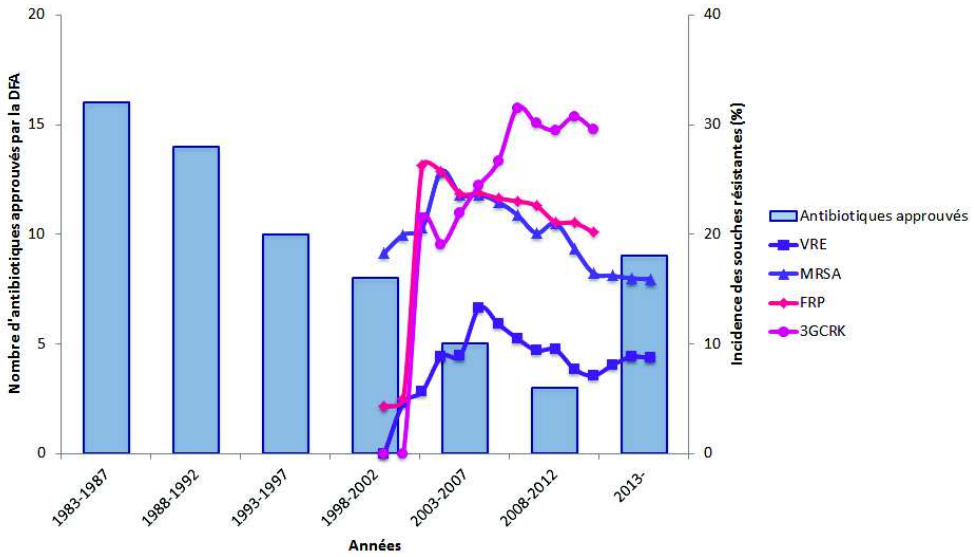


Figure 1 : Nombre d'antimicrobiens nouvellement autorisés par la FDA par période de 4 ans et incidence des souches résistantes isolées en Union Européenne (incluant Norvège et Islande) (ECDC, 2016). VRE : *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine, MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, FRP : *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux fluoroquinolones, 3GCRK : *Klebsiella pneumoniae* résistante à la 3ème génération de céphalosporines

Ainsi, le premier axe majeur de ce rapport d'experts est basé sur la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes. Le renouvellement de l'arsenal thérapeutique est de ce fait crucial afin de limiter l'impact de l'antibiorésistance au cours des prochaines décennies. D'ailleurs, depuis 2013 la recherche de molécules antimicrobiennes s'est relancée avec 9 nouveaux antibiotiques (antibactériens et antifongiques) autorisés (Figure 1).

Cependant les résistances microbiennes aux antibiotiques apparaissent inévitables. La mise sur le marché de nouveaux antibiotiques ne fera que ralentir cette crise sanitaire (Figure 2). L'acquisition de résistance et son temps d'acquisition sont des phénomènes imprédictibles. Ils varient de quelques années à plusieurs décennies. Pour résumer, il apparaît crucial d'associer à une

nouvelle banque de molécules antimicrobiennes une utilisation plus raisonnée des antibiotiques, afin de minimiser l'apparition trop rapide de phénomènes de résistance aux antibiotiques.

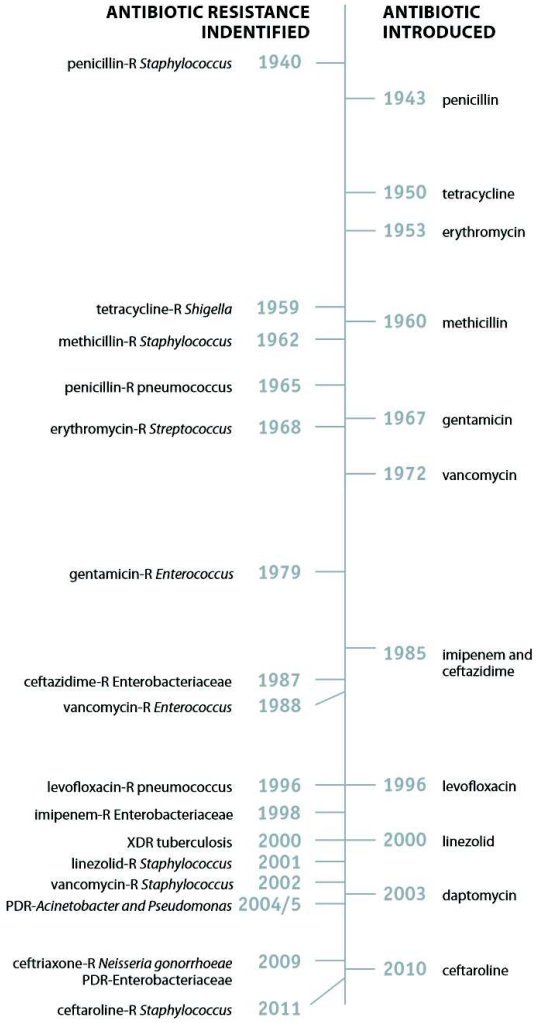


Figure 2 : Aspects chronologiques de l'autorisation de mise sur le marché des antibiotiques (par la FDA) et de l'apparition des premières résistances aux antibiotiques, de 1940 à 2011 (CDC, 2013). R : résistant ; PDR : Résistant à tous les antibiotiques ; XDR : extrêmement résistant, (*i.e.* sensible à seulement 1 voire 2 familles d'antibiotiques) (Magiorakos *et al.*, 2012)

Après ce préambule, l'objectif de l'introduction bibliographique sera avant tout de présenter les molécules naturelles comme potentielle source de renouvellement des antibiotiques dans lutte contre l'antibiorésistance, en se concentrant sur les métabolites secondaires issus de micro-organismes, majoritairement fongiques.

INTRODUCTION

SOMMAIRE

I. les molécules naturelles bioactives : bioprospection et strategie analytique 15

A. Les micro-organismes à l'origine des antibiotiques 16

B. Les nouvelles approches pour découvrir de nouvelles molécules 18

1. Le *genome mining* 18

2. La métabolomique.....20

3. L'environnement marin : une source de molécules actives d'intérêt ?.....21

II. Le milieu marin, un réservoir de biodiversité microbienne et de chimio-diversité ?24

A. Caractéristiques environnementales : des paramètres physico-chimiques singuliers 24

B. La biosphère profonde.....28

C. Les micro-organismes marins profonds et synthèse de métabolites secondaires bioactifs.....30

III. Les champignons marins 32

A. Définition.....32

B. La diversité des champignons marins profonds 33

1. La diversité révélée par les méthodes moléculaires 34

2. La diversité cultivable 36

C. Les champignons marins de sub-surface une ressource biotechnologique ? 37

IV. Le métabolisme secondaire des champignons : voies de biosynthese..... 40

A. Les polycétides.....41

B. Les peptides non ribosomiques 45

C. Les terpènes.....47

D. Les alcaloïdes 50

V. Objectifs 53

I. LES MOLECULES NATURELLES BIOACTIVES : BIOPROSPECTION ET STRATEGIE ANALYTIQUE

Les molécules naturelles ont toujours représenté une part importante des molécules thérapeutiques utilisées en médecine. Entre 1981 et 2014, la FDA a approuvé de nombreuses molécules dont 73% de composés naturels et ou des dérivés de ces molécules (Newman & Cragg, 2016). La diversité chimique et structurale des molécules naturelles est immense (Dias *et al.*, 2012) et leur confère également une large gamme d'activité biologique dont notamment des activités antimicrobiennes mais aussi des activités anticancéreuses ou encore anti-inflammatoires. De plus, leurs propriétés pharmacocinétiques (absorption, métabolisation, solubilité…) sont souvent proches de celles requises pour les développements cliniques, leur permettant d'intégrer plus rapidement les circuits de développement pharmaceutiques (Harvey *et al.*, 2015). En effet, certains antibiotiques naturels peuvent être efficaces sous leur forme native (non modifiés), comme l'érythromycine A, la pénicilline G, ou encore l'amphotéricine B qui sont actuellement utilisées (Lam, 2007).

Néanmoins, ces molécules naturelles peuvent être également modifiées par transformation chimique, donnant ainsi naissance à de nombreux dérivés similaires à la molécule naturelle mère mais aux propriétés biologiques plus intéressantes, comme de meilleures propriétés pharmcocinétiques ou plus d'efficacité en termes d'activité biologique (Fischbach & Walsh, 2009; Newman & Cragg, 2012). C'est par exemple le cas des différentes générations de céphalosporines. Elles ont été synthétisées de façon à être moins sensibles aux enzymes de dégradations, telles que les β-lactamases, produites par les bactéries résistantes aux céphalosporines. Seules les chaînes latérales à la molécule sont modifiées par synthèse chimique, le noyau actif reste inchangé (Figure 3). Dans ce cas on parle de dérivés de produits naturels.

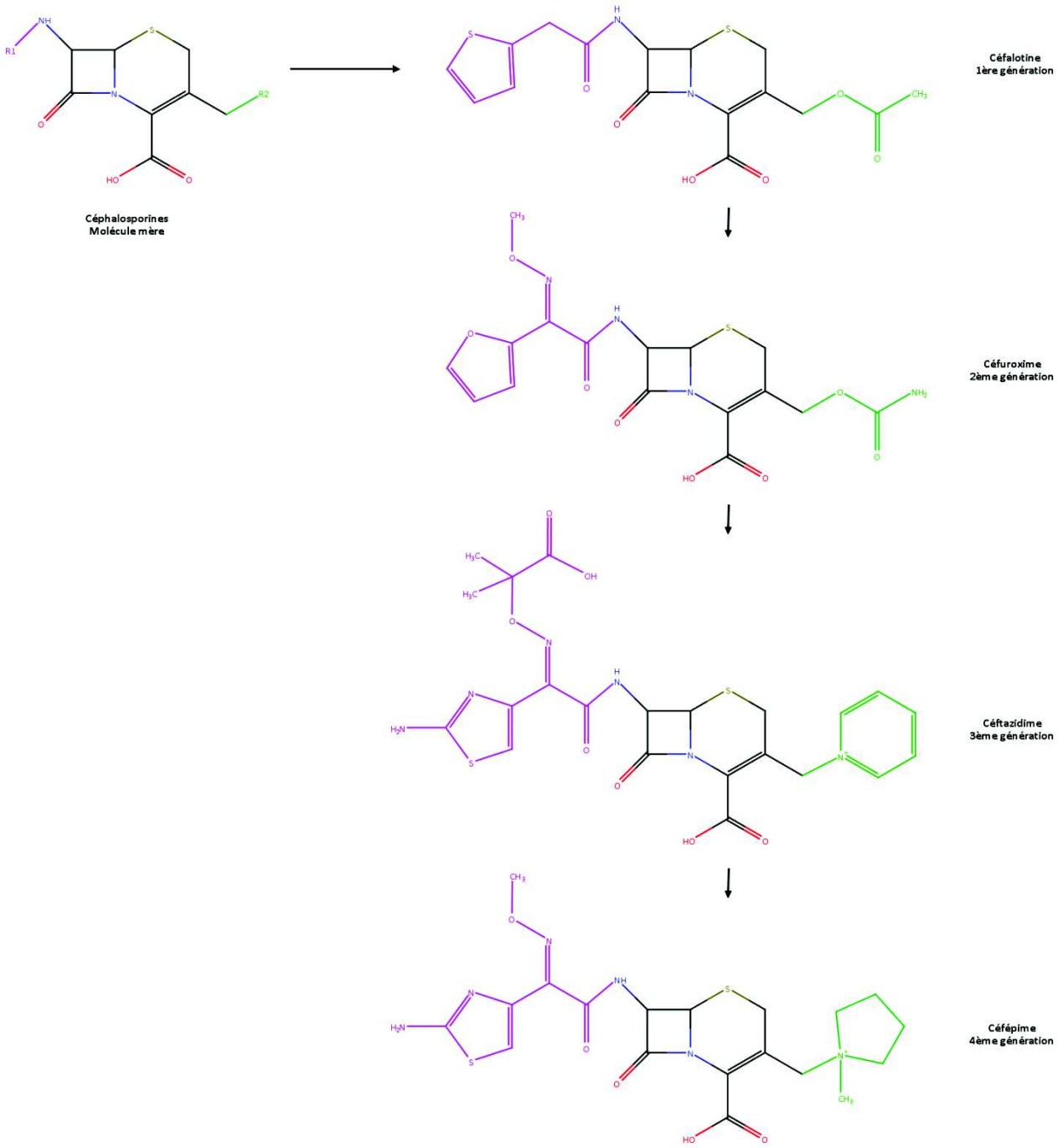


Figure 3 : Evolution de la structure des céphalosporines pour faire face à l'antibiorésistance. En noir, le noyau actif a été conservé, en rose et vert, les chaines latérales ont été modifiées (adaptée de (Fischbach & Walsh, 2009))

A. Les micro-organismes à l'origine des antibiotiques

La découverte de la pénicilline, synthétisée par *Penicillium chrysogenum* (Fleming, 1929), et son succès pendant la seconde guerre mondiale a lancé l'ère des antibiotiques. L'étude des micro-organismes et des molécules qu'ils produisent s'est alors accélérée. De nombreux micro-organismes

terrestres ont été isolés, identifiés et cultivés (Aminov, 2010). Leurs extraits ont été criblés, selon la méthode proposée par Alexander Fleming : les extraits ont été déposés sur un tapis bactérien (diffusion en agar) puis les produits actif ont été purifiés par chromatographie et caractérisés (Singh & Barrett, 2006; Aminov, 2010). Ces criblages ont abouti à la découverte de nombreux antibiotiques dont la streptomycine synthétisée par *Actinomyces griseus* (Schatz *et al.*, 1944), la polymixine isolée de *Bacillus polymyxa* (Stansly & Schlosser, 1947) ou encore la vancomycine produite par *Streptomyces orientalis* (Geraci *et al.*, 1956). Ainsi, entre 1940 et 1960, les principales classes d'antibiotiques, encore utilisées aujourd'hui ont été découvertes (Walsh and Wright, 2005). Actuellement, 69% des antibiotiques sont des molécules naturelles, parmi lesquelles 97% sont d'origine microbienne (Patridge *et al.*, 2016).

Encore aujourd'hui, les molécules antimicrobiennes produites par les micro-organismes occupent une place importante dans la recherche de nouvelles molécules naturelles. Une récente étude a permis l'isolement et la caractérisation d'une nouvelle molécule antimicrobienne n'engendrant pas de résistance bactérienne « détectable », dans les conditions de l'étude (Ling *et al.*, 2015). La teixobactine a été découverte suite à l'utilisation d'une iChip, une technique de culture *in situ* mimant les conditions environnementales et permettant la croissance de micro-organismes jusqu'alors incultivé. La teixobactine est un peptide original, produit par une nouvelle espèce de bactérie à Gram-négatif nommée *Eleftheria terrae*, isolée du sol. Elle inhibe la synthèse de la paroi bactérienne en se liant aux précurseurs du peptidoglycane (le lipide II) et de l'acide teichoique (le lipide III). Néanmoins, les aspects mécanistiques restent encore à élucider (Ling *et al.*, 2015; Von Nussbaum & Süssmuth, 2015). La nature lipidique des cibles de ce nouvel antibiotique laisse supposer que cette molécule n'engendrera pas de résistance dans les prochaines années. En effet, la résistance à la vancomycine, un antibiotique ciblant également le lipide II, est apparue 40 ans après sa commercialisation (Wright, 2015). Contrairement aux protéines, synthétisées par des gènes qui évoluent et mutent au fil du temps, les lipides sont synthétisés à partir des précurseurs cellulaires. Par conséquent, l'apparition de résistance est moins fréquente.

Néanmoins, de nombreux criblages fonctionnels mènent souvent au ré-isolement de molécules déjà décrites (Donadio *et al.*, 2010; Radić & Bratkovič, 2012). La découverte de la teixobactine par une approche originale semble indiquer que la recherche de nouvelles molécules bioactives n'est pas nécessairement vouée à l'échec et que l'utilisation de méthodes de culture

originales associée à des criblages plus pragmatiques permettrait la découverte de nouvelles molécules d'intérêt. Face à ce constat, les projets de criblage plus efficients associent des stratégies de *genome mining* et de métabolomique à haut-débit à des micro-organismes issus d'écosystèmes inexploités.

B. Les nouvelles approches pour découvrir de nouvelles molécules

Contrairement aux métabolites primaires essentiels à la croissance et au développement du micro-organisme, les métabolites secondaires sont généralement synthétisés dans des conditions de stress pour répondre aux variations des conditions environnementales. Les métabolites secondaires sont des molécules de faible poids moléculaires, synthétisées au cours du métabolisme secondaire à partir de précurseurs issus du métabolisme primaire (Keller *et al.*, 2005). Non indispensables à la croissance microbienne, les métabolites secondaires peuvent présenter un avantage pour le micro-organisme producteur. Par exemple, dans des écosystèmes complexes où la compétition microbienne est importante, la production de métabolites secondaires à activités antimicrobienne ou cytotoxique est un avantage pour la compétition et la colonisation de la niche écologique par le producteur (Brakhage, 2012). Ces métabolites secondaires sont synthétisés par des complexes enzymatiques, aux séquences conservées en acides-aminés, aujourd'hui bien décrits dans la littérature (pour plus d'information voir le paragraphe IV page 38).

1. Le *genome mining*

Les avancées technologiques dans le domaine du séquençage haut débit de l'ADN ont permis d'accéder à de nombreux génomes de micro-organismes : presque 700 génomes de champignons et plus de 18 000 génomes de bactéries ont été séquencés (Nordberg *et al.*, 2014).Leur analyse fine à l'aide d'outils bioinformatiques permet l'identification, par homologie de séquences, de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de métabolites secondaires potentiellement actifs. Des serveurs disponibles en ligne comme antiSMASH, NaPDoS ou SMURF (Khaldi *et al.*, 2010; Ziemert *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2015), permettent l'annotation de génomes et la détection de gènes codant des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse de métabolites secondaires. Ainsi la présence de nombreuses voies de biosynthèse de métabolites possiblement actifs a pu être révélée dans les

génomes fongiques. Ces plateformes de bioinformatique permettent de mettre en évidence des voies de biosynthèse de composés actifs et, parfois, de prédire la structure chimique du composé produit (Blin *et al.*, 2013; Boddy, 2014).

Les séquences conservées des gènes codant les Polyketides Synthases (PKS), Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS) ou Terpene Synthases (TPS) ont permis de générer des couples d'amorces qui peuvent être utilisés en PCR (Polymerase Chain Reaction) pour rechercher les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de métabolites actifs. Pour les PKS de type I les amorces ciblent les séquences conservées dans les domaines Keto-Synthase (KS) et Acyl-Transferase (AT) (Amnuaykanjanasin *et al.*, 2005), pour les NRPS les amorces se fixent sur les domaines d'Adénylation (A) et Thioesterase (T) (Slightom *et al.*, 2009), pour les hybrides PKS-NRPS, les amorces amplifient le domaine KS (Nicholson *et al.*, 2001; Amnuaykanjanasin *et al.*, 2005) enfin, pour les TPS les amorces s'hybrident sur les domaines conservés des synthases (Kawaide *et al.*, 1997). Il est ainsi possible de détecter, par simple PCR, des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de métabolites secondaires potentiellement bioactifs. Ces méthodes permettent donc de se concentrer uniquement sur les souches les plus prometteuses, celles qui affichent le plus grand nombres de voies de biosynthèse et, après séquençage et analyse phylogénétique, de se concentrer sur les souches possédant des voies de biosynthèse originales.

Cependant, toutes les voies de biosynthèse détectées par les outils de bioinformatique ou de biologie moléculaire ne s'expriment pas dans les conditions de culture testées en laboratoire (Bergmann *et al.*, 2007). En effet, l'expression du métabolisme secondaire des champignons dépend des conditions environnementales dans lesquelles ils évoluent (Wiemann & Keller, 2014). L'approche dite OSMAC (*One Strain, MAny Compounds*) consiste à faire varier les conditions de croissance des micro-organismes : milieu solide ou liquide, incubation sous agitation ou statique, oxygène ou anoxie, lumière ou obscurité, applications de stress, *etc*. (Bode *et al.*, 2002). Ces différentes conditions peuvent faire basculer le métabolisme secondaire des micro-organismes et initier l'expression de différentes voies de biosynthèse détectées, ce qui peut être révélé par des approches métabolomiques (Adpressa & Loesgen, 2016).

2. La métabolomique

Les méthodes d'analyse utilisées en métabolomique visent à définir les profils métaboliques des organismes (Wolfender *et al.*, 2015). Ainsi, pour des micro-organismes, la métabolomique permet de séparer, caractériser, identifier les métabolites sécrétés voire de les quantifier. Il existe différentes techniques de métabolomique associant des méthodes séparatives, comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou la chromatographie en phase gazeuse, à des méthodes de détection comme la Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse (MS) ou l'infrarouge (Zhang *et al.*, 2012a).

Classiquement, les études métabolomiques combinent la chromatographie liquide à un spectromètre de masse à haute résolution (LC-DAD-HRMS) (El-Elimat *et al.*, 2013; Gaudêncio & Pereira, 2015). Elle permet d'obtenir des paramètres physico-chimiques tels que la masse moléculaire exacte, le profil de fragmentation ou encore le spectre UV des composés détectés. Ces données représentent des caractéristiques propres à chaque composé et peuvent permettre son identification en interrogeant des bases de données telles que Dictionary of Natural Product, ChemSpider, MarinLit (Harvey *et al.*, 2015) ou METLIN (Tautenhahn *et al.*, 2012).

La métabolomique permet de comparer les profils métaboliques de différents micro-organismes. Donc, si plusieurs micro-organismes produisent des composés similaires, alors on préfèrera se concentrer sur un plutôt que sur l'ensemble. Ainsi, la métabolomique permet une première étape de déréplication des micro-organismes. Le processus de déréplication consiste, également, à identifier au sein de mélanges complexes toutes les molécules déjà décrites grâce à leurs propriétés physico-chimiques en interrogeant différentes bases de données (Lang *et al.*, 2008) (Figure 4). La spectrométrie de masse haute résolution est capable de calculer la masse exacte de la molécule détectée, permettant la prédiction de formules brutes. Cependant, les bases de données disponibles ne contiennent que très peu de spectres de métabolites microbiens. En outre, les spectres de fragmentations, qui ne sont pas nécessaire à la publication d'une nouvelle molécule, mais tout de même nécessaire à sa caractérisation, diffèrent selon le type d'appareil utilisé : un spectromètre de masse à trappe d'ion génèrera des fragments différents d'un appareil avec une cellule de collision (Champarnaud & Hopley, 2011; Kildgaard *et al.*, 2014), rendant ainsi incertaine l'identification des molécules détectées.

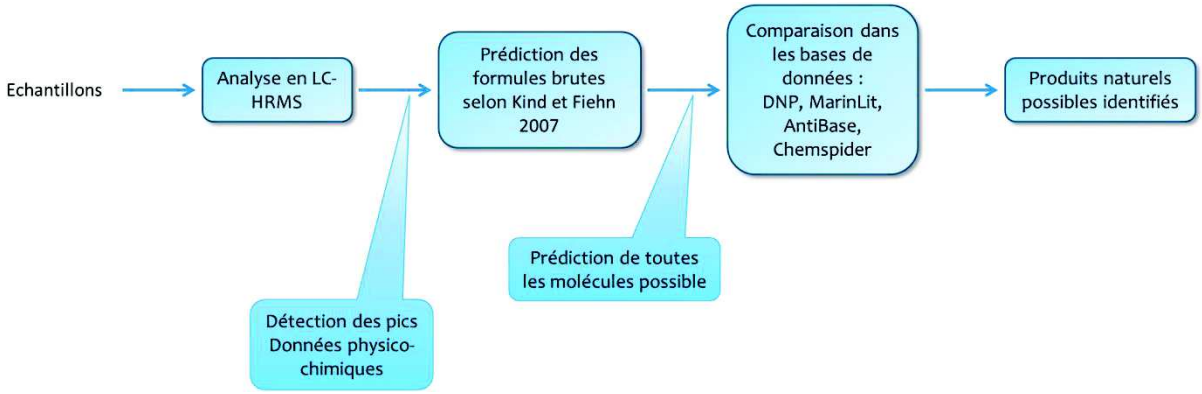


Figure 4 : Les différentes étapes du processus de déréplication (adaptée de (Harvey *et al.*, 2015))

Néanmoins, les analyses de déréplication métaboliques restent une méthode efficace pour détecter, dans un extrait, des composés originaux (Wolfender *et al.*, 2013). Mais, en l'état actuel, elle est encore chronophage pour aller interroger les différentes bases de données (Wolfender *et al.*, 2015). Seule une automatisation des analyses bioinformatiques comme celle développée pour les analyses de génomes permettra d'améliorer les performances et l'efficacité de la déréplication métabolique. L'analyse biostatistique d'extraits bruts en haut-débit, dans une logique de déréplication, commence à se mettre en place. Par exemple, le plateau technique de métabolomique Thalassomics (CNRS 3473, Institut Universitaire Mer et Littoral) développe des outils automatisés dédiés à l'analyse de métabolomes de micro-organismes marins dans une logique d'identification de composés originaux *via* l'optimisation de la procédure de déréplication (Bohni *et al.*, 2016).

3. L'environnement marin : une source de molécules actives d'intérêt ?

Alors qu'ils recouvrent près de 70% de la surface de la planète, les environnements marins ont été très peu exploités pour leur potentiel biotechnologique. A ce jour, seules 7 molécules marines ou leurs dérivés ont été approuvés par la FDA et/ou l'European Medecine Agency (EMA) (Tableau 2)

Tableau 2 : Liste des composés d'origine marine ou des dérivés de molécules marines autorisés sur le marché par la FDA et/ou L'EMA, adapté de (Martins *et al.*, 2014)

Molécule	Naturelle (N) Dérivé (D)/Molécule modèle	Source	Application	Approuvée	Date	Référence
Cytarabine	D/Spongothymidine	Eponge *Cryptotethya crypta*	Cancer	FDA/EMA	1969	Bergman et Feeney 1950
Vidarabine	D/Spongouridine	Eponge *Cryptotethya crypta*	Antiviral	EMA	1976	Bergman et Feeney 1950
Ziconotide	N	Escargot de mer *Conus magus*	Douleurs chroniques	FDA/EMA	2004	McIntosh et al 1980
Omega-3 ester éthyliques	D/Oméga-3	Poissons	hypertriglycéridémies	FDA/EMA	2004	Koski 2008
Trabectedine	N	Tunicier *Ecteinascidia turbinata*	Cancer	EMA	2007	Wright et al 1990 Rinehart et al 1991
Eribuline mesylate	A /Halichondrin B	Eponge *Halichondria okadai*	Cancer	FDA/EMA	2010	Uemura et al 1985 Hirata et al 1986
Brentuximab vedotin 63	A/Dolastatin 10	Lièvre de mer *Dolabella auricularia*	Cancer	FDA/EMA	2015	Pettit et al 1987

Ces composés marins sont en grande partie issus de macro-organismes. Cependant, les micro-organismes sont soupçonnés d'en être les réels producteurs (Proksch *et al.*, 2002; Newman & Cragg, 2007; Piel, 2009; Gerwick & Moore, 2012). En effet, les macro-organismes marins vivent en association étroite avec des micro-organismes, qui peuvent représenter 40 à 60% de la biomasse des spongiaires (Schmitt *et al.*, 2007; Weisz *et al.*, 2007). Même si peu de données quantitatives sont disponibles dans la littérature, de nombreuses associations entre macro- et micro-organismes ont été référencées dans le cas des algues, coraux, mollusques *etc* (Hollants *et al.*, 2011; Debbab *et al.*, 2012; Valliappan *et al.*, 2014).

Actuellement, 26 composés d'origine marine sont engagés en phase clinique, dont 23 pour des activités anticancéreuses (Jaspars *et al.*, 2016). Depuis plusieurs années, la description de nouvelles molécules marines est en constante augmentation, renforçant l'idée de leur grande diversité structurale (Figure 5 A). Ces deux dernières années, Blunt et ses collaborateurs, ont montré l'importance des micro-organismes marins dans la production de métabolites secondaires. La synthèse de ces composés par les micro-organismes marins représente plus de 40% des molécules marines décrites au cours des deux dernières années (Blunt *et al.*, 2015a, 2016) (Figure 5 B).

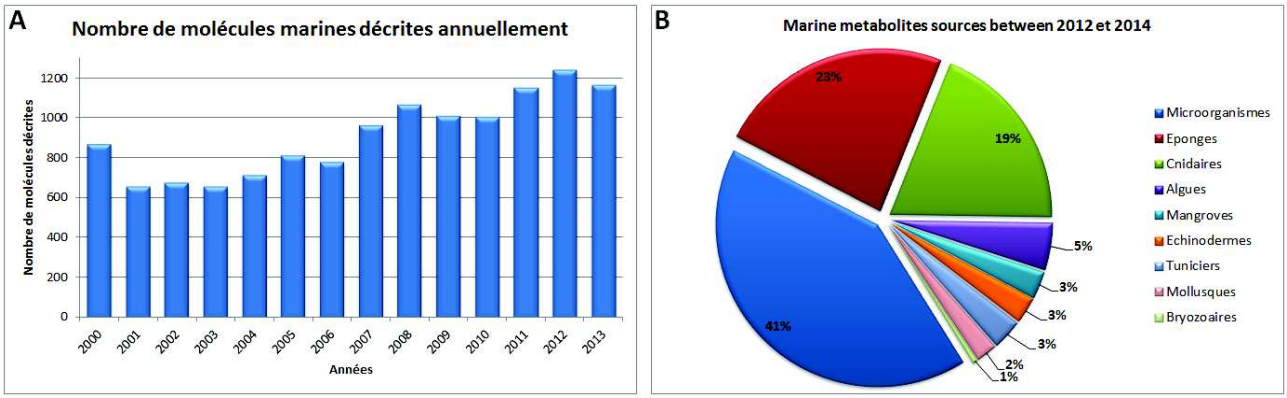


Figure 5 : Les molécules marines et les organismes producteurs. A : Evolution du nombre de molécules marines décrites par an. B : Origines des molécules marines décrites entre 2012 et 2014, selon les publications annuelles de Faulkner 2002 et de Blunt et al (depuis 2003)

La biosphère marine microbienne peut être pressentie comme un réservoir prolifique de nouvelles molécules. De plus, sécrétées dans le milieu marin, les molécules actives sont rapidement diluées (Haefner, 2003; Zhang *et al.*, 2005) et doivent avoir une forte bioactivité (à faible concentration) pour avoir un effet sur l'organisme ciblé. Par conséquent, considérant ces différents paramètres et sachant que moins de 1% des micro-organismes marins ont pu être cultivés jusqu'à aujourd'hui (Spížek *et al.*, 2010), la chimio-diversité des molécules marines bioactives reste encore à découvrir.

II. LE MILIEU MARIN, UN RESERVOIR DE BIODIVERSITE MICROBIENNE ET DE CHIMIO-DIVERSITE ?

Largement étudié et exploité car tout simplement plus accessible, le réservoir microbien terrestre s'est avéré très prolifique en matière de molécules actives d'intérêt pharmaceutique. Au vu de l'exploration avancée de cet écosystème et de la tendance au ré-isolement de molécules déjà décrites, les recherches sur les produits naturels s'orientent vers des écosystèmes moins explorés, comme le milieu marin. En effet, le milieu marin regroupe de nombreux habitats aux caractéristiques très contrastées abritant des communautés microbiennes (bactéries, archées, protistes et fungi) allant jusqu'à plusieurs milliards de cellules dans un litre d'eau de mer (Zinger *et al.*, 2012). Ces communautés microbiennes complexes sont en constante interaction (positives ou négatives) *via* notamment la synthèse d'une grande diversité de molécules impliquées, dans la communication (*quorum sensing*) ou dans la compétition, par exemple. La culture *in vitro* de micro-organismes marins a engendré la découverte de nouvelles molécules bioactives. Pour ne citer que deux exemples, l'actinomycète *Salinispora tropica* produit la salinosporamide A, en première phase d'étude clinique comme anticancéreux (Potts *et al.*, 2011; Millward *et al.*, 2012), ou encore le champignon *Ascochyta salicorniae* produit des molécules antiparasitaires et antituberculeuses aux structures chimiques diverses, uniques et originales (Osterhage *et al.*, 2000; Seibert *et al.*, 2007). Ainsi, ce réservoir de biodiversité est aussi un réservoir de chimio-diversité dont différentes molécules complexes sont clairement d'intérêt en biotechnologie.

A. Caractéristiques environnementales : des paramètres physico-chimiques singuliers

De nombreuses variables environnementales caractérisent les habitats marins. La salinité, la température et la pression hydrostatique sont des paramètres généralement utilisés pour caractériser ces niches écologiques particulières. De manière très minimaliste, le biome marin est constitué d'habitats présentant d'importants gradients de salinité, de température et de pression. Si la salinité moyenne du milieu marin est entre 3 et 3,5%. Certains habitats atypiques sont faiblement salés, comme la Mer Baltique avec une salinité de 0,6%, ou alors hypersalins, comme les bassins profonds hypersalés et anoxiques de Méditerranée avec des salinités supérieures à 30%

(Alexander *et al.*, 2009; Stock *et al.*, 2012). Concernant la température et la pression hydrostatique, les gradients sont également extrêmes avec des amplitudes importantes permettant à de nombreuses communautés microbiennes, aux caractéristiques physiologiques contrastées, de se développer.

Dans les 200 premiers mètres, la présence de lumière permet aux organismes photoautotrophes (algues et phytoplancton) de réaliser la photosynthèse et donc d'apporter au milieu du dioxygène et de la matière organique. Cette zone photique (zone recevant la lumière) est le principal lieu de la production primaire, un processus au cours duquel le carbone inorganique comme le CO_2 est transformé en molécule organique (Thornton, 2012). Au-delà de 200m de profondeur, la lumière est insuffisante ou absente pour permettre la photosynthèse. A ces profondeurs, les organismes hétérotrophes utilisent la matière organique, synthétisée dans les eaux de surface, qui sédimente le long de la colonne d'eau. Les organismes chimiolithotrophes (autotrophes) consomment des molécules inorganiques comme le dihydrogène, le méthane ou encore du sulfure d'hydrogène pour produire de l'énergie et de la biomasse (Orcutt *et al.*, 2011) (Figure 6).

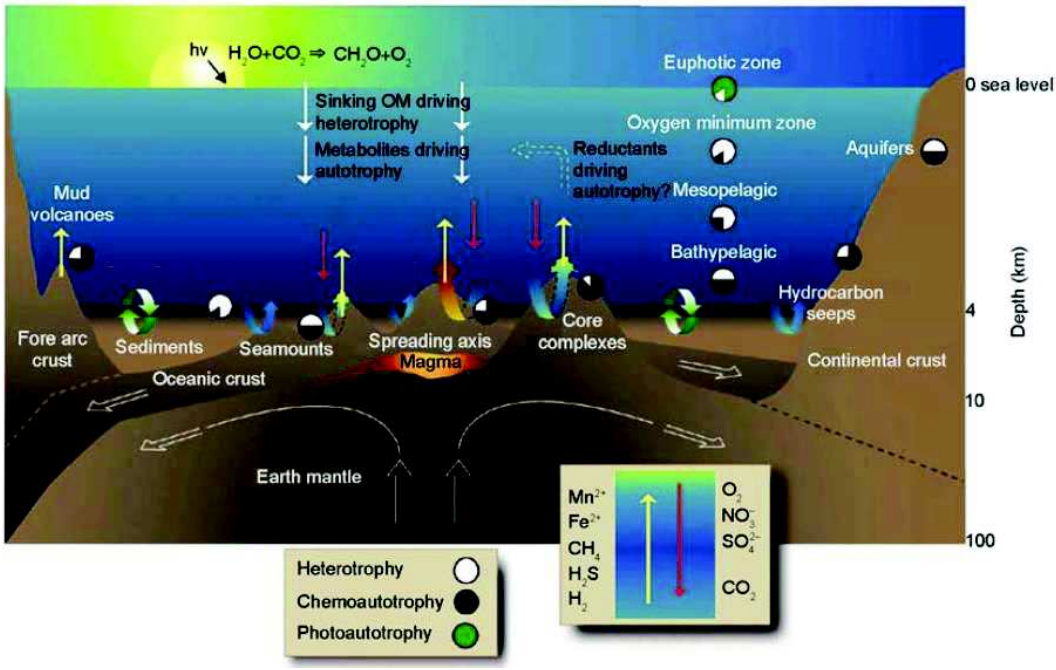


Figure 6 : Différents écosystèmes océaniques. Les flèches montrent les échanges de fluides entre les différents écosystèmes profonds et la croûte (Fang & Zhang, 2011)

Au-delà de 1000m de profondeur s'étend le domaine océanique. L'océan occupent 95% de la surface maritime du globe (Skropeta & Wei, 2014) dont plus de 60% à plus de 2000m de profondeur (Jannasch & Taylor, 1984; Bull *et al.*, 2000). Cet environnement se caractérise par :

- l'absence totale de lumière

- une forte pression hydrostatique, variant de 10MPa, à 1000m de profondeur, à 100MPa dans les fosses océaniques les plus profondes, soit un gradient de 10MPa/km (Schrenk *et al.*, 2010)

- une faible température, en moyenne 2°C au niveau du plancher océanique. Cependant elle peut atteindre plus de 400°C au niveau des évents hydrothermaux (Tunnicliffe *et al.*, 2003)

- une eau plus ou moins saturée en dioxygène dissous à la surface du plancher océanique (5 à 6mL/L), qui s'explique par la descente des eaux de surface riche en dioxygène sous l'effet des courants océaniques (Thistle, 2003)

- peu de matière organique disponible. En effet, la matière organique produite en surface par la photosynthèse, est consommée sur son lieu de production (en surface) ou est dégradée au cours de la sédimentation, tout au long de la colonne d'eau. Seulement 1 à 6% de la production primaire atteint le plancher océanique (Muller-Karger *et al.*, 2005; Ridgwell & Arndt, 2014). Par ailleurs, seule une faible quantité de cette matière organique est directement assimilable par les micro-organismes (Jørgensen & Boetius, 2007; Arndt *et al.*, 2013).

Formés par l'accumulation de particules organiques et inorganiques au cours des temps géologiques, les sédiments marins recouvrent le plancher océanique (Teske & Sørensen, 2008). Ils représentent aujourd'hui le plus grand réservoir de matière organique de la planète (Fry *et al.*, 2008). Ces particules sont d'origine biogène, terrigène ou volcanique (Thistle, 2003; Jørgensen & Boetius, 2007). L'épaisseur des sédiments marins varie de plusieurs kilomètres, en zone côtière, à quelques centaines de mètres en zone océanique (Thistle, 2003; D'Hondt *et al.*, 2009; Ramirez-

Llodra *et al.*, 2010). Tout comme les grands fonds, dans les sédiments marins les paramètres physico-chimiques jouent un rôle important sur la faune, la flore et les micro-organismes qui y vivent :

- la pression lithostatique est un paramètre qui s'ajoute à la pression hydrostatique. En effet, en s'accumulant les nouveaux sédiments compriment les plus anciens. Par conséquent, la pression lithostatique augmente selon un gradient estimé entre 15 et 25MPa/km (Oger & Jebbar, 2010)

- la température est également dépendante de la profondeur du sédiment. De 2°C à l'interface eau-sédiments, elle peut atteindre 60-100°C à presque 2km de profondeur dans le bassin de Canterbury (Nouvelle-Zélande) (Ciobanu *et al.*, 2014). Le gradient de température dans les sédiments océaniques est d'environ 25°C/km (Oger & Jebbar, 2010)

- La teneur en dioxygène diminue lorsque la profondeur augmente. Cette diminution dépend de l'activité des organismes en surface des sédiments. A la surface des sédiments, les organismes respirent et utilisent l'oxygène pour dégrader la matière organique. Au niveau des marges continentales, où la matière organique est abondante et où l'activité microbienne est importante, la concentration en dioxygène diminue fortement dès les premiers millimètres de sédiments (Cai & Sayles, 1996; Wenzhöfer *et al.*, 2001). Au contraire, dans les zones où la sédimentation est très faible, par exemple au niveau des gyres, l'oxygène peut pénétrer le plancher océanique jusqu'à une dizaine de mètres de profondeur (Fischer *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2012).

- l'oligotrophie du milieu : en sédimentant le long de la colonne d'eau la matière organique a été transformée et consommée par les micro-organismes en suspension. Par conséquent, la matière organique arrivant au fond se présente sous forme de macromolécules complexes et difficilement directement assimilables par les micro-organismes. On parle alors de matière organique réfractaire (Arndt *et al.*, 2013). La matière organique la moins réfractaire est dégradée en surface du sédiment laissant moins de 1% de la matière organique résiduelle s'enfouir dans les sédiments (Jørgensen & Boetius, 2007). Elle est transformée au fil des temps géologiques par des processus physico-chimiques liés à la pression et la température,

pour finalement présenter des structures complexes réfractaires à la dégradation enzymatique microbienne (Burdige, 2007). De ce fait, la biodisponibilité de la matière organique dans les sédiments marins profonds est limitée.

Les sédiments marins représentent donc un environnement caractérisé comme extrême régit par des paramètres physico-chimiques tels que : la forte pression (hydrostatique et lithostatique), une faible température dans les premières couches puis qui augmente avec la profondeur, mais aussi l'oligotrophie. Les microorganismes doivent donc développer de nouveaux mécanismes de survie pour subsister et se développer dans ces conditions environnementales.

B. La biosphère profonde

Alors qu'ils occupent un peu moins des trois quarts de la planète, les biotopes marins restent encore largement inexplorés. Le premier Census of Marine Life, un réseau scientifique international, a échantillonné pendant 10 ans (2000-2010), les océans sur toute la surface du globe. Les scientifiques ont estimé que l'océan contiendrait $3,6\times10^{30}$ cellules microbiennes, soit des centaines de millions d'espèces microbiennes parmi lesquelles tous les domaines du vivant sont représentés : archées, bactéries et micro-eucaryotes (Ausubel *et al.*, 2010). Les micro-organismes sont présents de la surface jusqu'aux plus grandes profondeurs, et même à plusieurs centaines de mètres dans les sédiments marins (Ciobanu *et al.*, 2014).

La biosphère profonde, ou biosphère de sub-surface, débute après 1m sous le plancher océanique (Jørgensen & Boetius, 2007; Schippers, 2015). Elle comprend les écosystèmes sédimentaires et magmatiques. L'exploration de la biosphère profonde sédimentaire s'est mise en œuvre, avec l'amélioration des techniques d'échantillonnage, de forage, lors de programmes de recherche internationaux : Ocean Drilling Program (1983-2003) puis Integrated Ocean Drilling Program (2003-2013) et International Ocean Discovery Program depuis 2013. Ces différents programmes ont permis aux microbiologistes de collecter des échantillons pour révéler la diversité des micro-organismes, leurs fonctions, leurs rôles écologiques, leurs interactions *etc*. Cet écosystème sédimentaire, longtemps considéré comme un désert biologique (Kato & Yamagishi, 2011), est en réalité colonisé par des communautés microbiennes complexes, composées de bactéries, d'archées et de micro-eucaryotes majoritairement fongiques. Les dernières estimations

cellulaires s'élèvent à $5,39\times10^{29}$ cellules de bactéries et d'archées (Parkes *et al.*, 2014). De plus, des études de CARD-FISH (Schippers *et al.*, 2005) et de métatranscriptomique (Orsi *et al.*, 2013b) ont montré qu'elles étaient vivantes et métaboliquement actives jusqu' à plus de 2km de profondeur sous le plancher océanique (Ciobanu *et al.*, 2014; Inagaki *et al.*, 2015). Les champignons de sub-surface, qui dominent les communautés de micro-eucaryotes (Edgcomb *et al.*, 2011b; Rédou *et al.*, 2014), sont présents jusqu' à plus de 1 700m sous le plancher océanique (Ciobanu *et al.*, 2014) et sont capables de se développer activement et d'interagir avec les communautés procaryotes (Pachiadaki *et al.*, 2016).

Dans de telles conditions de pression, température et salinité les micro-organismes ont développé des mécanismes physiologiques leur permettant de se développer dans cet environnement extrême. Les membranes cellulaires microbiennes des micro-organismes d'habitats profonds sont plus riche en acides gras insaturés, courts et ramifiés, permettant ainsi une meilleure fluidité membranaire et donc l'entrée des nutriments malgré les faibles températures et les fortes pressions hydrostatique/lithostatique (Yayanos, 1995). Les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN, la transcription et la traduction sont surexprimées et fonctionnent à basse température (D'Amico *et al.*, 2006). D'autres enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire présentent une plus grande flexibilité de leurs structures tridimensionnelle (Casanueva *et al.*, 2010). Aux fortes températures, les membranes cellulaires contiennent des lipides saturés, l'ADN est stabilisé par des mécanismes de surenroulement et une teneur élevée en nucléotides G et C, des protéines chaperones maintiennent la conformation tridimensionnelle des protéines cellulaires et de nombreuses enzymes sont thermostables (Minic *et al.*, 2006; Schrenk *et al.*, 2010). Enfin pour faire face à la faible activité de l'eau, comme dans des environnements concentrés en sel, les micro-organismes accumulent dans leur cytoplasme des osmorégulateurs comme l'ion potassium K^+ (Rothschild & Mancinelli, 2001). En l'absence d'oxygène dans les sédiments, les micro-organismes utilisent d'autres accepteurs d'électrons pour dégrader la matière organique disponible : SO_4^{2-} pour la sulfato-réduction, le CO_2 pour la méthanogénèse ou encore NO_3^- pour l'ammonification (D'Hondt, 2004).

Tout comme les paramètres physico-chimiques, la complexité des communautés microbiennes de sub-surface affecte le métabolisme des micro-organismes. Les sédiments renferment une biodiversité complexe et peu de matière organique disponible. La compétition est

donc importante dans les écosystèmes sédimentaires. Les micro-organismes doivent donc mettre en place des mécanismes de défense, comme la synthèse de molécules à activité antimicrobienne dans une logique de colonisation de niche écologique ou de lyse de micro-organismes compétiteurs avant utilisation de leurs composés organiques.

C. Les micro-organismes marins profonds et synthèse de métabolites secondaires bioactifs

Dans leur revue sur les molécules des écosystèmes marins profonds, Skropeta et Wei (2014) prennent en compte tous les écosystèmes s'étendant de 50m de profondeur d'eau (limite que les plongeurs ne peuvent pas franchir) jusque dans les sédiments. Ils montrent que 42% des molécules produites sont d'origine microbienne (Figure 7). En ne tenant compte que des molécules isolées d'organismes collectés au-delà de 1 000m de profondeur, cette proportion s'élève à 79% des molécules décrites. Sur la base de cette étude, la biosphère microbienne des grands fonds et des sédiments marins semble apparaître comme un réservoir prometteur de nouvelles molécules bioactives (Fenical & Jensen, 2006).

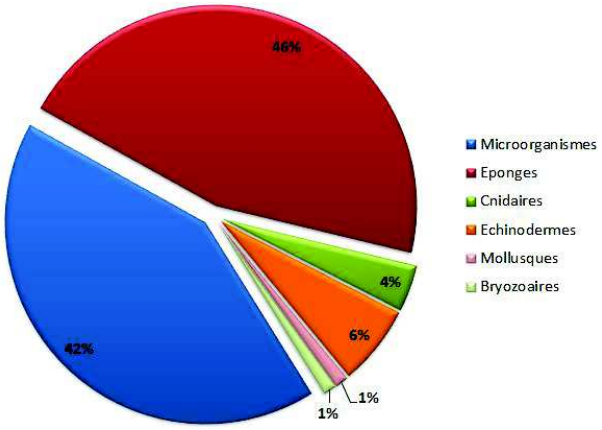


Figure 7 : Origine des molécules marines, isolées d'écosystèmes situés à plus de 50m de profondeur, décrites entre 2009et 2013, adaptée de (Skropeta & Wei, 2014)

Malgré leur rôle primordial dans le développement des antibiotiques et leur abondante production de métabolites bioactifs, les champignons ont suscité peu d'attention dans le milieu marin et plus particulièrement dans la biosphère profonde (Imhoff, 2016). Néanmoins, ils synthétisent entre 40% et 60% des molécules microbiennes marines décrites (Skropeta & Wei, 2014; Blunt *et al.*, 2016). De plus, le nombre de nouvelles molécules marines fongiques décrit chaque

année ne cesse d'augmenter (Blunt *et al.*, 2014, 2015a, 2016) ce qui laisse penser que les champignons issus du milieu marin pourraient représenter une nouvelle source de composés bioactifs originaux.

III. LES CHAMPIGNONS MARINS

A. Définition

Dans les années 60, un champignon était qualifié de marin lorsqu'il pouvait se développer en présence de sels de mer (Johnson & Sparrow, 1961). Cependant, cette première définition fondée sur une caractéristique physiologique a rapidement été remise en cause par Kohlmeyer et Kohlmeyer (1979) qui proposent d'y ajouter une dimension écologique. Ainsi pour définir les champignons marins, deux groupes sont créés : (i) les champignons dits obligatoires qui se développent, sporulent et se reproduisent uniquement dans un milieu marin (ii) et les champignons dits facultatifs, d'origine terrestre ou d'eau douce, qui sont capables de se développer voire de sporuler en milieu marin. Cette définition dichotomique a été largement acceptée par la communauté scientifique. Selon cette définition, 1 112 espèces champignons marins obligatoires ont été décrites (Jones *et al.*, 2015) alors que le nombre estimé de champignons dépasse les 10 000 espèces (Jones, 2011).

Pourtant, depuis le développement et l'utilisation des méthodes omiques pour étudier les communautés microbiennes dans un écosystème, cette dernière définition est discutée. En effet, selon Kohlmeyer et Kohlmeyer les champignons marins facultatifs, qui viendraient potentiellement de spores dormantes de champignons terrestres véhiculées par l'air ou les cours d'eau jusqu'au milieu marin, ne joueraient pas véritablement de rôle écologique dans le milieu marin. Toutefois, l'étude des paramètres physiologiques de croissance de différents champignons facultatifs utilisés comme modèles montrent leur halotolérance ou halophilie et donc leur adaptation aux conditions marines (Edgcomb *et al.*, 2014). De plus des études de métatranscriptomique mettent en évidence leurs activités métaboliques dans les sédiments marins (Orsi *et al.*, 2013a; Pachiadaki *et al.*, 2016). Ils sont aussi capables de synthétiser des métabolites qui seraient impliqués dans la compétition. Par exemple, le champignon *Emericella* sp., isolé d'une algue verte, qui produit en co-culture avec *Salinispora arenicola*, une bactérie Gram-positif, l'emericellamide A active contre *S. aureus* résistant à la méthicilline (Oh *et al.*, 2007). Enfin des études montrent leur pathogénicité envers des organismes marins. *Aspergillus sydowii* et *Fusarium solani*, champignons fréquemment retrouvés en écosystème terrestre, sont respectivement pathogènes de coraux et de crevettes (Alker *et al.*, 2001; Khoa *et al.*, 2005). Tous ces arguments indiquent que de nombreux champignons marins

facultatifs interagissent avec les différentes communautés au sein des écosystèmes marins et qu'ils s'y expriment. Puisqu'ils sont métaboliquement actifs, il apparaît que certains champignons dits facultatifs doivent être considérés comme de « vrais » champignons marins. Inspirée de la définition précédente et intégrant une dimension d'activité métabolique, une nouvelle définition, proposée en 2014, détermine 3 catégories de champignons marins : (i) les endémiques et actifs au sein de l'écosystème marin, (ii) les ubiquistes qui sont métaboliquement actifs dans l'environnement marin et (iii) les ubiquistes qui ne sont pas métaboliquement actifs dans cet écosystème (Mahé *et al.*, 2014).

Enfin dans un contexte où les méthodes omiques sont largement utilisées pour étudier la biodiversité et l'activité microbienne, une dernière définition, alliant ces différentes méthodes, suggère que les champignons qui présentent : (i) des mécanismes d'adaptation aux conditions marines, (ii) une expression génétique active (étude transcriptomique et synthèse d'ARNm), (iii) un métabolisme actif (étude du protéome et synthèse de protéines qui assurent des fonctions métaboliques), ou alors (iv) une synthèse de métabolites secondaires (étude du métabolome et des molécules synthétisées) dans l'environnement marin doivent être considérés comme des champignons marins (Rédou *et al.*, 2016).

Pang et ses collaborateurs (Pang *et al.*, 2016) donnent une définition similaire et proposent qu'un champignon qui a été isolé à plusieurs reprises dans les environnements marins parce qu'il est capable : (i) de s'y développer et d'y sporuler, ou (ii) de former des symbioses avec des organismes marins ou (iii) de s'adapter, d'évoluer génétiquement et de s'exprimer métaboliquement doit être défini comme un champignon marin. Ainsi les champignons marins représentent un seul et unique groupe. C'est cette définition que nous allons adopter au cours de cette étude.

B. La diversité des champignons marins profonds

L'étude des champignons marins a commencé au 19e siècle et s'est relativement peu développée au cours du 20e siècle (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979) si ce n'est *via* la description de nouvelles espèces. Le premier champignon marin profond a été isolé à 4450m de profondeur (Roth *et al.*, 1964). Dès lors, la communauté fongique présente dans les écosystèmes extrêmes et

profonds, comme les sédiments ont attiré l'attention (Raghukumar & Raghukumar, 1998; Gadanho & Sampaio, 2005; Singh *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). Les champignons marins ont été décrits comme pathogènes ou endosymbiontes et comme acteurs dans les cycles biogéochimiques, notamment dans le cycle du carbone. Ils peuvent donc jouer un rôle dans les écosystèmes et notamment dans les interactions au sein d'une communauté d'organismes (Edgcomb *et al.*, 2014). Cependant, la biodiversité fongique de la biosphère profonde reste encore à éclaircir afin de mieux comprendre leur présence et leur(s) rôle(s) écologique(s).

1. La diversité révélée par les méthodes moléculaires

Les avancées technologiques dans le domaine des technologies de séquençage de l'ADN ont permis le développement des méthodes de *metabarcoding* pour étudier la diversité fongique au sein de différents biotopes et notamment dans les écosystèmes profonds (Nagano *et al.*, 2010; Edgcomb *et al.*, 2011b; Singh *et al.*, 2012). En général, elles ciblent les séquences correspondant à la petite sous-unité de l'ARNr 18S ou à l'ITS car elles permettent une bonne affiliation phylogénétique entre les souches. Si dans la colonne d'eau, les communautés fongiques représentent généralement moins de 2% de la biodiversité des micro-eucaryotes (Edgcomb *et al.*, 2011a; Pawlowski *et al.*, 2011), dans les écosystèmes profonds, elles sont dominantes (Bass *et al.*, 2007; Takishita *et al.*, 2007; Edgcomb *et al.*, 2011b). Ces méthodes moléculaires révèlent une diversité fongique insoupçonnée dans les écosystèmes profonds (Bass *et al.*, 2007; Le Calvez *et al.*, 2009; Nagahama & Nagano, 2012). Les champignons des sédiments marins détectés par ces méthodes moléculaires sont principalement associés à deux phyla : Ascomycota et Basidiomycota (Figure 8).

Le phylum des Basidiomycota est fréquemment détecté par ces méthodes moléculaires. Généralement présents sous leur forme unicellulaire (levure), ils appartiennent aux genres : *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Rhodotorula* et *Trichosporon* (Edgcomb *et al.*, 2011b; Rédou *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016) (Figure 8). Le genre *Cryptococcus* est majoritaire dans de nombreuses études (Takishita *et al.*, 2006; Edgcomb *et al.*, 2011b; Rédou *et al.*, 2014). Cette levure ubiquiste dominerait donc les communautés fongiques dans les sédiments marins. Les genres *Malassezia* and *Trichosporon* sont décrits comme pathogènes de mammifères marins (Nakagaki *et al.*, 2000; Pollock *et al.*, 2000).

Contrairement aux Basidiomycota, les Ascomycota sont représentés à la fois par des formes filamenteuses et levures. La première est représentée par les genres *Penicillium* et *Aspergillus* (Lai *et al.*, 2007; Edgcomb *et al.*, 2011b; Xu *et al.*, 2016), des genres ubiquistes fréquemment révélés dans de nombreux écosystèmes marins et terrestres. Moins fréquent, les genres *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Hortaea* et *Phoma* sont également rencontrés (Damare *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Les formes levures appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces* ou *Pichia* (Lai *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

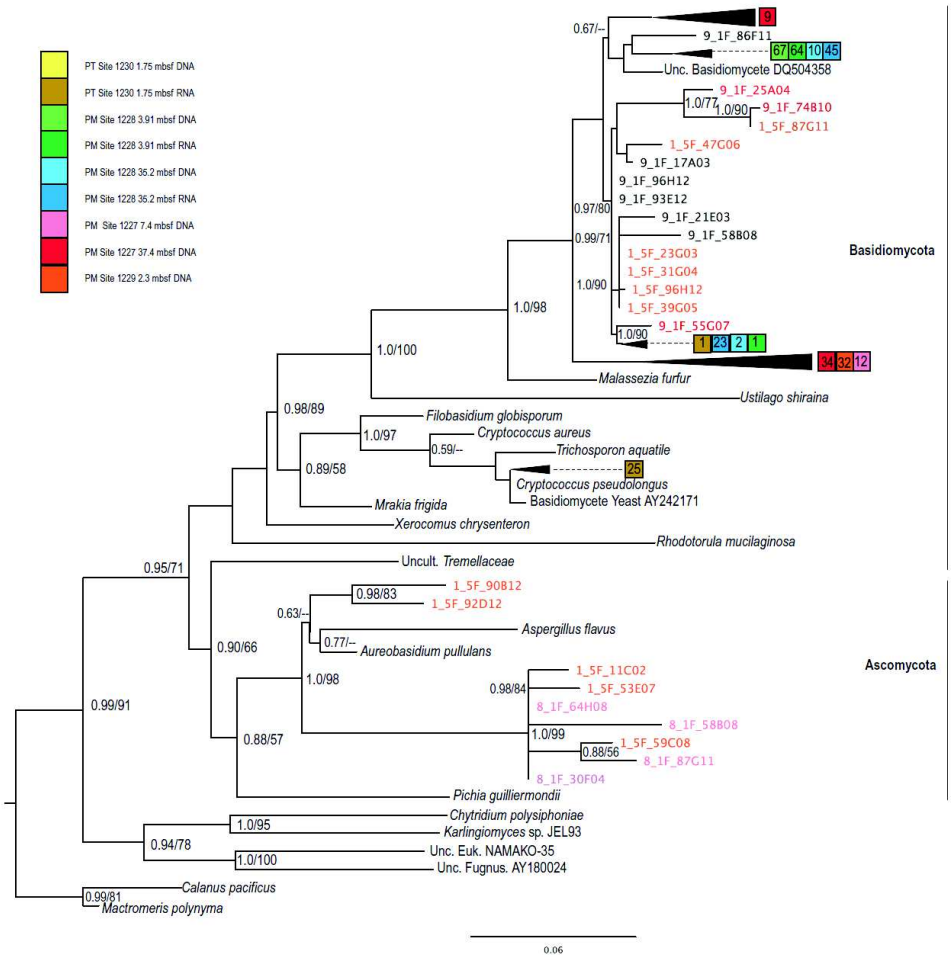


Figure 8 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences d'ADN codant l'ARN ribosomique 18S fongique. Les séquences ont été obtenues à partir de clones isolés de la marge continentale active ou de la fosse océanique du Pérou, PM et PT respectivement (Edgcomb *et al.*, 2011b). Dans les carrés, le nombre de clones obtenus appartenant au groupe.

Des lignées ancestrales de champignons ont également été mises en évidence. Elles sont principalement représentées par de nouvelles lignées de Chytridiomycota et Cryptomycota.

Quelques études rapportent leur présence dans les écosystèmes sédimentaires (Nagano *et al.*, 2010), et parfois, comme une composante fongique majoritaire (Nagahama *et al.*, 2011). Elles ont également été détectées aux niveaux de cheminées hydrothermales (Le Calvez *et al.*, 2009).

Bien qu'affiliés à des champignons ubiquistes fréquemment rencontrés dans les écosystèmes terrestres, ces champignons marins définis alors comme facultatifs, selon la définition de Kohlmeyer, ont été détectés à plusieurs reprises dans les environnements marins profonds et dans les sédiments. Ils se sont montrés actifs dans leur environnement notamment par la synthèse de protéines impliquées dans les différents métabolismes cellulaires et le transport des nutriments vers la cellule (Pachiadaki *et al.*, 2016), et peuvent donc être considérés comme de « vrais » champignons marins selon les dernières définitions (Pang *et al.*, 2016; Rédou *et al.*, 2016).

2. La diversité cultivable

La diversité cultivable est plus faible que la diversité moléculaire (Singh *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). En effet, les méthodes employées ne permettaient pas la culture de tous les micro-organismes. La proportion de micro-organismes cultivables est estimée à 0.1-0.25% (Amann *et al.*, 1995; D'Hondt, 2004). Les champignons isolés d'écosystèmes profonds puis cultivés par les méthodes conventionnelles, appartiennent principalement au phylum des Ascomycota. Les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, et *Cladosporium* en sont les principaux représentants (Damare *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Nagano *et al.*, 2016). Dans une moindre mesure, des levures appartenant aux genres *Rhodotorula* et *Rhodosporidium* pour les Basidiomycota et *Pichia* pour les Ascomycota ont également pu être cultivées. (Singh *et al.*, 2010; Nagano *et al.*, 2016). Alors que les *Cryptococcus* spp. dominent les communautés fongiques sédimentaires au travers des données moléculaires, ils n'ont pu être isolés en culture qu'à deux reprises, à partir d'échantillons de sédiment (Nagahama *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2010).

De nouvelles lignées de Cryptomycota ont été détectées à plusieurs reprises dans les écosystèmes sédimentaires (Nagano *et al.*, 2010; Nagahama *et al.*, 2011). Pourtant, aucun représentant n'a pu être cultivé jusqu'à ce jour. Ces nouvelles lignées non cultivées ont probablement des caractéristiques physiologiques particulières, que les conditions de cultures utilisées en laboratoire n'ont pas reproduites. Des conditions de cultures plus adaptées à leur

environnement *in situ* et qui répondraient à leurs besoins physiologiques en termes de source d'énergie, de température, de pression, de pH, de salinité *etc.* doivent être mises au point pour parvenir à isoler des représentants de ces nouvelles lignées.

Les différentes méthodes culturales ont révélé des séquences phylogénétiquement proches des champignons terrestres, suggérant donc une origine terrestre des souches fongiques présentes dans les sédiments (Raghukumar *et al.*, 2004; Damare *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011). Cependant ces populations sont différentes puisque qu'elles se sont adaptées aux conditions *in situ*. La majorité des champignons isolés des écosystèmes profonds sont halotolérants ou halophiles (Burgaud *et al.*, 2009, 2010). De plus, les spores d'*Aspergillus terreus*, isolé d'un environnement marin profond, sont capables de germer à 30°C et sous 200 bar de pression, contrairement à celles d'une souche terrestre qui ne germent pas dans de telles conditions (Damare *et al.*, 2006). Il en est de même pour les levures isolées d'environnements profonds qui montrent une meilleure croissance dans des conditions similaires aux conditions *in situ* (Nagano *et al.*, 2014). Selon Rédou et ses collaborateurs ces souches isolées d'environnements marins peuvent être qualifiées de champignons marins (Rédou *et al.*, 2016).

C. Les champignons marins de sub-surface une ressource biotechnologique ?

La première molécule fongique marine a été découverte en 1945, par Giuseppe Brotzu qui a isolé un champignon d'une bouche d'égout donnant sur la mer. Ce champignon, initialement identifié comme *Cephalosporium acremonium*, montrait des activités contre les bactéries à Gram-négatif et Gram-positif (Abraham, 1979). Les cultures de *C. acremonium* ont permis d'isoler et de caractériser d'une famille de molécules appelées céphalosporines, encore utilisées aujourd'hui en médecine (Muñiz *et al.*, 2007).

La recherche des molécules actives issues de champignons marins est relativement récente. Il aura fallu attendre presque 50 ans, après Giuseppe Brotzu, pour voir s'intensifier les recherches sur les métabolites fongiques marins. Avant 1992, seulement 15 composés de champignons marins

étaient décrits (Fenical & Jensen, 1993). Depuis, le nombre de molécules fongiques marines a augmenté de façon exponentielle (Figure 9).

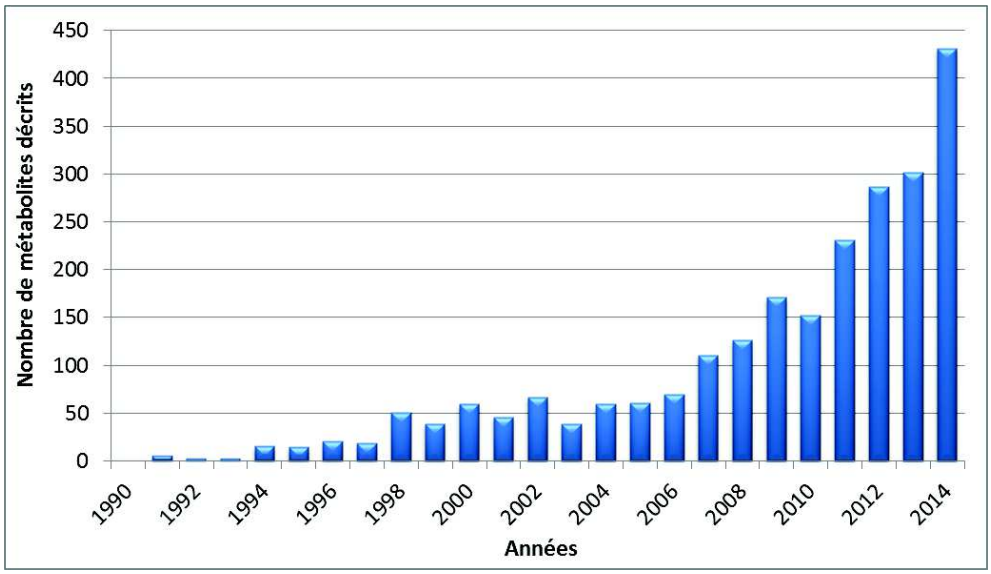


Figure 9 : Nombre de métabolites de champignons marins décrits chaque année (Faulkner, 1992, 2002, Blunt *et al.*, 2003, 2016)

Les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, fréquemment rencontrés en milieu marin, se révèlent être les producteurs majoritaires de molécules actives (Blunt *et al.*, 2015a; Imhoff, 2016). Sachant que la biodiversité fongique cultivable n'est que la partie émergée de l'iceberg, la chimio-diversité des molécules fongiques marines et leurs potentielles activités biologiques restent encore largement inexplorées. Elles pourraient probablement, être source d'innovations dans le traitement des maladies. En effet, la plinabuline est un dérivé de l'halimide, produite par *Aspergillus* sp. CNC139, isolée de l'algue verte *Halimeda copiosa* (Fenical *et al.*, 2000). La plinabuline est en troisième phase clinique (Adis International Ltd, 2016; BeyondSpring Pharmaceuticals, 2016). Elle présente une nouvelle structure et un nouveau mode d'action dans la lutte contre le cancer du poumon (Millward *et al.*, 2011).

Au stade pré-clinique, les trichoderines A, A1 et B, ont été isolés d'une souche de *Trichoderma* sp 05FI48, isolée d'une éponge (Pruksakorn *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2013). Ces peptides linéaires originaux sont actifs contre *Mycobacterium tuberculosis* et ses spores dormantes contrairement aux molécules actuellement utilisées dans les cas de tuberculoses (Pruksakorn *et al.*, 2011; Farah *et al.*, 2016).

Les champignons marins isolés d'écosystèmes de surface représentent une ressource biotechnologique considérable puisque deux composés bioactifs ont intégrés les études cliniques. En outre, de nombreux composés sont décrits chaque année pour leur activité biologique. (Ebada & Proksch, 2015). De même, les champignons marins isolés de sédiment peuvent répondre au besoin de nouvelles molécules bioactives. Par exemple l'herqueidiketal (Figure 10) est une molécule avec une structure originale. Elle est produite par une souche de *Penicillium* sp. isolée de sédiment marin (Julianti *et al.*, 2013). Cette molécule est active contre la sortase A, une enzyme nécessaire au développement de *Staphylococcus aureus*. Elle sert de protéine d'ancrage pour les protéines de surface et aide à l'élaboration du peptidoglycane chez la bactérie Gram-positif (Mazmanian, 1999). Elle peut donc être considérée comme une nouvelle cible pour les antibiotiques. L'herqueidiketal pourrait donc inspirer la synthèse de nouveaux antibiotiques (Julianti *et al.*, 2013) montrant ainsi que les champignons de sédiments marins peuvent également former un réservoir biotechnologique.

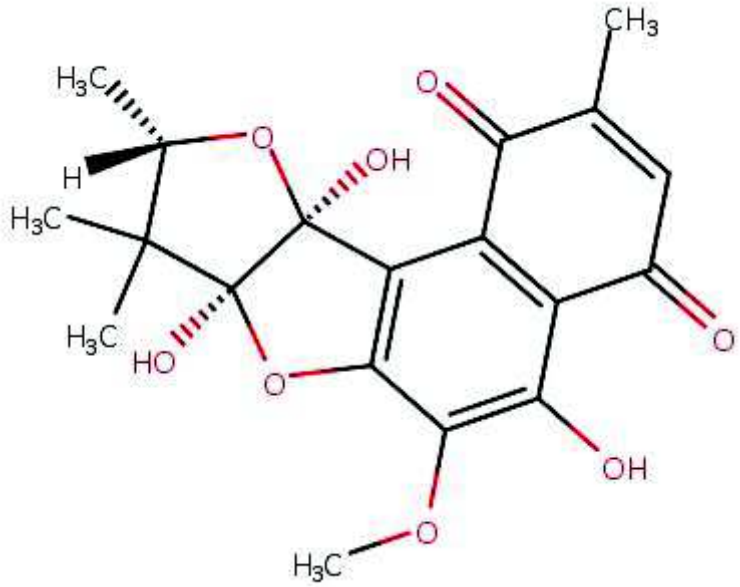


Figure 10 : Structure de l'herqueidiketal (Julianti *et al.*, 2013)

IV. LE METABOLISME SECONDAIRE DES CHAMPIGNONS : VOIES DE BIOSYNTHESE

Les champignons produisent de nombreuses molécules de faible poids moléculaire, connues sous le nom de métabolites secondaires. Contrairement aux métabolites primaires, nécessaires au développement cellulaire et impliqués dans des voies métaboliques plus ou moins communes aux trois domaines du vivant, les métabolites secondaires sont propres à chaque souche et ne sont synthétisés que pour aider à la survie de l'individu dans un écosystème donné (Keller *et al.*, 2005). Ces métabolites présentent une multitude d'activités biologiques. Par exemple, dans les écosystèmes complexes tels que les sédiments marins, où la matière organique accessible est limitée, les micro-organismes peuvent synthétiser des métabolites secondaires pour inhiber la croissance d'un compétiteur. Parmi ces métabolites secondaires, certains montrent des activités antimicrobiennes et sont particulièrement intéressants dans le domaine pharmaceutique. En revanche, d'autres sont toxiques, carcinogènes ou encore mutagènes et peuvent donc menacer la santé humaine, animale et végétale. Ils sont couramment appelées les mycotoxines (Binder, 2007).

Ces métabolites secondaires sont divisés en plusieurs familles principales: les polycétides, les peptides non ribosomiques, les alcaloïdes, les terpènes, les lipides et les dérivés de l'acide shikimique (Figure 11). Ils sont synthétisés par des complexes enzymatiques, codés par des groupes de gènes. Ces enzymes fusionnent des unités constitutives provenant du métabolisme primaire. Elles forment ainsi des molécules plus complexes, souvent bioactives et présentant une grande chimio-diversité.

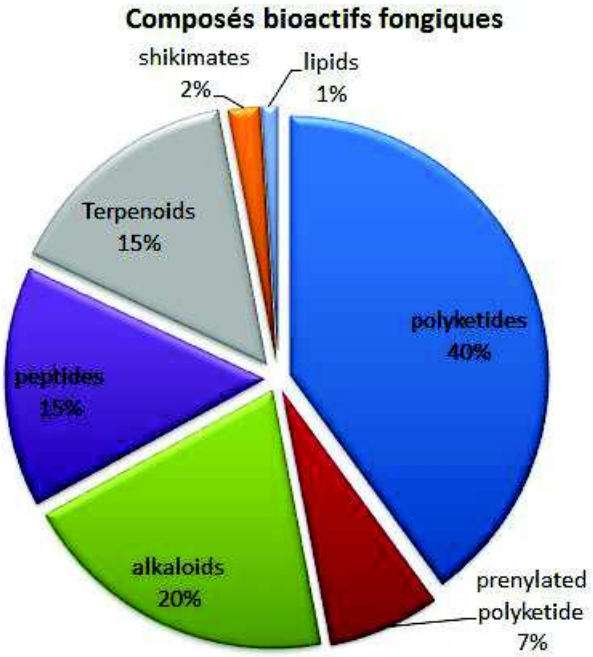


Figure 11 : Famille de molécules actives chez les champignons marins (Rateb & Ebel, 2011)

A. Les polycétides

Les polycétides, qui représentent 40% des molécules bioactives fongiques marines (Figure 11) sont synthétisés par des PolyKetide Synthases (PKS). Il existe différents types de PKS chez les champignons : les PKS de type I et les PKS de type III. Ces dernières ont été découvertes lors du séquençage de génomes fongiques (Gensheimer & Mushegian, 2004).

Les PKS de type I sont très répandues. Elles possèdent plusieurs domaines protéiques qui condensent, par décarboxylation répétitives, de petites unités de malonylCoA et d'acétylCoA. Les PKS de type I sont obligatoirement constituées des domaines : Acyl-Transferase (AT) qui sélectionne les unités de substrat à ajouter à la chaine carbonée puis les transfère au domaine Acyl-Carrier Protein (ACP) qui porte les unités d'extension (malonylCoA), enfin le domaine β-KetoacylSynthase (KS) reçoit l'unité et la fusionne avec la chaine carbonée (Crawford & Townsend, 2010). En plus de ces trois domaines, d'autres domaines facultatifs peuvent être présents et modifier le polycétide en cours d'élongation, comme le domaine de la ketoreductase (KR), qui réalise des réductions, de la dehydratase (DH), qui déshydrate le polycétide ou encore le domaine de enoyl reductase (ER), qui élimine les insaturations.

Chez les champignons, les PKS contiennent des domaines qui fonctionnent de façon itérative, c'est-à-dire qu'ils peuvent accomplir plusieurs fois la même réaction, on parle alors de PKS itérative. Au contraire, chez les bactéries, les PKS possèdent plusieurs modules avec les différents domaines, on parle de PKS modulaires (Figure 12). L'ordre d'incorporation des acides carboxyliques ainsi que le nombre d'itérations chez les champignons restent encore méconnus (Cox, 2007).

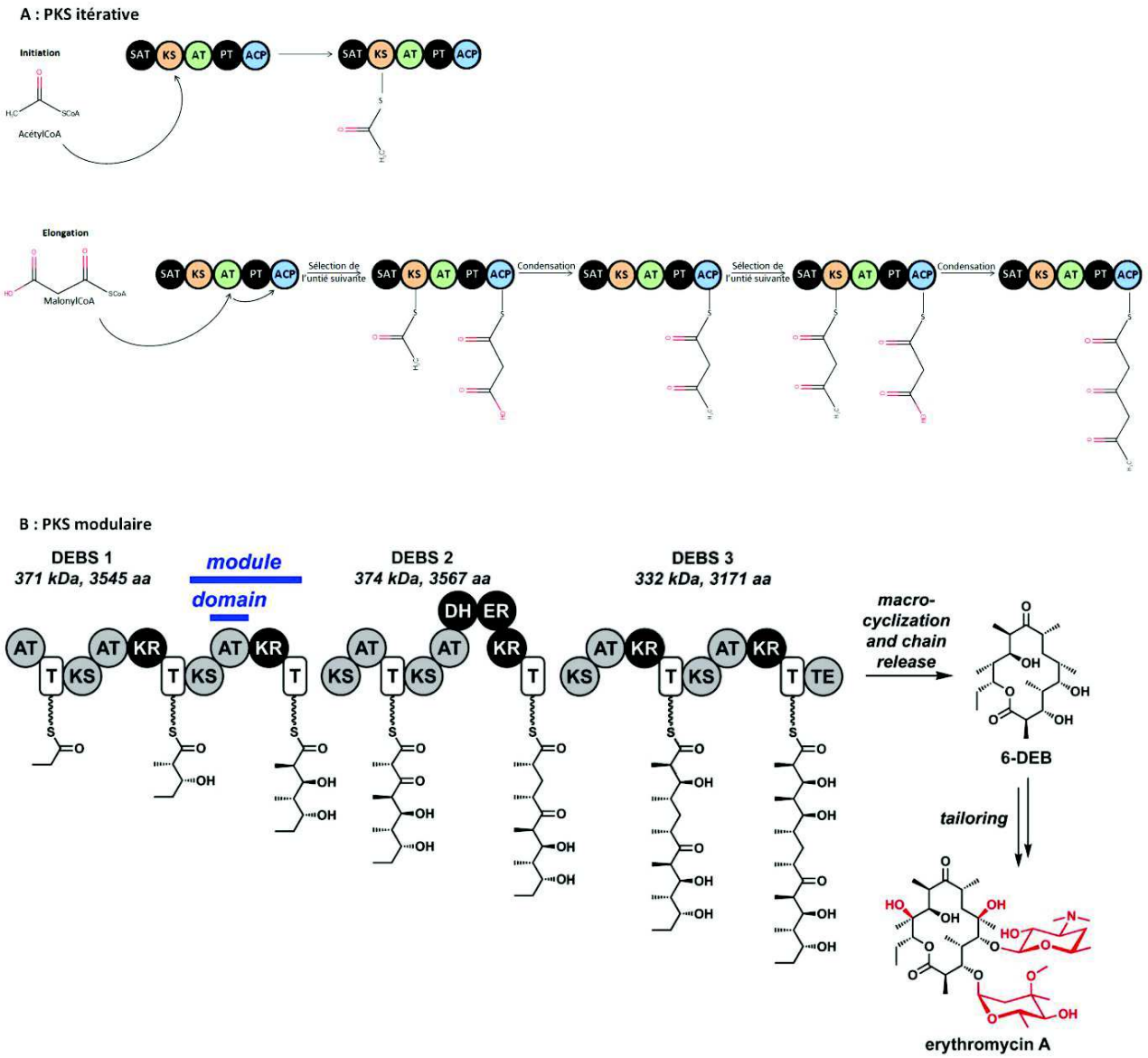


Figure 12 : Comparaison des mécanismes de synthèse des polycétides. A : PKS fongique avec le début de la synthèse de la griseofulvine. B : PKS bactérienne avec la synthèse de l'érythromycine (Campbell & Vederas, 2010; Crawford & Townsend, 2010; Walsh & Fischbach, 2010; Cacho *et al.*, 2013).
En noir, les modules optionnels de modification : SAT : starter Unit ACP Trancyclase, il charge la première unité d'acétylCoA sur le domaine KS, PT : Product template, aide à la cyclisation du polycétide, KR : ketoreductase, ER : Enoylreductase, DH : Dehydratase, T : thiolation est l'équivalent chez les bactéries du domaine ACP de la PKS itérative

En plus des modifications en cours d'élongation du polycétide, il existe des modifications post-synthèse comme des réductions ou méthylations (Keller *et al.*, 2005). Ainsi, les champignons sont capables de synthétiser des molécules très diverses allant des plus simples comme l'acide orsellinique aux plus complexes comme la griseofulvine (Figure 13).

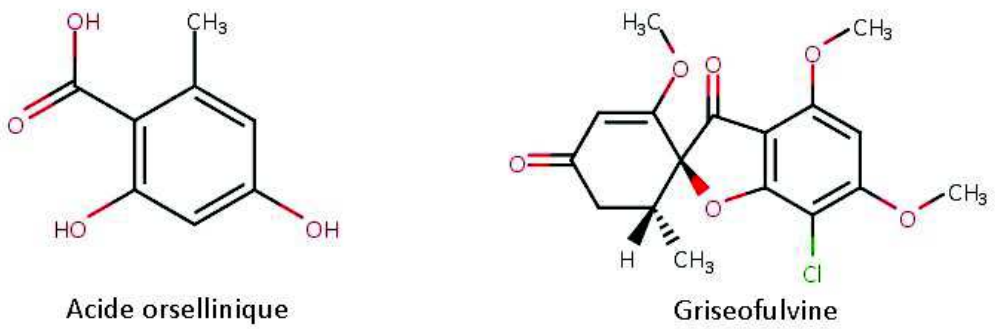


Figure 13 : Structures de l'acide osellinique et de la griseofulvine

La voie de biosynthèse de la griseofulvine est un bon exemple pour illustrer la famille des polycétides. La griseofulvine, découverte en 1939, est un antifongique synthétisé par une souche terrestre de *Penicillium griseofulvum* (Oxford *et al.*, 1939) et également extraite d'une souche marine de *Penicillium waksmanii* (Petit *et al.*, 2004). Elle est actuellement utilisée contre les dermatophytes (champignons impliqués dans les maladies de peau, cheveux, ongles) (Cacho *et al.*, 2013). Alors qu'on sait qu'elle appartient aux polycétides depuis la fin des années 50 (Birch *et al.*, 1958; Simpson & Holker, 1977), l'élucidation de sa voie de biosynthèse est, toute récente (Cacho *et al.*, 2013). Le groupe de gènes impliqué dans la synthèse de la griseofulvine est formé d'un gène, *gsfA*, codant la PKS et des gènes, *gsfB* à *gsfF* puis *gsfI* codant des enzymes de modifications qui vont intervenir après la synthèse du polycétide précurseur (Figure 14 A). La synthèse débute avec la PKS de type I GsfA. Elle synthétise un heptakétide en fusionnant une 1 unité d'acétylCoA et 6 unités de malonylCoA (Figure 14 B). Le produit obtenu est cyclisé par la PKS au niveau du domaine PT puis libéré. Ensuite, les enzymes de modifications post-synthèse interviennent : GsfB et GsfC réalisent des méthylations sur la chaine carbonée, GsfI permet la fixation d'un atome de chlore sur la molécule. Ensuite, la GsfF cyclise la molécule qui sera ensuite méthylée par GsfD. Enfin, GsfE catalyse une enoylreduction (Figure 14 B).

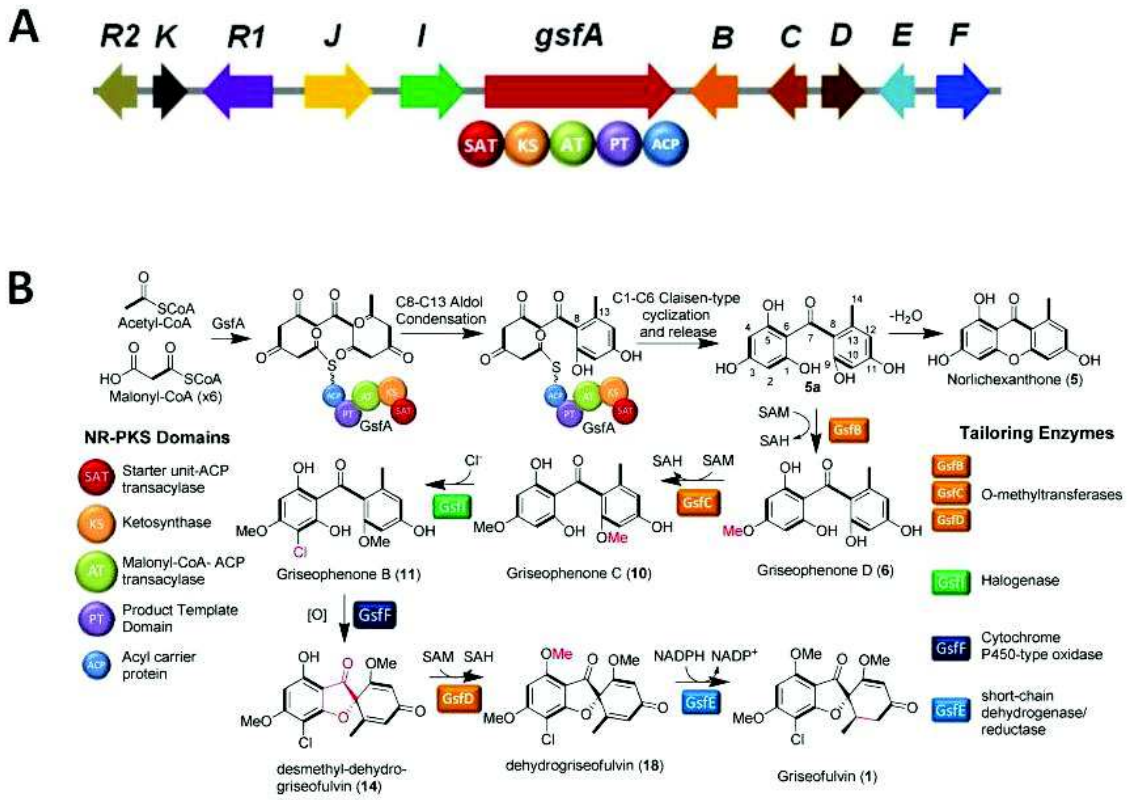


Figure 14 : Organisation de la voie de biosynthèse de la griseofulvine. A : Organisation des gènes au sein du cluster de gènes. B : Détails de la voie de biosynthèse (Cacho *et al.*, 2013)

Contrairement à la PKS de type I, la PKS de type III est moins répandue chez les champignons. Elle possède un seul domaine semblable au domaine KS de la PKS de type I. Ce domaine condense les acides carboxyliques et transforme la chaine nouvellement synthétisée (Figure 15). Cette PKS synthétise de petites molécules cycliques avec 3 ou 4 unités d'acides carboxyliques (Hashimoto *et al.*, 2014).

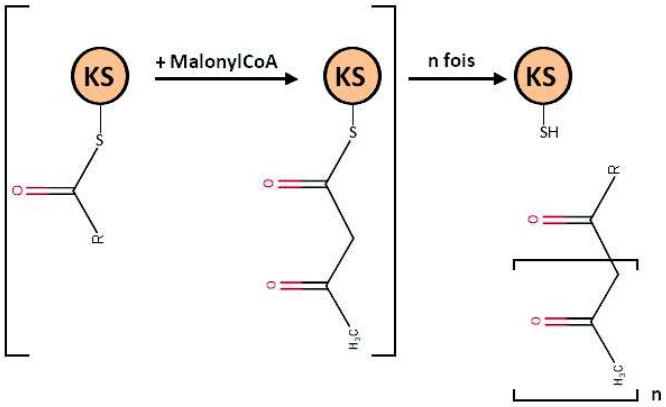


Figure 15 : Structure de la PKS de type III (Hashimoto *et al.*, 2014)

B. Les peptides non ribosomiques

Les peptides fongiques actifs sont moins abondants que les polycétides. Pourtant ils sont, depuis très longtemps, au cœur de nos systèmes de santé. En effet les premiers antibiotiques comme les beta-lactames (pénicilline, céphalosporine), appartiennent à cette classe de molécules. Comme les polycétides, ces peptides sont synthétisés par des complexes enzymatiques appelés Non Ribosomal Peptides Synthetases (NRPS). Ces complexes utilisent des acides aminés protéinogènes et non protéinogènes pour synthétiser des peptides dits non ribosomiques (Keller *et al.*, 2005). Les peptides non ribosomiques sont nettement plus diversifiés que les polycétides car plus de 500 monomères différents peuvent intégrer la chaine peptidique. Ces acides aminés non protéinogènes sont souvent à l'origine de l'activité biologique du peptide (Marahiel & Essen, 2009; Walsh & Fischbach, 2010).

Les NRPS sont composées de plusieurs modules composés eux même de plusieurs domaines : le domaine d'adénylation (A) reconnait, active le substrat et le charge sur le domaine Peptidyl Carrier Protein (PCP), également appelé domaine de Thiolation (T). Ce domaine porte la chaine peptidique en cours d'élongation. Le module de condensation (C) catalyse la liaison peptidique du substrat sur la chaine peptidique (Finking & Marahiel, 2004). Chaque module est responsable de l'incorporation d'un acide aminé dans la chaine peptidique. L'ordre de succession des modules dans le groupe de gènes codant la NRPS donne donc des renseignements sur la séquence peptidique (Marahiel & Essen, 2009). Tout comme dans les PKS, il existe dans les NRPS des domaines « facultatifs », comme des domaines d'épimérisation qui permettent de convertir un L-acide aminé en D-acide aminé, de N-méthylation, qui rajoute un groupement méthyl sur l'azote ou encore des domaines de réduction qui vont réduire différents groupements (carboxyle ou alcool) (Döhren, 2004). Ces domaines dits facultatifs modifient de la chaine peptidique au cours de l'élongation. Ainsi, la diversité structurale des peptides non ribosomiques repose sur la longueur de la chaine peptidique, sa possible cyclisation et les différentes fonctions assurées par les domaines de modification de la chaine peptidique. Le peptide final synthétisé par la NRPS peut ensuite être modifié post-synthèse pour amener encore plus de diversité structurale.

Il existe plusieurs type de NRPS : les linéaires (type A), les itératives (type B) et les non linéaires (type C) (Mootz *et al.*, 2002) (Figure 16). Les NRPS linéaires consistent en une succession des

modules composés des domaines A-T-C et de domaines de modification. La séquence peptidique synthétisée peut être prédite en étudiant l'ordre de succession des modules A. Les NRPS iteratives sont composées d'un ou plusieurs modules qu'elles utilisent plusieurs fois au cours de la synthèse du peptide. Enfin les NRPS non linéaires, plus rares chez les champignons, comprennent plusieurs modules où les domaines A-T-C sont placés aléatoirement. La séquence du peptide final est, par conséquent, plus difficile à prédire.

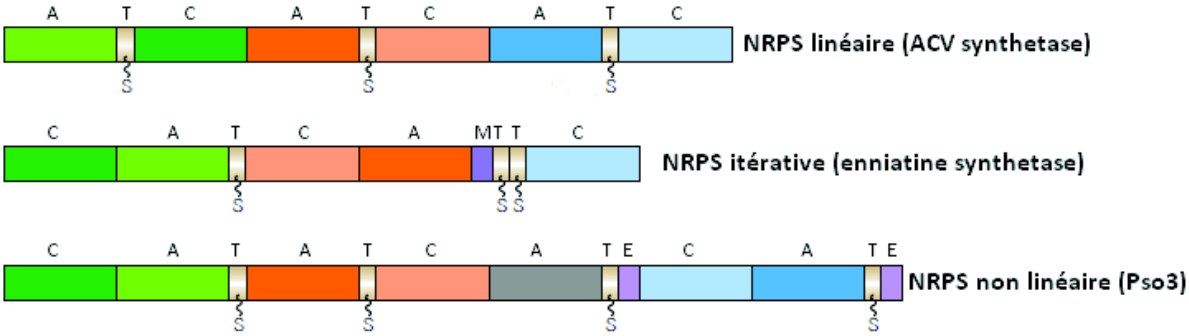


Figure 16 : Les différents types de NRPS, adaptée de (Keller *et al.*, 2005; Eisfeld, 2009)

La céphalosporine C est la première molécule fongique d'origine marine découverte. Elle appartient à la famille des peptides non ribosomiques. Sa voie de biosynthèse a été élucidée à la fin des années 80 (Aharonowitz *et al.*, 1992). Les gènes impliqués dans la synthèse sont répartis en 3 groupes (Figure 17 A). La synthèse débute par la formation d'un tripeptide linéaire synthétisé par une NRPS, l'ACV synthase, codée par le gène *pcbAB*. Ce peptide est formé d'un acide L-α-aminoadipique, d'une L-cystéine et d'une D-valine, obtenue par épimérisation d'une L-valine. Ce peptide est oxydé puis cyclisé, par l'isopenicillin N synthase (*pcbC*) pour former l'isopenicillin N. Ces deux premières étapes sont également communes à la biosynthèse de la pénicilline. Ensuite, l'extrémité comportant la chaine latérale est épimérisée (le L-α- aminoadipique est devenu l'acide D-α- aminoadipique) et forme ainsi la pénicilline N, le précurseur direct des céphalosporines. Le cycle à 5 liaisons de ce précurseur est agrandi à 6 liaisons via une oxydation réalisée par la déacétoxycéphalosporine C synthetase (DAOCS), également appelée expandase. Cette dernière molécule est par la suite hydroxylée puis acétylée pour former la céphalosporine C (Figure 17 B) (Aharonowitz *et al.*, 1992; Hamed *et al.*, 2013).

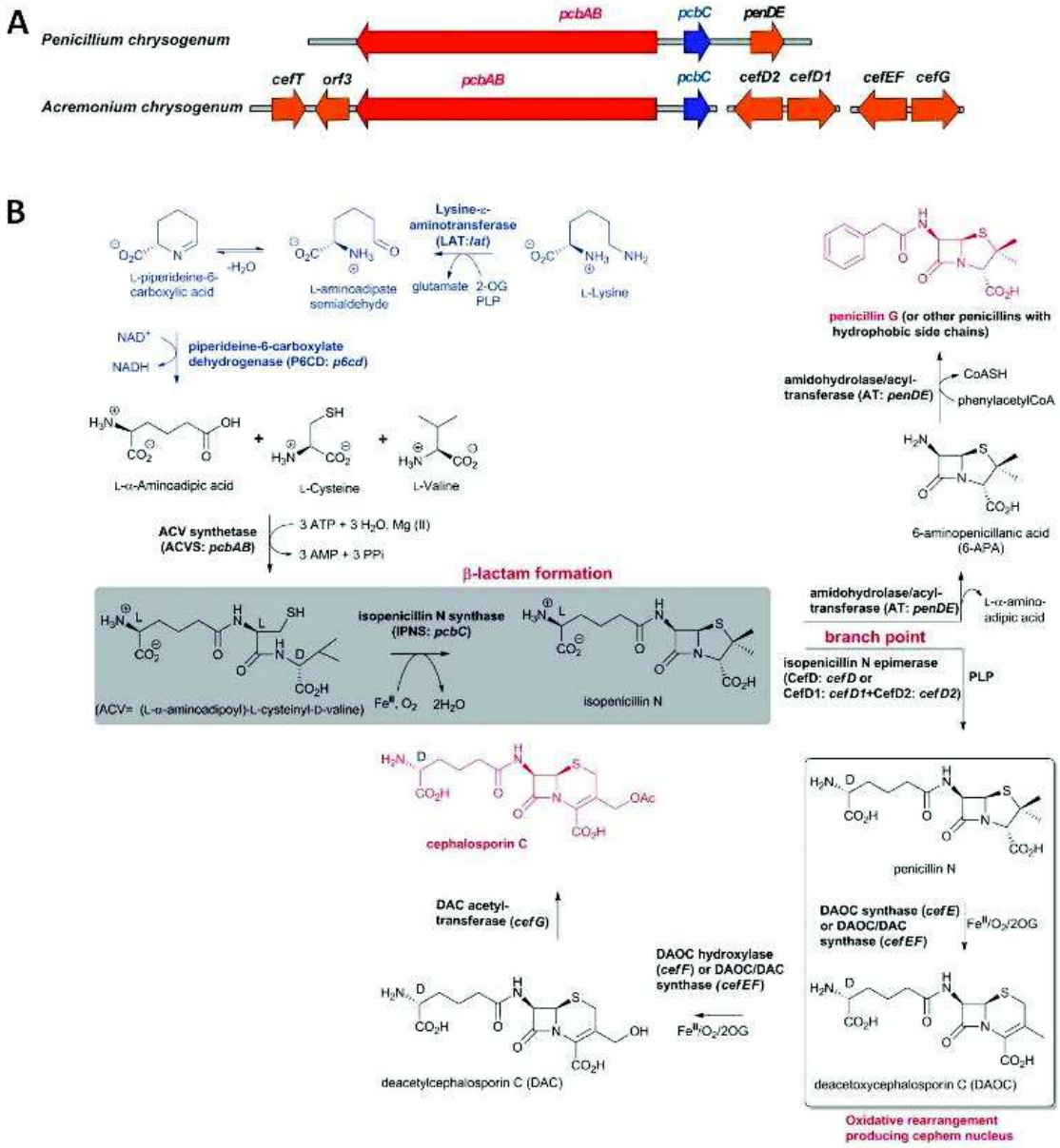


Figure 17 : Organisation de la voie de biosynthèse de la céphalosporine C. A : Organisation des gènes. B : Détails de la voie de biosynthèse (Hamed *et al.*, 2013)

C. Les terpènes

Ils représentent 15% des métabolites fongiques d'origine marine bioactifs (Figure 11). Cette famille de molécules est structuralement très diverse. Elle comprend des molécules simples avec des structures linéaires et des molécules complexes cycliques. Les terpènes sont synthétisés à partir d'unité d'isoprène diphosphate composée de 5 carbones (Figure 18) : l'isopentényl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP), tous deux issus de la voie des mévalonate (Keller *et al.*, 2005; Christianson, 2008).

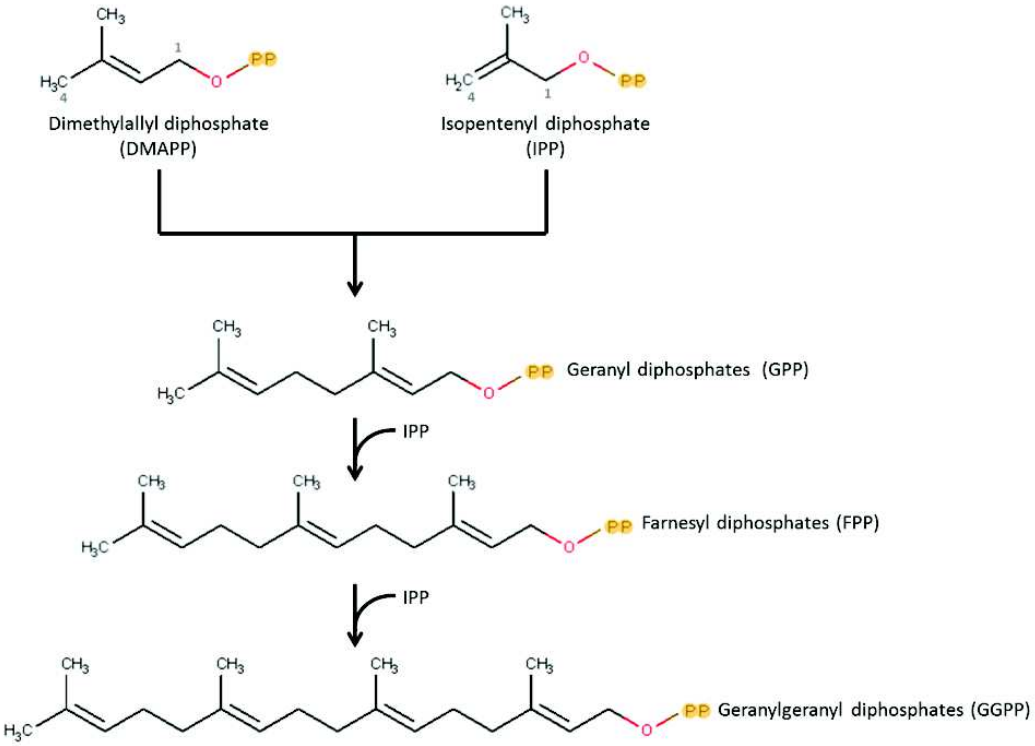


Figure 18 : Biosynthèse des précurseurs des terpenoides (Yao, 2007)

La biosynthèse des terpènes est réalisée en deux étapes : la première permet la synthèse des précurseurs par les prényltransferases, la seconde consiste en la cyclisation des précurseurs par des terpènes cyclases. Les prényltransferase fusionnent les différentes unités d'isoprènes pour obtenir les précurseurs directs de la synthèse des terpènes. Il existe 3 prényltransferases : les géranyl diphosphatases synthétisent les géranyl diphosphates (GPP, molécules à 10 carbones) précurseurs des monoterpènes, des farnésyl diphosphatases fabriquent des farnésyl diphosphates (FPP, molécules à 15 carbones) précurseurs des sesquiterpènes, et des géranylgéranyl diphosphatases réalisent des géranylgéranyl diphosphates (GGPP, molécules à 20 carbones) les précurseurs des diterpènes (Figure 17). Les GGPP et les FPP peuvent ensuite être couplés pour former des molécules plus conséquentes à 30 ou 40 carbones respectivement (Christianson, 2008; Wawrzyn *et al.*, 2012)

Ces précurseurs sont ensuite cyclisés par des terpènes cyclases, également appelée terpène synthases. Ces enzymes peuvent se présenter sous la forme d'un complexe multi-enzymatique, contenant plusieurs domaines pour catalyser des réactions complexes engendrant des molécules de haut poids moléculaire (Christianson, 2008). Le terpène ainsi obtenu peut par la suite être modifié par d'autres enzymes : méthylations, carboxylations, ou encore hydroxylation (Wawrzyn *et al.*, 2012).

La pleuromutiline est un diterpène fongique qui possède des activités antimicrobiennes. Elle a été isolée à partir de 2 basidiomycètes anciennement identifiés comme *Pleurotus mutilis* Sacc et *Pleurotus passeckerianus* Pilat (Kavanagh *et al.*, 1951). La pleuromutiline et ses dérivés sont actifs contre les bactéries à Gram-positif impliqué dans les maladies de peau (Yan *et al.*, 2006). Principalement utilisés en médecine vétérinaire, ce n'est qu'en 2007 que la retapamuline, dérivée de la pleuromutiline est utilisée en thérapie humaine, devenant ainsi le premier représentant d'une nouvelle classe d'antibiotique avec un mécanisme d'action unique qui inhibe en plusieurs point la synthèse protéique et entrainant un faible développement de résistance bactérienne (Yan *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2016). Si la voie de biosynthèse de la pleuromutiline a été élucidée dans les années 60, le groupes de gènes qui lui est associé n'a été découvert que très récemment (Figure 19 A) (Birch *et al.*, 1966; Mitterbauer & Specht, 2011). La synthèse des diterpènes commence par la formation du précurseur, le GGPP (20 carbones). La liaison du DMAPP en C1 et de l'IPP en C4 forme un GPP. Deux autres unités IPP sont ajoutées pour former le GGPP (Figure 18). Cette étape est réalisée par la géranylgéranyl diphosphatase codée par le gène *ggpps*. Ce précurseur est ensuite cyclisé en 2 étapes par une diterpene synthase pour former un analogue de la mutiline contenant trois cycles (Figure 19 B) (Tsukagoshi *et al.*, 2007; Yao, 2007). Il est ensuite modifié par l'action de Cytochromes P-450, d'acyltransférase (ATF) et de dehydrogenase/reductase (SDR) (Bailey *et al.*, 2016) (Figure 19 B).

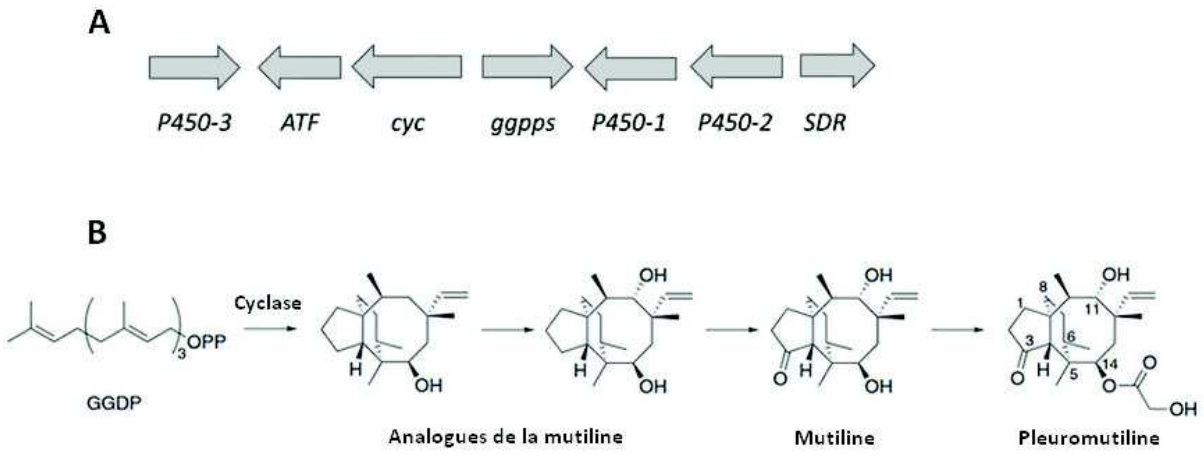


Figure 19 : Organisation de la voie de biosynthèse de la pleuromutiline. A : Organisation des gènes au sein du cluster de gènes. *ATF* : gène codant pour une acétyl transférase, *cyc* gène codant pour la terpène cyclase, *ggps* gène codant pour la geranylgeranyl diphosphatase, SDR gène codant pour une déhydrogenase réductase (Bailey *et al.*, 2016).B : Détails de la voie de biosynthèse (Tsukagoshi *et al.*, 2007)

D. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent 20% des métabolites actifs fongiques (Figure 11). Ils contiennent un atome d'azote dans leur structure et dérivent principalement des acides aminés (Ziegler & Facchini, 2008). Ainsi, ils comprennent un grand nombre de molécules très diverses dont principalement des indoles-alcaloïdes. Ces derniers dérivent du tryptophane qui contient un noyau indole.

Plusieurs réactions sont possibles à partir du tryptophane (Xu *et al.*, 2014b) :

- Un diméthylallyl diphosphate peut lui être ajouté par une 4-dimethylallyl tryptophane synthase (4-DMATS) pour former le 4-dimethylallyl tryptophane (4-L-DMAT), un précurseur dans la synthèse des ergots d'alcaloïde (Figure 20).

- Il peut subir une décarboxylation et former la tryptamine, couramment utilisée comme précurseur chez les alcaloïdes de plante. Cependant, l'incorporation de la tryptamine dans les alcaloïdes n'a pas été clairement démontrée chez les champignons.

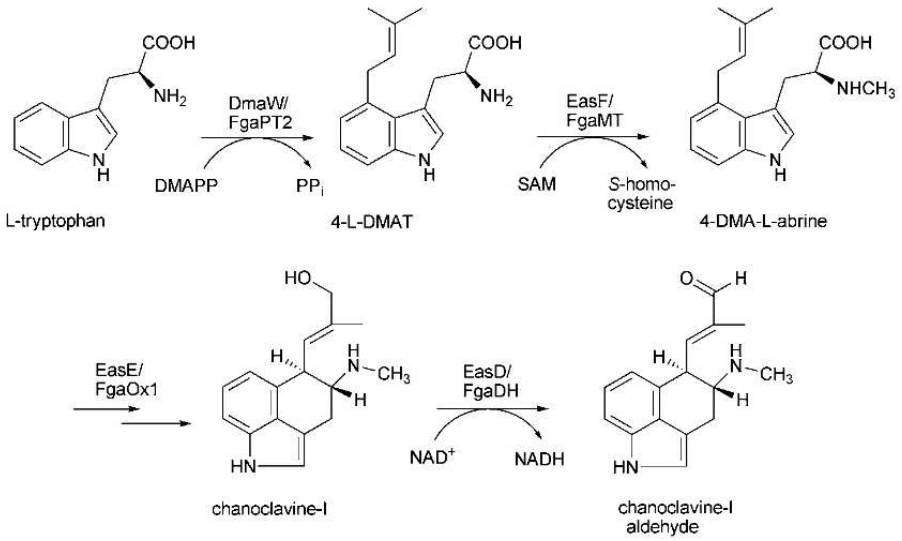


Figure 20 : Premières étapes communes à la synthèse des ergots d'alcaloïdes (Wallwey & Li, 2011)

Les ergots d'alcaloïdes forment une famille de métabolites fongiques d'intérêt biotechnologique. Ils sont utilisés en thérapie pour soigner les migraines ou la pression artérielle (Lorenz *et al.*, 2009), d'autres sont décrits pour leurs activités antimicrobiennes. Leur voie de biosynthèse débute par la formation du noyau d'ergoline dont la première étape consiste à prényler le L-trypthophane pour former le 4-L-DMAT. Cette réaction est réalisée par une DMATS codée par le gène *fgapt2* (Figure 21 A) (Unsöld & Li, 2005). Ce précurseur est ensuite méthylé, par la FgaMT, une méthyl-transférase, pour former la 4-dimethylallyl-L-abrine (Rigbers & Li, 2008). La troisième étape fait intervenir FgaOx1 (ou ccsA) et FgaCat, des enzymes de décarboxylation, cyclisation et hydroxylation qui cyclisent ce dernier intermédiaire (Lorenz *et al.*, 2010; Goetz *et al.*, 2011). Le déroulement des réactions et l'intervention des différentes enzymes ne sont pas encore entièrement élucidés. L'intermédiaire formé, la chanoclavine I va être transformé en son aldéhyde par la FdaDH (Wallwey *et al.*, 2010). A partir de cet aldéhyde, 2 voies de biosynthèses sont possibles : celle de clavines synthétisées par des espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus* et celle des ergopeptides, synthétisés par des espèces de *Claviceps* (Rigbers & Li, 2008).

Les fumigaclavines, appartenant au groupe des clavines, possèdent des activités anticancéreuses et antimicrobiennes contre des bactéries anaérobies (Li *et al.*, 2013b; Xu *et al.*, 2014a; Zhang *et al.*, 2016). Initialement isolée d'environnement terrestre, elles sont, également, produites par des champignons marins (Kansoh *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013b). La synthèse des fumigaclavines passe par un intermédiaire, la festuclavine, produite à partir de l'aldéhyde de la

chanoclavine I. Elle fait intervenir la FgaOx3 et la FgaFS, deux enzymes qui vont réduire et cycliser l'aldéhyde de la chanoclavine I. La première fumigaclavine B est formé par l'ajout d'un groupement hydroxyle sur le carbone 7. Cette réaction est probablement réalisée par le gène codant une une monoxygénase FgaP4250-2 (Arroyo-Manzanares *et al.*, 2016). Le passage de la fumigaclavine B à la fumigaclavine A est réalisée par la FgaAT, une acyltransférase qui permet l'acétylation du groupement hydroxyle rajouté précédemment (Liu *et al.*, 2009). Enfin, la fumigaclavine C est synthétisé chez *A. fumigatus* par une prénylation par la FgaPT1 (Unsöld & Li, 2006) (Figure 21 B).

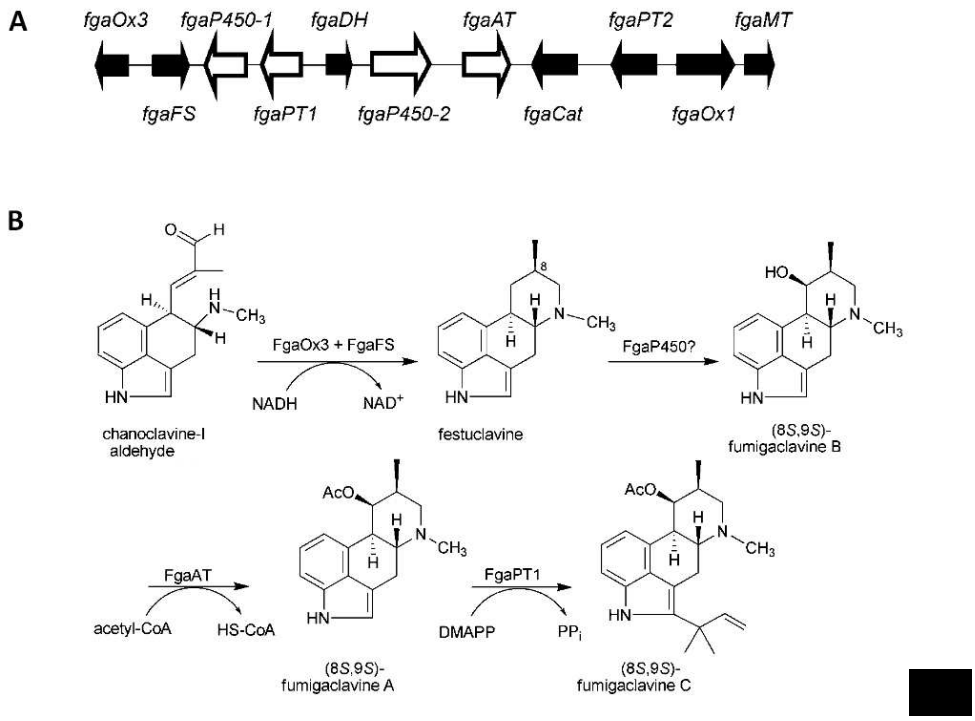


Figure 21 : Organisation de la voie de biosynthèse des fumigaclavines. A : Organisation des gènes. B : Détails de la voie de biosynthèse (Wallwey & Li, 2011)

Pour obtenir encore plus de diversité chimique et structurale, les différentes voies de biosynthèse de métabolites secondaires sont parfois fusionnées pour former des molécules dites hybrides, comme les PKS-NRPS (Boettger & Hertweck, 2013), les diketopiperazines qui consistent à incorporer un indole-alcaloïde dans un peptide non ribosomique *via* une NRPS (Xu *et al.*, 2014b) ou encore les hybrides polycétides-terpènes, appelés méroterpènoides (Itoh *et al.*, 2010) pour lesquels les voies de biosynthèse restent encore peu décrites. Ainsi, la diversité chimique des métabolites secondaires actifs est immense et est largement sous-estimée.

V. OBJECTIFS

Le renouvellement des molécules utilisées en antibiothérapie est devenu une des priorités mondiales pour faire face à l'antibiorésistance. Par conséquent la recherche de molécules naturelles antimicrobiennes s'est intensifiée. Les micro-organismes terrestres et plus particulièrement les champignons ont fourni les principaux antibiotiques encore utilisés aujourd'hui. L'environnement marin, renferme également une grande biodiversité fongique.

Afin de mieux connaitre les champignons marins et leur rôle dans les écosystèmes profonds, une collection de 183 isolats de champignons, isolées de sédiments marins profonds, a été établie (Rédou, 2014). Les sédiments ont été collectés par forage au large de la Nouvelle-Zélande, dans le cadre du programme international de découverte des océans : Integrated Oceans Drilling Program (IODP) lors du LEG 317. La carotte de sédiments, collectée à 344m de profondeur, est longue de 1 927,5m sous le plancher océanique, soit la troisième plus grande obtenue jusqu'à aujourd'hui (International Ocean Discovery Program, 2016). Enfin, cette carotte a été divisée en sous échantillons pour différentes analyses microbiologiques, géologiques ou encore physico-chimique. L'échantillon le plus profond utilisé pour les analyses microbiologiques se situait à 1 925 mètres sous le plancher océanique, soit l'échantillon le plus profond jamais analysé (Fulthorpe *et al.*, 2010). L'étude microbiologique de cette carotte de sédiment a permis de repousser les limites de la vie et a montré, par approche moléculaire, la présence de champignons jusqu'à 1 740m sous le plancher océanique (Ciobanu *et al.*, 2014; Rédou *et al.*, 2014).

Dans un contexte de renouvellement urgent des agents antimicrobiens, et dans le cadre du projet européen MaCuMBA, (Marine microorganisms: Cultivation Methods for improving their Biotechnological Applications, FP7 2012-2016) dont les objectifs sont d'améliorer la culture des micro-organismes marins pour développer leur valorisation biotechnologique, nous avons exploré la collection originale précédente de champignons isolés de sédiments marins profonds pour ses activités antimicrobiennes. Pour ce faire la stratégie élaborée comprend quatre étapes successives :

- Au niveau biodiversité fongique écophysiologie : définir la diversité de champignons cultivables issus de sédiments marins profonds et étudier leurs caractéristiques écophysiologiques. En effet, la connaissance de caractéristiques de croissance des souches

fongiques isolées permettra (i) d'obtenir des informations essentielles relatives à leur adaptation aux conditions environnementales et (ii) de dresser une carte du potentiel de croissance des différentes souches

- Au niveau génomique : évaluer le potentiel de biosynthèse de métabolites secondaires des souches de champignons marins profonds. La présence de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de métabolites potentiellement actifs dans le génome des différentes souches favorisera une sélection ciblée des souches les plus intéressantes.

- Au niveau fonctionnel : déterminer les spectres d'activités antimicrobiennes contre des cibles microbiennes pathogènes en médecine humaine.

- Au niveau structural : caractériser les composés bioactifs. Les composés préalablement décrits pourront être valorisés à travers d'autres activités biologiques qui seront explorées (anti-biofilm, inhibiteur de kinase)

TRAVAUX DE RECHERCHE

CHAPITRE 1

Richesse de la biodiversité fongique et adaptation physiologique des champignons de sédiments marins

Species Richness and Adaptation of Marine Fungi from Deep-Subseafloor Sediments

Vanessa Rédou, **Marion Navarri**, Laurence Meslet-Cladière, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud. 2015. *Applied and Environmental Microbiology*. **81** (10) : 3571-3583

Les paramètres physico-chimiques comme la pression, la température ou encore l'oligotrophie structurent les communautés microbiennes au sein des sédiments marins profonds. L'étude des communautés fongiques dans les sédiments marins est relativement récente (Damare *et al.*, 2006; Nagano *et al.*, 2010; Edgcomb *et al.*, 2011) et montre la présence des champignons marins jusqu'à 1 740m sous le plancher océanique (Ciobanu *et al.*, 2014).

La première partie de cette étude concerne la constitution d'une collection de champignons isolés de sédiments marins profonds. Les échantillons obtenus ont été traités en diversifiant les conditions de culture : différentes valeurs de pressions et de températures fixées selon la profondeur de l'échantillon collecté, différents milieux de cultures relativement oligotrophes, différentes concentrations en sels de mer, avec ou sans antibiotique et avec ou sans oxygène. Ce plan d'expérience a permis d'isoler 183 champignons. La grande majorité (80%) a été obtenue après une étape préalable d'enrichissement sous pression hydrostatique, ce qui semble indiquer une adaptation de ces isolats fongiques aux conditions *in situ*.

Nous avons ensuite sélectionné des représentants de cette collection pour les identifier et étudier leurs caractéristiques de croissance. La sélection a été réalisée après une étape de déréplication (*MSP-PCR fingerprinting*) utilisant l'amorce M13. Elle a permis de regrouper les souches ayant des profils génétiques similaires. L'identification par séquençage et analyses phylogénétiques des marqueurs génétiques a montré que cette collection était dominée par les Ascomycota, (plus de 89% de la collection). Ils sont principalement représentés par les genres *Penicillium* et *Fusarium* pour les champignons filamenteux et *Meyerozyma* pour les levures. Les Basidiomycota (11%) sont principalement présents sous forme levures et appartiennent au genre *Rhodotorula*. Tous les taxons isolés dans le bassin de Canterbury, sont également décrits dans des écosystèmes terrestres, soulevant ainsi la question de leur réelle adaptation aux conditions environnementales de la biosphère profonde.

L'étude des caractéristiques de croissance des champignons a été réalisée par néphélométrie laser sur 15 représentants de champignons filamenteux, sélectionnés dans les principaux groupes et en fonction de la profondeur. Les champignons ont été cultivés en plaque 96 puits, à différentes températures, dans du PDB (Potato Dextrose Broth) contenant différentes concentration en sel. Les

résultats montrent que les souches sont non halophiles à 25°C. Cependant, l'augmentation de la température a entrainé l'apparition d'une halotolérance ou d'une halophilie pour les souches les plus profondes uniquement. Ce changement physiologique suggère une adaptation des souches à l'augmentation de température observée au cours de l'enfouissement des sédiments.

Enfin, le potentiel de synthèse de métabolites secondaires a été abordé pour estimer le potentiel biotechnologique de ces isolats. Les souches de cette collection ont été criblées pour la présence de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de métabolites potentiellement bioactifs. Les voies de biosynthèse des PKS, NRPS, des hybrides PKS-NRPS et des TPS ont été recherchées par PCR. Plus de 96% de la collection possède au moins un des gènes ciblés. Seules huit souches de levures n'ont présenté aucun des gènes recherchés.

Dans les sédiments du bassin de Canterbury, l'approche culturale appliquée a permis d'isoler 183 champignons entre 4 et 1 884 mètres sous le plancher océanique. Bien qu'affiliés à des groupes de champignons terrestres, certaines souches de la collection semblent adaptées aux conditions environnementales. De plus, elles ont affiché un fort potentiel génétique laissant présager la synthèse de molécules secondaires avec de potentielles activités biologiques. Enfin, il est important de noter que dans cette étude, l'établissement de la collection de culture et leur identification ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Vanessa Rédou (2011-2014). Les étapes de déréplication, les analyses écophysiologiques par Néphélométrie Laser et l'évaluation du potentiel biotechnologique ont été obtenus dans le cadre de cette thèse (2013-2016).

AEM
Journals.ASM.org

Species Richness and Adaptation of Marine Fungi from Deep-Subseafloor Sediments

Vanessa Rédou, Marion Navarri, Laurence Meslet-Cladière, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud

Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, Technopôle Brest-Iroise, Plouzané, France

The fungal kingdom is replete with unique adaptive capacities that allow fungi to colonize a wide variety of habitats, ranging from marine habitats to freshwater and terrestrial habitats. The diversity, importance, and ecological roles of marine fungi have recently been highlighted in deep-subsurface sediments using molecular methods. Fungi in the deep-marine subsurface may be specifically adapted to life in the deep biosphere, but this can be demonstrated only using culture-based analyses. In this study, we investigated culturable fungal communities from a record-depth sediment core sampled from the Canterbury Basin (New Zealand) with the aim to reveal endemic or ubiquist adapted isolates playing a significant ecological role(s). About 200 filamentous fungi (68%) and yeasts (32%) were isolated. Fungal isolates were affiliated with the phyla Ascomycota and Basidiomycota, including 21 genera. Screening for genes involved in secondary metabolite synthesis also revealed their bioactive compound synthesis potential. Our results provide evidence that deep-subsurface fungal communities are able to survive, adapt, grow, and interact with other microbial communities and highlight that the deep-sediment habitat is another ecological niche for fungi.

Marine environments encompass coastal and open-ocean water columns and sediments, including the deep-marine subsurface. These environments harbor a broad diversity of microorganisms involved in biogeochemical cycling. There has recently been increasing interest in the diversity of microbial eukaryotes in these habitats, particularly in the subsurface biosphere. Hydrothermal vent sediments (1–4) as well as sediments from centimeters to hundreds of meters below the seafloor (5–13) have been investigated using both molecular and culture-dependent methods. Such integrated approaches have revealed the occurrence and activity of complex fungal communities in these extreme environments. Fungal DNA and RNA signatures as well as cultured isolates provide direct evidence that fungi persist in these marine sediments, although their role in these ecosystems is not yet clearly understood. Most of the fungal molecular signatures and cultured isolates from those habitats were affiliated with the phylum Ascomycota, and a few of them belonged to the phyla Basidiomycota and Chytridiomycota (14). While some fungal sequences are from potentially novel organisms, many sequences are from fungi with close relatives from terrestrial, freshwater, and marine environments (8).

To date, within subseafloor sediments, fungi have been identified from a few centimeters below the seafloor (5) down to 1,740 m below the seafloor (mbsf) (15), but we are still eager to assess whether they persist only as vegetative spores or play an active role(s) in biogeochemical cycling. Recent metatranscriptomic analyses suggest that fungi, while occurring in lower abundance than *Bacteria* and *Archaea*, possess the ability to degrade a variety of organic substrates in deep-subseafloor sediments (13).

Limitations on habitability in deep-subseafloor sediments are set by a variety of physical and chemical properties acting both individually and in combination, including low nutrient availability, salinity, hydrostatic and lithostatic pressures, pH, porosity, and temperature. The deep subsurface is defined by microbial ecologists as sediment layers with distinct microbial communities that lack the microbial imprint of water column communities (16). As many molecular signatures representing terrestrial fungi have been detected in deep-marine subsurface sediments, it is now necessary to determine whether such terrestrial microorganisms occurring in this ecosystem are specifically adapted to the extreme *in situ* conditions.

Microbial interactions between fungi, *Bacteria*, and *Archaea* may occur in subsurface sediments, including those resulting from the synthesis and release of bioactive compounds (from antimicrobials to cell cycle blockers). Marine fungi from coastal waters are known to synthesize a broad range of bioactive natural compounds with interesting bioactivities (17), including polyketides, peptides, alkaloids, and terpenoids. Consequently, the deep subseafloor may be an untapped reservoir of microorganisms producing biomolecules that may be useful for biotechnological applications.

Here we present the first culture-based analysis of fungi isolated from deep-subsurface sediments. The purpose of this survey was (i) to determine the distribution pattern of culturable fungal communities along a sediment core from the Canterbury Basin near New Zealand, (ii) to characterize their ecophysiological profiles and, consequently, to assess their ability to withstand harsh *in situ* conditions that include elevated hydrostatic pressure, high salinity, and a range of temperatures, and (iii) to evaluate their genetic potential for the synthesis of bioactive compounds.

Received 14 December 2014 **Accepted** 11 March 2015
Accepted manuscript posted online 13 March 2015
Citation Rédou V, Navarri M, Meslet-Cladière L, Barbier G, Burgaud G. 2015. Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. Appl Environ Microbiol 81:3571–3583. doi:10.1128/AEM.04064-14.
Editor: A. A. Brakhage
Address correspondence to Gaëtan Burgaud, gaetan.burgaud@univ-brest.fr.
Supplemental material for this article may be found at http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04064-14.
Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AEM.04064-14

TABLE 1 Culture collection of fungi from deep-subseafloor sediments

Sample identifier	Core depth (mbsf)	No. of genera/no. of strains isolated: In total	With enrichment under hydrostatic pressure	Under atmospheric pressure
1H3	4	9/26	7/16	4/10
2H5	12	7/17	5/12	3/5
3H5	21	5/13	5/12	1/1
4H1	25	7/25	7/25	0
5H1	34	14/38	11/31	4/7
5H3	37	9/26	5/15	4/11
15H4	137	6/13	6/13	0
48X3	403	5/12	4/11	1/1
88X1	765	3/12	2/11	1/1
99R1	1,478	0	0	0
144R3	1,884	1/1	0	1/1
Total		21[a]/183	13/146	12/37

[a] Twenty-one genera plus one uncultured Agaricomycetes isolate.

MATERIALS AND METHODS

Site description and sediment sampling. Sediment samples were obtained from a core collected in the Canterbury Basin on the eastern margin of the South Island of New Zealand at site U1352 (44°56′26.62″S, 172°1′36.30″E). This core reached a depth of 1,927.5 mbsf and was drilled during the Integrated Ocean Drilling Program (IODP) Leg 317 Expedition on DS *JOIDES Resolution* in a water depth of 344 m. Fluorescent microspheres were used as tracers for contamination during drilling. Samples were processed under strict contamination control conditions onboard and onshore, and only samples with undetectable contamination were used for this study (18). Core subsampling was performed onboard under sterile conditions, and only the center parts of unconsolidated sediments and intact pieces of rocks were kept for microbiological analyses, as reported elsewhere (18). Subsamples were immediately transferred into a sterile Schott bottle sealed with a butyl rubber stopper and were stored at 4°C under a nitrogen atmosphere for later cultivation. A recent culture-independent study of the same core did not detect contamination of those sediment samples (15, 19). For this study, 11 samples of sediment and sedimentary rock collected at depths ranging from 4 to 1,884 mbsf were analyzed (Table 1).

Enrichment conditions mimicking the *in situ* natural environment. Five different media were used for isolation of filamentous fungi and yeasts under atmospheric pressure: malt extract agar, potato dextrose agar, cornmeal agar, Sabouraud dextrose agar, and Czapek Dox agar. The media were diluted 1:5 to simulate the low nutrient conditions of deep sediments, as described elsewhere (5), and were formulated with and without 3% (wt/vol) sea salts and with and without antibiotics (500 mg/liter chloramphenicol, 200 mg/liter penicillin). Samples from 4, 12, 21, 25, 34, 37, and 137 mbsf were incubated at 5°C, 15°C, and 25°C; samples from 403 and 765 mbsf were incubated at 15°C, 25°C, and 30°C; and samples from 1,478 and 1,884 mbsf were incubated at 35°C, 45°C, and 55°C.

Three different media were used for the isolation of fungi under elevated hydrostatic pressure, i.e., Sabouraud dextrose broth, marine broth, and potato dextrose broth (PDB), diluted 1:5 with or without sea salts and antibiotics, as described above. Enrichment cultures were performed under aerobic conditions in sterile syringes, and the media were saturated with dissolved oxygen. Each syringe contained 5 ml of medium and 200 μl of sediment sample slurry. The syringes were then transferred into a high-pressure incubation system and incubated at different temperatures. Samples from 4, 12, 21, 25, 34, and 37 mbsf were incubated at 25°C and 4 MPa; samples from 137, 403, and 765 mbsf were incubated at 30°C and 11 MPa; and samples from 1,478 and 1,884 mbsf were incubated at 45°C and 37 MPa. After 14 days of enrichment under hydrostatic pressure, 100 μl of culture was dispensed into agar plates and incubated at the same temperature used for the original cultivation until fungal growth. For each condition, pure cultures were obtained by streaking and central picking on different enrichment media for fungi showing a distinct morphology.

As a control, nutrient plates were exposed within a laminar flow hood during all isolation procedures. No fungal colonies were obtained on control plates, indicating the absence of aerial contamination during isolation.

DNA extraction. DNA extraction from all cultures was performed using a FastDNA spin kit (MP Biomedicals) following the manufacturer's recommendations for fungi. DNA quality and quantity were assessed using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies) prior to gene-specific PCR amplifications.

MSP-PCR. In order to cluster the isolates, mini- and microsatellite-primed PCR (MSP-PCR) was applied. The primer used for MSP-PCR was the core sequence of phage M13 (GAGGGTGGCGGTTCT) (20). The PCR was performed in 25-μl reaction volumes containing 1× PCR buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.4 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 0.8 mM the primer, 1 U of *Taq* polymerase, and 15 ng of genomic DNA from each cultured isolate. Amplification consisted of an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 45 s at 93°C, 60 s at 50°C, and 60 s at 72°C and a final extension step of 6 min at 72°C (21). A negative control where DNA was replaced by sterile distilled water was also included. Amplified DNA fragments in 1× Tris-borate-EDTA (TBE) buffer were separated by electrophoresis on a 1.4% (wt/vol) agarose gel (Promega) at 85 V for 3.5 h. On each gel, a 1-kb molecular size marker was used (Promega). DNA banding patterns were visualized under UV transillumination, and picture files were generated using a Quantum ST4 system (Vilbert Lourmat). Genetic profiles were analyzed using BioNumerics software (version 6.6; Applied Maths). All fingerprints were grouped by similarity using the Dice coefficient, and clustering was based on the unweighted-pair group method using average linkages methods. The cophenetic correlation coefficient was calculated. Clusters were generated using an arbitrary cutoff of 75% sequence similarity with minor adjustments (±5%). Some representative sequences were selected from each cluster for further sequencing.

PCR amplification of 18S, ITS, and partial 28S/26S rRNA. For genetic identification of fungi isolated in our sediment samples, 18S rRNA gene sequences from cultured isolates were amplified with primers NS1 (5′-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3′) and SR6 (5′-AAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3′) (22). Internal transcribed spacer (ITS) and partial 28S rRNA gene sequences were amplified using primers ITS5 (5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′) and LR6 (5′-CGCCAGTTCTGCTTACC-3′), respectively (22, 23). Amplifications of the D1/D2 region of the 26S rRNA gene were carried out with primer sets ITS5 (5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3′)/NL4 (5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′) and LR6 (5′-CGCCAGTTCTGCTTACC-3′)/NL1 (5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3′), as described by Gadanho and Sampaio (1). All PCRs were performed in 25-μl reaction volumes containing 1× GoTaq buffer, 0.4 mM dNTPs (Promega), 0.36 μM each primer (Sigma), 2 mM $MgCl_2$, 1 U of GoTaq polymerase (Promega), and 1 μl of genomic DNA. The PCR assay for 18S rRNA gene and ITS sequences included an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 54°C, and 2 min at 72°C and a final extension step of 2 min at 72°C, before holding at 4°C. The PCR assay for the 26S rRNA gene included an initial denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 54°C, and 1 min at 72°C and a final extension step of 2 min at 72°C, before holding at 4°C. A negative control in which DNA was replaced by sterile water was included. PCR products were analyzed by electrophoresis in a 0.8% (wt/vol) agarose gel (Promega) in 1× TBE buffer at 90 V for 90 min and stained with GelRed. DNA banding patterns were visualized under UV transillumination, and picture files were generated using a Quantum ST4 system (Vilbert Lourmat).

Sequencing and phylogenetic analyses. Fungal small-subunit (SSU) ribosomal DNA (rDNA) amplicons were sequenced with forward primers

NS1 (5′-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3′) and NS3 (5′-GCAAGTCTG GTGCCAGCAGCC-3′) and reverse primers NS6 (5′-AACTTAAAGGAA TTGACGGAA-3′) and SR6 (5′-AAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3′) (22). For ITS and long-subunit (LSU) rDNA, primers ITS1, ITS4 (22), and LR6 (23) were used. The D1/D2 region of 26S rDNA was sequenced using NL1 on the ITS5-NL4 fragments and NL4 on the NL1-LR6 fragments (1). Sequences were obtained by use of the BigDye Terminator technology (Applied Biosystems) on a Biogenouest sequencing platform at the Station Biologique de Roscoff (http://www.sb-roscoff.fr/plateformes-techniques/genomique-sbr.html). The chromatograms obtained were translated into nucleotide sequences with BioNumerics software (version 6.6; Applied Maths). After the sequences were cleaned, they were imported into MEGA (version 5.0) software (24). Each sequence was analyzed using the BLASTn program to determine the nearest relatives in GenBank (25). Similarities between sequences were assessed using pairwise distances calculated with the MEGA (version 5.0) program. The sequences were trimmed to ensure that all sequences had the same start point and endpoint and were aligned using ClustalW (version 1.83) software (26). Phylogenetic analyses were performed by the use of maximum likelihood criteria with 500 bootstrap replicates in the MEGA (version 5.0) program (24). Shannon indices were calculated on the basis of the number and abundance of species for each depth using the vegan package in R.

Ecophysiological characterization. Ecophysiological characterization was performed as described by Joubert et al. (27). Briefly, suspensions of conidia from selected isolates and dilutions of those isolates were made using PDB to achieve a final concentration of suspended spores of between 1×10^5 and 5×10^5 per ml. A 96-well plate was filled with the calibrated suspensions (300 μl/well) and incubated in a Laser nephelometer (NEPHELOstar Plus; BMG Labtech) for at least 33 h at 15, 25, 30, and 35°C. All experiments were performed in triplicate. Growth rates (kilo-relative nephelometric units [RNU] per hour) were determined for each culture condition, which included 0, 1.5, 3, and 4.5% sea salts at each temperature for detection of adaptation of these fungal isolates to subsurface *in situ* conditions (3% salinity all along the core and increasing temperatures, i.e., about 30 to 50°C per kilometer).

Occurrence of type I and III PKS, NRPS, hybrid PKS-NRPS, and TPS genes. The presence of genes involved in the biosynthetic pathways of secondary metabolites was investigated. Type I polyketide synthase (PKS I), type III polyketide synthase (PKS III), nonribosomal peptide synthetase (NRPS), PKS-NRPS hybrid, and terpene synthase (TPS) genes were amplified using the following degenerate primer pairs with D-inosine modifications (indicated by i): (i) primers KAF1 (GARKSiCAYGGiACiG GiAC) and KAR1 (CCAYTGiGCiCCRTGiCCiGARAA) (28) were used for amplification of type I PKS genes, (ii) primers XKS1 (TTYGAYGCiB CiTTYTTYRA) and XKS2 (CRTTiGYiCCiCYDAAiCCAAA) (27) were used for amplification of PKS-NRPS hybrid genes, (iii) primers AUG003 (CCGGCACCACCGGNAARCCHAA) and AUG007 (GCTGCATGGCG GTGATGSWRTSNCCBCC) (29) were used for amplification of NRPS genes, (iv) primers TPS1 (GCiTAYGAYACiGCiTGGGT) and TPS2 (RA AiGCATiGCiGTRTCRTC) (30) were used for amplification of TPS genes, and (v) primers CHS1 (GAYTGGGCiVTNCAYCCBGGiGGD) and CHS2 (YTCNAYNKTRAKVCCiGGVCCRAA) were used for amplification of type III PKS genes. Primers targeting type III PKS genes were specifically designed for this study using ClustalW (version 1.83) (26). We selected 18 fungal strains from the NCBI database known to have those genes. Each degenerate primer was designed against two conserved domains of the C terminus of the protein [DWALHPGG and FGPG(L/I)(N /T/S)(M/V/I)E]. All PCRs were performed in 25-μl reaction mixtures including 1× GoTaq buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.4 mM each dNTP (Promega), 0.6 μM each primer (Eurogentec) (except for 1 μM each primers KAF1/KAR2 and XKS1/XKS2), 1 U of GoTaq polymerase (Promega), and 100 ng of genomic DNA. Amplification of type I PKS and PKS-NRPS hybrid genes included an initial denaturation step at 98°C for 2 min, followed by 5 cycles of 98°C for 1 min, 45°C for 1 min, and 72°C for 2 min, followed by 30 cycles of 98°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 72°C for 2 min and a final extension step for 10 min at 72°C. Amplification of type III PKS and TPS genes included an initial denaturation step at 98°C for 2 min, followed by 5 cycles of 98°C for 1 min, 48°C for 1 min, and 72°C for 2 min, followed by 30 cycles of 98°C for 1 min, 51°C for 1 min, and 72°C for 2 min and a final extension step for 10 min at 72°C. Amplification of the NRPS gene included an initial denaturation step at 2 min at 98°C, followed by 35 cycles of 1 min at 98°C, 1 min at 50°C, and 2 min at 72°C and a final extension step for 10 min at 72°C. For each experiment, we included two positive controls and two negative controls. For positive controls, we used DNA extracted from *Aspergillus flavus* (UBOCC-A-101081) and *Penicillium chrysogenum* (CBS 306.48), both of which are known to have PKS I, PKS III, NRPS, PKS-NRPS hybrid, and TPS genes in their genomes. For negative controls, we used DNA extracted from *Saccharomyces cerevisiae* (UBOCC-A-201006), as no PKS I, PKS III, NRPS, PKS-NRPS hybrid, or TPS gene has ever been detected in its genome (31). The other negative control was sterile water instead of DNA.

Nucleotide sequence accession numbers. All fungal isolates have been deposited in the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC) and can be found in GenBank under accession numbers KM222200 to KM222349 and KM232435 to KM232507.

RESULTS

Culturable fungi isolated. A total of 11 samples from 4 to 1,884 mbsf (Table 1) were tested for culturable fungi. Almost all samples (10 of 11, 91%) yielded fungal isolates (Fig. 1). Under the expected *in situ* hydrostatic pressures, 24 syringe cultures were processed per sample, with different conditions varying by temperature (1 temperature per sample according to the expected *in situ* temperature), salinity (0% and 3%), and nutrients (3 different media) with and without antibiotics being tested. Each combination of conditions was tested in duplicate. Under atmospheric pressure, 120 petri dishes were processed per sample, with different conditions varying by temperature (3 temperatures per sample according to the expected *in situ* temperature), salinity (0% and 3%), and nutrients (5 different media) with and without antibiotics being tested in duplicate. The final number of fungal isolates obtained was 183, and their distribution across the sediment core is shown in Table 1. The greatest number of isolates was obtained from sediments at 4 and 12 mbsf and from sediments at 25 to 37 mbsf. Only one isolate was obtained from the deepest layers, between 1,478 and 1,884 mbsf, the sedimentary rock (Fig. 1). Results were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) to assess the effect of depth on isolation abundance. The effect of depth was highly significant ($F = 3.48$, $P < 0.001$). The Shannon index, which is a well-known parameter used to express the diversity of communities, was calculated for each depth and corroborates these findings, showing that the sample from 34 mbsf produced the most diverse culture collection. Thus, sediment depth clearly influenced the isolation rate and confirms that culturable fungi are present primarily at specific depths along the core. Additionally, it was more difficult to obtain positive cultures of samples from deeper layers. Indeed, only one isolate was obtained from 1,884 mbsf, and no fungus was ever isolated from a sample from 1,478 mbsf. This strong statistical evidence for the uniqueness of communities at different depths supports the idea that our isolates were not contaminants.

Morphological characteristics allowed us to separate filamentous fungal forms from unicellular yeasts. Observations revealed branching hyphae and spores for filamentous fungi (124 isolates) and budding cells for yeasts (59 isolates). Eighty-six isolates were obtained on culture media amended with 3% sea salts, and 97

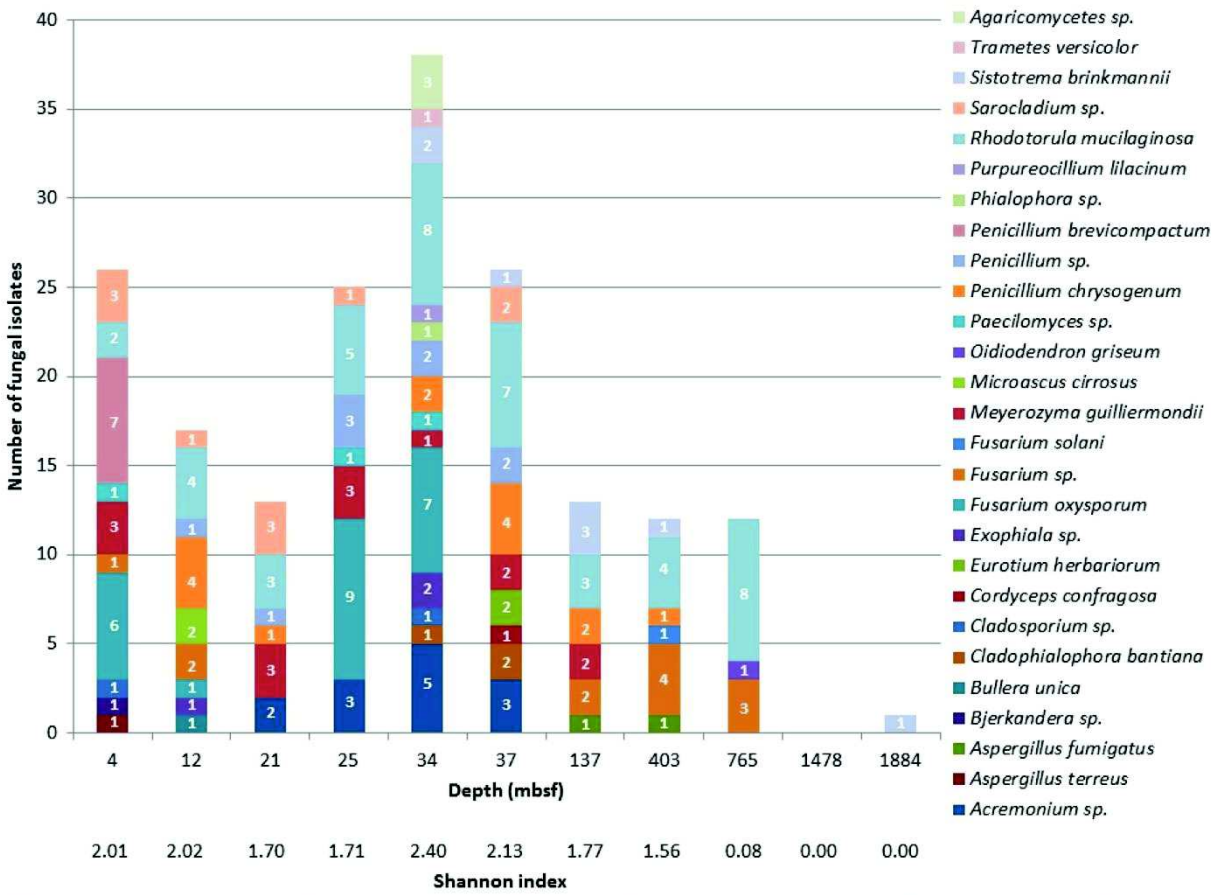


FIG 1 Species richness along the core. Shannon diversity indices allow the identification of the relative complexity of fungal communities at different depths.

were isolated on culture media without sea salts. Thirty-seven isolates were obtained under atmospheric pressure, and 146 were obtained after enrichment under hydrostatic pressure. Among the different conditions used to isolate deep-sea fungi, hydrostatic pressure appeared to be important for the retrieval of fungal isolates.

Clustering and phylogenetic diversity. As a dereplication strategy, the MSP-PCR fingerprinting method was performed. We used similarity clusters to generate two dendrograms, one for filamentous fungi and one for yeasts. Using this strategy, 57 clusters, 48 for filamentous fungi and 9 for yeasts, were established as shown in Fig. S1 and S2 in the supplemental material. The minor fingerprint variability found within MSP-PCR clusters was defined as intraspecific heterogeneity. Several representatives from each cluster were selected for identification using SSU, ITS, and partial LSU rRNA sequencing; 72 filamentous fungi and 40 yeast isolates, or about 60% of the whole culture collection, were sequenced. Sequence analysis validated the MSP-PCR parameters used (cutoff of 75%).

Filamentous fungi. On the basis of the gene encoding SSU rRNA, representatives from each cluster were taxonomically assigned using the BLASTn program (25), and phylogenetic analyses integrating the closest relatives in GenBank were performed. When sequences from our culture collection could not be identified using 18S rRNA genes, complementary genetic analyses were performed using ITS and partial 28S rRNA genes. Filamentous fungal isolates were distributed among the Ascomycota and Basidiomycota, with the Ascomycota representing more than 89% of our culture collection. On the basis of 18S rRNA, ITS, and 28S rRNA gene sequence analysis, isolates belonging to the Ascomycota were clustered into 15 genera (*Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Cordyceps*, *Eurotium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Microascus*, *Oidiodendron*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Purpureocillium*, and *Sarocladium*), isolates belonging to the Basidiomycota were clustered into 3 genera (*Bjerkandera*, *Sistotrema*, and *Trametes*), and 1 uncultured Agaricomycetes isolate was found (Fig. 2).

Yeasts. Phylogenetic analysis of the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene revealed that cultured yeasts were distributed among the ascomycetous genus *Meyerozyma* and basidiomycetous genera *Rhodotorula* and *Bullera*. With 45 isolates, members of the Basidiomycota phylum represented more than 76% of our yeast culture collection (Fig. 3).

Ecophysiological characterization. Laser nephelometry was used as a high-throughput screening method for the ecophysiological characterization of fungal isolates obtained from deep-

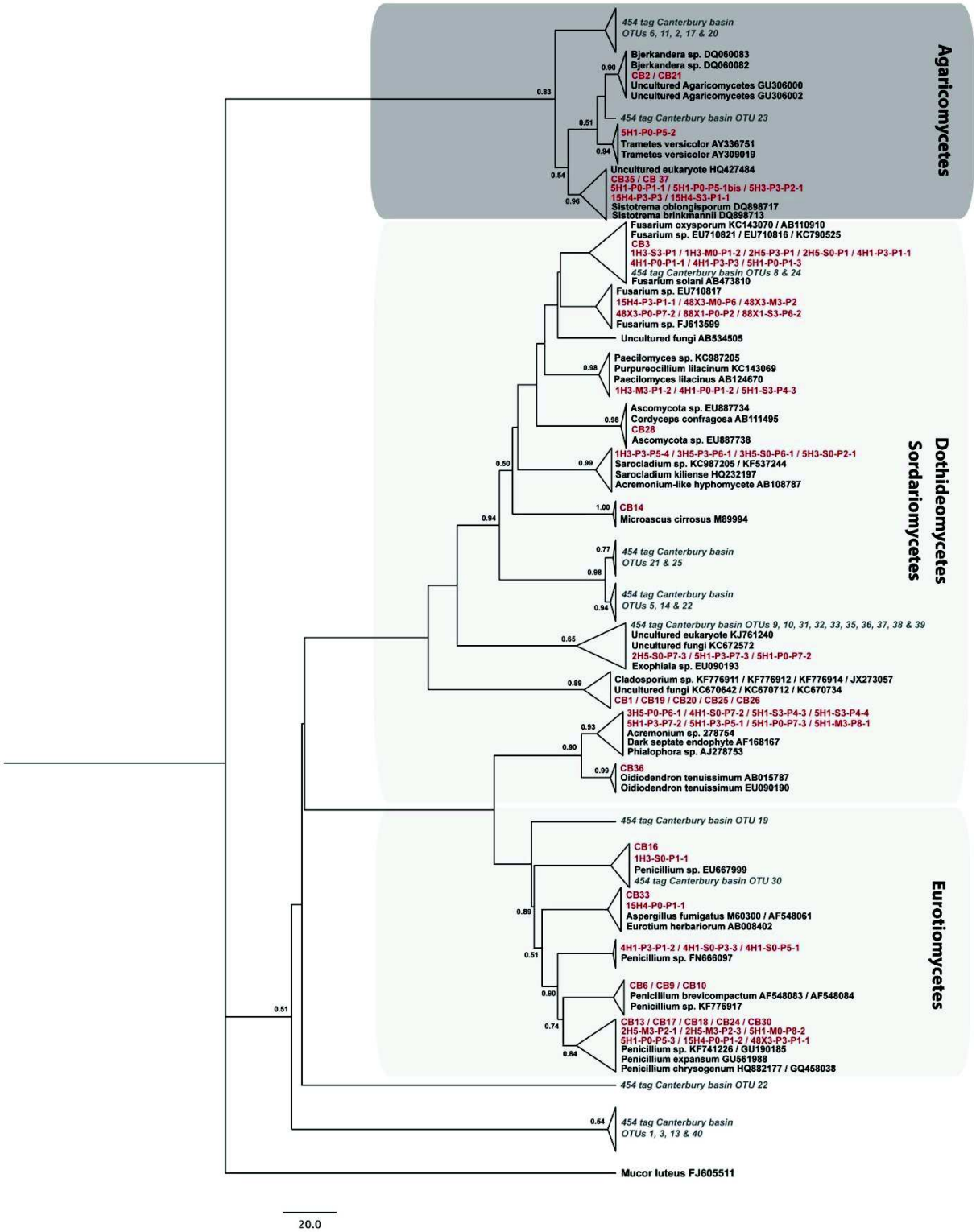


FIG 2 Phylogenetic tree of deep-sea fungal isolates (red) and 454 pyrotags (gray) obtained by analysis of SSU rRNA genes. The tree topology is based on maximum likelihood criteria and a ClustalW (version 1.83) alignment. Bootstrap values greater than 50% are shown at the nodes. Phylogenetic data of Ciobanu et al. (15) were integrated as 454 pyrotags. *Mucor luteus* (GenBank accession number FJ605511), which belongs to the phylum Glomeromycota, was used as an outgroup. Dark and light gray boxes, Basidiomycota and Ascomycota, respectively. OTU, operational taxonomic unit.

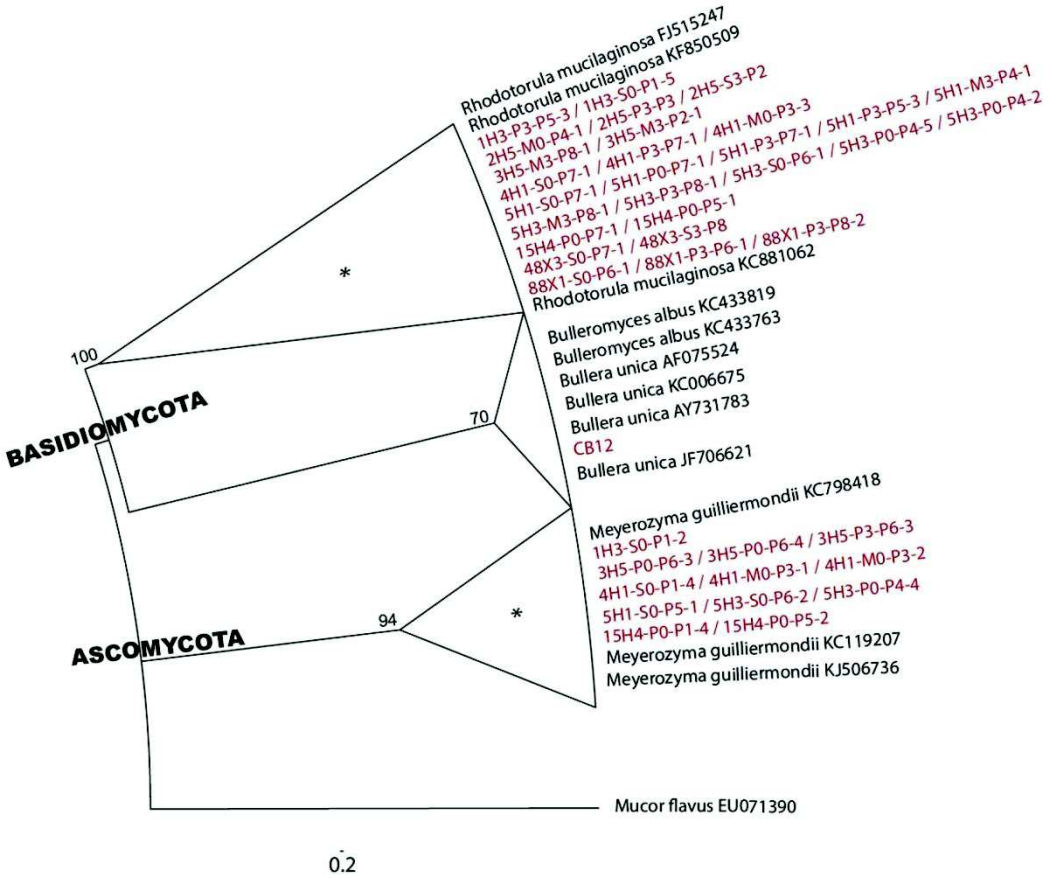


FIG 3 Phylogenetic tree of deep-sea yeast isolates (red) obtained by analysis of the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene. The topology is based on the maximum likelihood method and a ClustalW (version 1.83) alignment. Bootstrap values greater than 50% are shown at the nodes. *Mucor flavus* (GenBank accession number EU071390), which belongs to the phylum Zygomycota, was used as an outgroup. Clusters highlighted with an asterisk were also retrieved in molecular analysis data sets (15, 19).

subsurface sediments. Different filamentous fungal isolates that were from the same cluster (on the basis of the 18S rRNA, ITS, and 28S rRNA gene sequences) but that were obtained from different depths were selected: 5 *Fusarium* spp. from 4 to 765 mbsf, 4 *Penicillium* spp. from 12 to 403 mbsf, 3 *Paecilomyces* spp. from 4 to 34 mbsf, 2 *Exophiala* spp. from 12 to 34 mbsf, and 1 *Acremonium* sp. at 25 mbsf. Maximum specific growth rates (μ_{max}) were calculated for each isolate under all sets of conditions (4 temperatures and 4 salinities).

Most of the isolates were determined to be nonhalophiles (for which the maximal growth rate was observed in the absence of sea salts and decreasing growth rates were observed with increasing concentrations of sea salts in the media) or halotolerant (in which the isolates were able to grow in the absence as well as in the presence of sea salts) at 25°C and 30°C (Fig. 4). No useful information was obtained from incubations at 15°C, as most of the isolates were still in lag phase after 35 h. Only one *Fusarium* sp. collected at 4 mbsf was able to grow at 15°C in less than 35 h, and this organism displayed the same general trend at 15°C as it did at 25°C.

Isolates affiliated with *Fusarium* spp. were defined as nonhalophiles at 25 and 30°C, regardless of the depth from which the sample was obtained. Isolates affiliated with *Penicillium* spp. were defined as halotolerant at 25°C, with better growth being observed in the presence of 3% sea salts. Isolates affiliated with *Paecilomyces* spp., *Exophiala* spp., and *Acremonium* spp. displayed the same nonhalophilic pattern at 25°C. Interestingly, at 30°C, these isolates were halotolerant and even halophilic in the case of the deepest *Exophiala* spp. and *Acremonium* spp. This ecophysiological shift was clearly observed at 35°C, where all isolates selected for ecophysiological characterization were defined as halophiles or halotolerant, in the case of the *Paecilomyces* spp. from 25 mbsf. This shift toward halophily was much more significant for *Penicillium* spp. recovered from deeper sediments (137 and 403 mbsf).

Different yeasts from the same cluster but from different sampling depths were also selected for ecophysiological analysis. Using the same methodology, their maximum specific growth rates at one temperature (30°C) and 4 salinities were calculated. All isolates affiliated with *Rhodotorula* spp. ($n = 8$) were defined as nonhalophiles. Indeed, growth rates decreased when the sea salt concentration increased. Isolates affiliated with *Meyerozyma* spp. were much more diverse, on the basis of their responses. Isolates

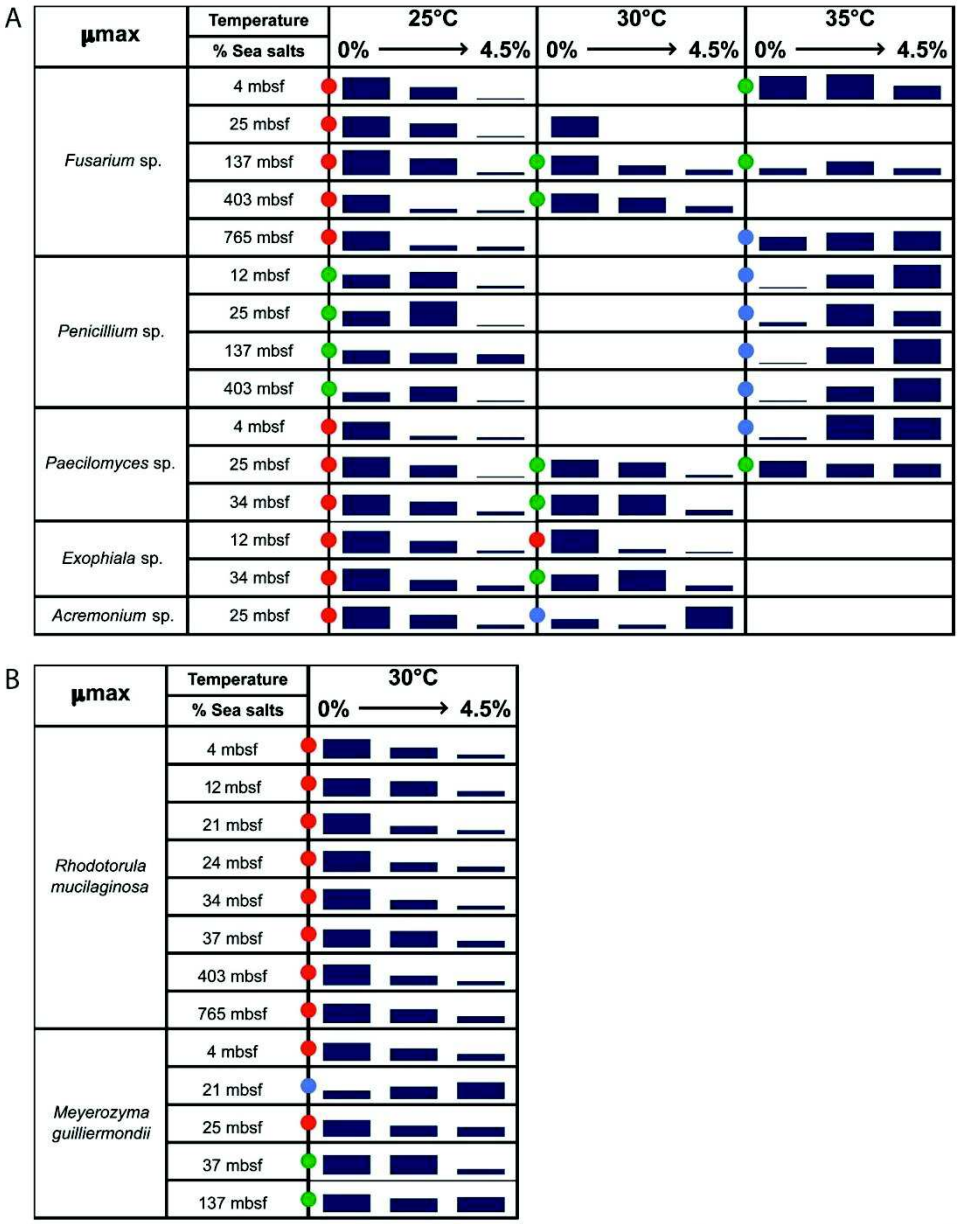


FIG 4 Physiological analysis of filamentous fungi (A) and yeast (B) isolates. Growth was measured at different temperatures (25°C, 30°C, and 35°C) and different sea salt concentrations (0, 1.5, 3, and 4.5%), and the general growth trend is shown as 3-part bars representing minimum, medium, and maximum growth. Blank cells indicate that the results were not determined. Red, green, and blue dots represent, respectively, nonhalophilic, halotolerant, and halophilic fungal isolates.

obtained from between 4 and 25 mbsf were nonhalophiles, isolates obtained from between 37 and 137 mbsf were halotolerant, and one isolate obtained from 21 mbsf was a halophile (no growth without sea salts).

The screening strategy allowed us to assess ecophysiological differences between isolates using temperature and salinity as important *in situ* parameters. Our results suggest the adaptation of some fungal isolates, possibly of terrestrial origin, to deep-subsurface conditions.

Presence of genes involved in the synthesis of bioactive compounds. All fungal isolates were investigated for genes coding for type I and type III PKSs, NRPSs, PKS-NRPS hybrids, and TPS (Fig. 5 and 6). Among the 124 filamentous fungi isolated, all harbored at least one of those genes for bioactive compounds: 6 iso-

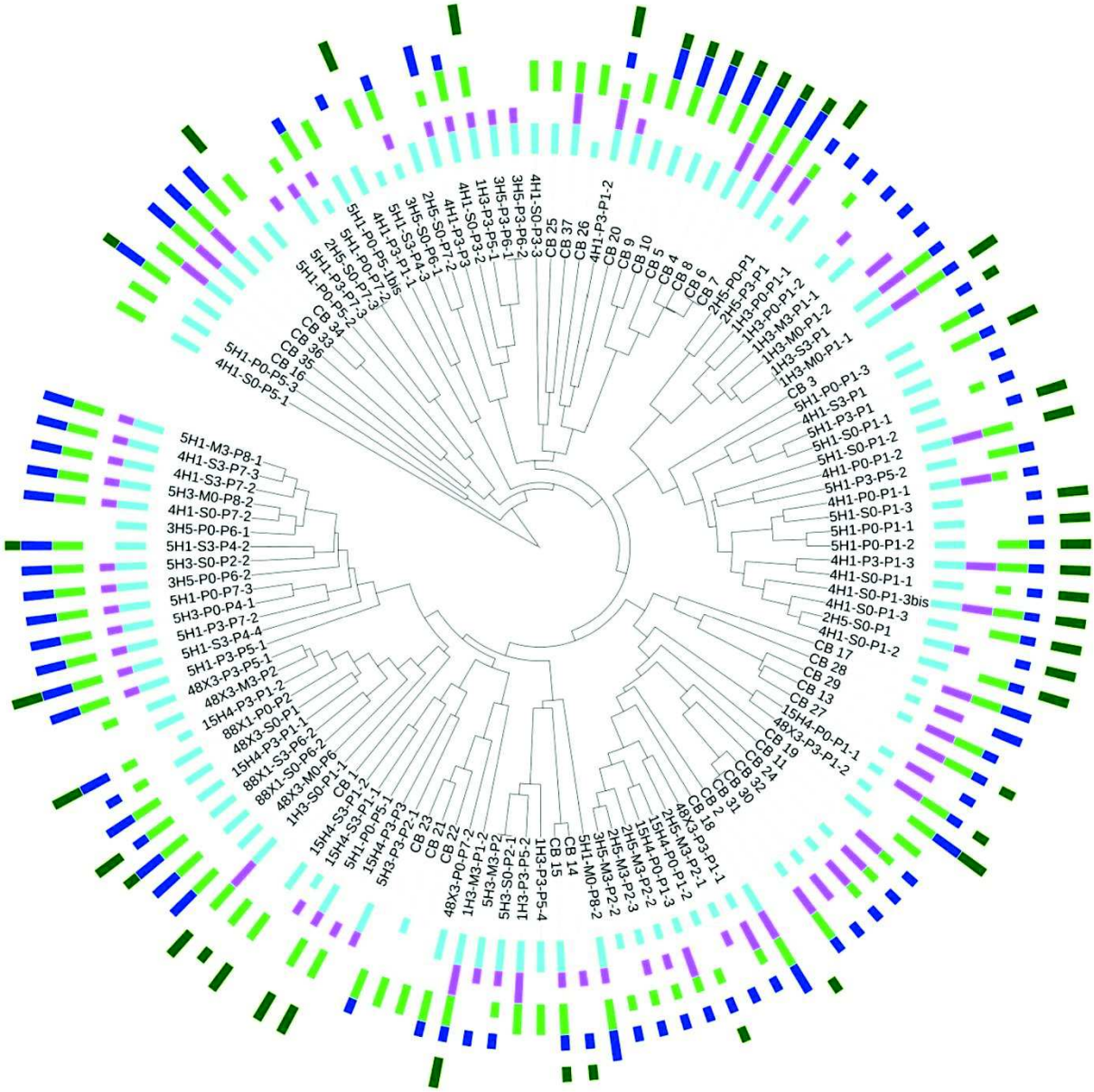


FIG 5 Presence/absence of genes encoding type I and III PKSs, NRPSs, PKS-NRPS hybrids, and TPS in filamentous fungi. Filamentous fungal MSP-PCR fingerprints coupled with type I PKS gene (light blue), type III PKS gene (pink), NRPS gene (light green), PKS-NRPS hybrid gene (dark blue), and TPS gene (dark green) occurrences are presented using an aligned multivalue bar chart (short bar, only one gene; long bar, several genes). This figure was generated using Interactive Tree of Life (version 2) (59).

lates (4.8%) had 1 gene, 23 (18.5%) had 2 genes, 30 (24.2%) had 3 genes, 53 (42.7%) had 4 genes, and 12 (9.7%) had all targeted genes (Fig. 5). Among the 59 yeasts isolated, 52 harbored at least one of those genes: 16 isolates (27.1%) had 1 gene, 7 (11.8%) had 2 genes, 12 (20.3%) had 3 genes, and 17 (28.8%) had 4 genes. Seven yeasts did not show evidence of having any of the targeted genes (Fig. 6). Contrary to the results from filamentous fungi, genes coding for PKS-NRPS hybrids were not detected in any of our yeast isolates. This result appears to be consistent with a previous report indicating the absence of PKS-NRPS hybrid genes in yeast genomes (31). Filamentous fungal isolates from deep-marine subsurface sediments appear to have a greater potential for synthesis of bioactive compounds than yeasts.

The relative occurrence of PKS I, PKS III, NRPS, PKS-NRPS hybrid, and TPS genes at depths ranging from 4 to 1,884 mbsf was analyzed (see Table S2 in the supplemental material). No trend

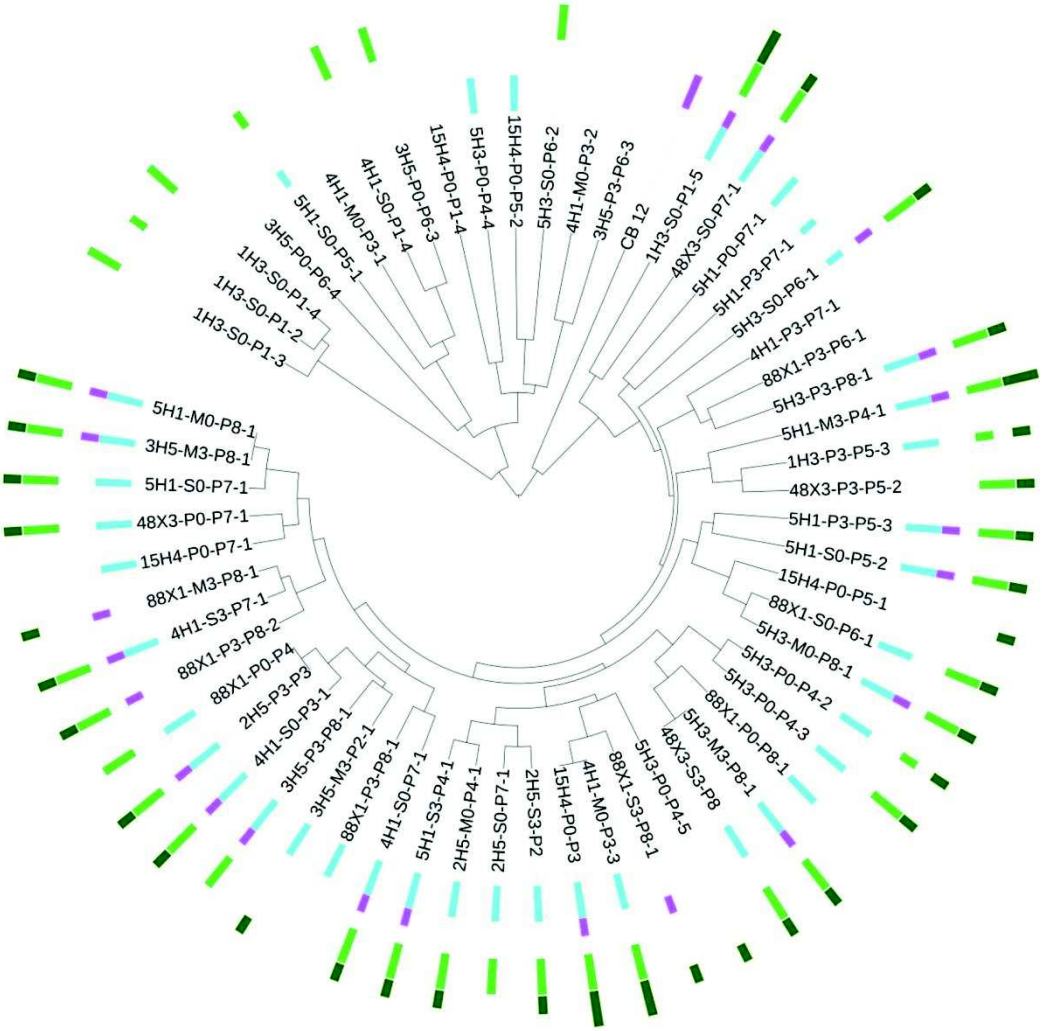


FIG 6 Presence/absence of genes coding type I and III PKSs, NRPSs, PKS-NRPS hybrids, and TPS in yeasts. Yeast MSP-PCR fingerprints coupled with type I PKS gene (light blue), type III PKS gene (pink), NRPS gene (light green), PKS-NRPS hybrid gene (dark blue), and TPS gene (dark green) occurrences are presented using an aligned multivalue bar chart (short bar, only one gene; long bar, several genes). This figure was generated using the Interactive Tree of Life (version 2) (59).

was evident for yeasts, but filamentous fungal isolates from deeper layers seemed to harbor fewer genes for bioactive compounds than isolates from shallower depths.

DISCUSSION

The aim of this study was to assess deep-marine subsurface sediments for the presence of culturable fungi and to determine their genetic potential for bioactive compound synthesis. We examined subsurface sediments collected from the Canterbury Basin at 11 depths ranging from 4 mbsf to 1,884 mbsf. The culture collection of filamentous fungi and yeasts obtained provides insights into the culturable fraction of *in situ* fungal communities colonizing the subseafloor at this site.

Controlling contamination. The potential for microbiological contamination of samples was monitored carefully during the IODP Leg 317 Expedition and during subsequent laboratory procedures (described above). The sampling procedures and contamination controls used during this expedition have been previously described (15). One of our samples (from 1,478 mbsf) did not produce cultivable fungi (Fig. 1), in spite of the fact that the same methods were applied for sampling and organism isolation by culture for samples from all depths. Although we cannot definitively rule out the possibility that one or more of our cultured isolates represents a contaminant, the fact that one of our samples did not produce cultivable fungi is further support for the absence of contamination during our sampling and culturing efforts. Our ANOVA analysis and Shannon diversity indices also clearly indicate that the distribution of our isolates was dependent on the sampling depth. This strongly supports the idea that the recovered fungi were not contaminants. The high rate of recovery of fungal

isolates using enrichments under elevated hydrostatic pressure conditions further indicates that these fungi are able to grow under *in situ* pressure and suggests that our established culture collection consists of indigenous taxa.

Distribution pattern of fungal communities. The phylogenetic diversity of fungi revealed in this study is relatively low compared to that in well-characterized organic matter-rich terrestrial or marine habitats (i.e., soils, plants, mangroves, etc.). Despite that fact, there was a greater diversity from the upper sediment layers down to 37 mbsf, with 25 different species representing more than 92% of the whole diversity within our fungal culture collection being recovered. In samples from greater depths from 137 to 1,884 mbsf, only 8 different species, representing about 30% of the recovered diversity, were observed in our culture collection (Fig. 1). This could be explained by a reduction in accessible organic matter with depth. Indeed, the organic matter quality changed from relatively labile material in shallow sediments to more stable protokerogen at greater sediment depths (15). Among the 27 species recovered in our cultures, some were isolated from a unique depth and several species were shared between 2 or more depths. The highest rate of occurrence of a species along the core was reported for *Rhodotorula mucilaginosa*, isolated at 9 depths ranging from 4 to 765 mbsf. A maximal overlap between 2 depths was observed for samples from 34 and 37 mbsf, with 7 shared species, i.e., an *Acremonium* sp., *Cladophialophora bantiana*, *Penicillium chrysogenum*, a *Penicillium* sp., *Sistotrema brinkmannii*, and the yeasts *Meyerozyma guilliermondii* and *Rhodotorula mucilaginosa*. Interestingly, a *Phialophora* sp., *Purpureocillium lilacinum*, *Trametes versicolor*, and some species of the Agaricomycetes were isolated only from the sample from 34 mbsf and seemed to be depth dependent. Beyond 765 mbsf, the diversity within our culture collection decreased considerably, with only 4 different species being recovered, including isolates belonging to the *Fusarium* genus, one isolate identified as *Oidiodendron griseum* that was isolated only from 765 mbsf, and the red yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. One isolate, *Sistotrema brinkmannii*, was obtained from 1,884 mbsf, and it was also retrieved from samples recovered at 34 and 403 mbsf.

Diversity of fungal communities. The Ascomycota dominated our filamentous fungal culture collection, whereas the Basidiomycota dominated our yeast collection. This result appears to be consistent with the findings of another phylogenetic analysis of culturable fungi from deep-sea sediments of the Central Indian Basin (32). In our study, among the yeasts, *Rhodotorula mucilaginosa* was the most abundant species isolated from samples from depths ranging from 4 to 765 mbsf. The red yeast *Rhodotorula mucilaginosa* is widely distributed and has already been isolated from deep-sea sediments and basaltic crust (32–34). *Bullera unica*, isolated from 12 mbsf in our study, was the only isolate belonging to the Tremellomycetes. Interestingly, *Bullera unica* was previously isolated from New Zealand seawater (35). *Meyerozyma guilliermondii* was the only ascomycetous yeast in our culture collection isolated from 4 to 137 mbsf. Culturable representatives of this opportunistic pathogen have been detected in marine environments, including hydrothermal vents (2) and deep-sea volcanoes (36), and from Canterbury Basin sediments by culture-independent methods (19). Yeasts were previously suggested to be the dominant marine fungal forms on the basis of fungus-specific clone libraries from marine water column and sediment environments (37). Here, yeasts appeared to be able to adapt to and colonize the deep subseafloor, but our results suggest that filamentous fungi are more diverse in marine habitats than previously suggested (37). In agreement with the findings of molecular studies, the classes Eurotiomycetes and Sordariomycetes are the fungal taxa most frequently detected from deep-sea environments (14).

Among the Sordariomycetes, *Fusarium oxysporum* is the most abundant taxon. *F. oxysporum* has already been shown to grow under marine conditions (38) and was described to be a denitrifying fungus in marine sediments (39). The other well-represented members of the Sordariomycetes were (i) *Fusarium solani*, recently detected from Canterbury Basin sediments using culture-independent methods (19), (ii) representatives of *Acremonium* spp. already reported from several marine environments, including deep-sea sediments (10, 32, 38), (iii) *Sarocladium* spp. previously isolated from brine sediments (40), (iv) representatives of *Paecilomyces* spp. formerly isolated from deep-sea coral (41) and from the first centimeter of coastal marine sediments off Goa, India (39), and (v) *Microascus* spp. that may be opportunistic pathogens of deep-sea animals, such as corals (42). *Phialophora* spp., *Purpureocillium lilacinum*, *Cordyceps confragosa*, and *Oidiodendron griseum* were less represented in our culture collection.

Among the Eurotiomycetes, *Penicillium* was the most frequently isolated genus. Molecular signatures of this genus were previously found in the Canterbury Basin deep sediments (19). Fourteen fungal isolates of *Penicillium chrysogenum* were obtained. This species was described to be the dominant phylotype among the Ascomycota in a DNA-based clone library prepared from deep-sea methane cold-seep sediments (9). The other well-represented Eurotiomycetes were (i) *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*, known to be able to germinate under hydrostatic pressure (5), and (ii) *Eurotium herbariorum*, previously isolated from other extreme environments, including hypersaline waters of solar salterns (43), the hypersaline Dead Sea (44), hydrothermal sediments (2), and deep-sea sediments (11).

The class Dothideomycetes was represented in our culture collection by 3 isolates belonging to the genus *Cladosporium*. Among the Basidiomycota, Agaricomycetes were the most frequently recovered, with isolates being affiliated with *Bjerkandera* spp., *Sistotrema brinkmannii*, *Trametes versicolor*, and uncultured Agaricomycetes. Although the cultivable representatives of Agaricomycetes appear to be rare in marine environments (36), the molecular signatures of Agaricomycetes have been detected in deep-sea environments (3, 9, 11, 45) and Agaricomycetes have been identified to be the dominant fungal class in mangrove habitats (46).

All of the fungal taxa isolated from Canterbury Basin are well-known in terrestrial environments, raising intriguing ecological questions regarding the abilities of terrestrial fungi to adapt to deep-subsurface conditions that include confinement, pressure, temperature, access to only refractory organic matter, etc. The fungal taxa detected here using culture-dependent methods can be compared with fungal 454 pyrotags previously obtained from the same sediment core (15, 19). The two methods provided different pictures of diversity. Only fungal signatures and isolates belonging to the genera *Exophiala*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, and *Meyerozyma* were detected by both culture-independent and culture-dependent methods. Culture-based and molecular diversity survey approaches appear here to provide two complementary sources of information. The fact that some isolates have not been detected by molecular methods could be ex-

plained by several reasons, including the fact that fungal spores are lysis resistant, bias in universal primers, and the use of a limited (or insufficient) sequencing depth. Efficient nucleic acid extraction from vegetative spores may be an important factor to consider. Indeed, previous results obtained by molecular analysis based on RNA suggest that few persistent subsurface fungal taxa are able to colonize the deep subsurface of the Canterbury Basin (19). Our results strongly support the importance of applying a polyphasic approach using culture-dependent and culture-independent methods, which together generate a general and comprehensive view of deep-subsurface fungal diversity. One of the main advantages of handling fungal cultures is that the specific adaptations that they use to cope with different stresses can be assessed. Ecophysiological analyses provide concrete and relevant data that may be used to estimate their adaptations and understand the role of fungal communities in the deep subsurface.

Adaptation. In our study, we decided to examine the effect of elevated hydrostatic pressure, since this is likely to be one of the most significant physical challenges for microbiota living in the abyss (47). We specifically examined whether cultivation under increased pressure enhanced culture efficiency. We also performed ecophysiological analyses to examine the impacts of temperature and salinity.

Hydrostatic pressure enhanced the growth of a number of fungal isolates in our culture collection. About 80% of our isolates were obtained with a preliminary enrichment under elevated hydrostatic pressure. Thus, the elevated hydrostatic and lithostatic pressures in deep sediments do not curb the germination and growth of all fungi in the deep subseafloor. Previous studies have demonstrated efficient culturing of filamentous fungi and yeasts under elevated hydrostatic pressure (5, 11, 32, 48, 49). Although no true piezophilic fungi have been reported to date, some fungi are able to develop mechanisms of adaptation. For example, even the well-known yeast *Saccharomyces cerevisiae* is able to modify its membrane composition to tolerate high hydrostatic pressure (50), revealing the potential of fungi, including terrestrial ones, to adapt to deep-sea conditions.

Temperature and salinity are two additional significant parameters used to examine the adaptation of fungi to deep-subsurface conditions. Indeed, the temperature increases along the sediment core at a rate of 30 to 50°C per kilometer. The temperature at the bottom of the core hole (at 1,922 mbsf) was estimated to be in the range of from 60 to 100°C (15). Salinities in sediment samples near the seafloor are slightly lower than the salinity of normal seawater at 3.3%, and salinity rapidly declines to 3.0% at 28 mbsf and remains relatively constant at 2.9 to 3.1% over the rest of the core section analyzed to 1,400 mbsf (18). Our ecophysiological analysis revealed shifts along the core. Most of the filamentous fungal isolates analyzed shifted from nonhalophilic to halotolerant when incubation temperatures increased from 25 to 35°C. Only the deepest *Fusarium* and *Penicillium* isolates demonstrated a complete shift to halophily when the temperature increased. Such a shift from terrestrially adapted to marine-adapted lifestyles along the core may indicate a transition from shallow layers, where fungi are not specifically adapted but are able to survive, to deeper layers, where fungi are more adapted to higher temperatures and higher salinities. Ecophysiological studies on deep-subseafloor prokaryotes are scarce. Biddle et al. (51) used a low-salt medium (R2A) to culture bacterial strains from deep sediments of the Peru Margin and obtained colonies only from shallow depth layers. This may indicate the occurrence of nonmarine strains in the first layers and endemic or adapted strains at deeper layers, even if the possibility of a decrease in isolation success with depth cannot be ruled out. However, another study described some generalist subseafloor sediment bacteria to be more adapted to different environmental conditions than their surface counterparts (52). Such results strongly support our conclusions.

Fungi detected by culture-based and molecular approaches in the deep-subseafloor biosphere may range from those that are buried alive and are simply dormant to those that adapt to subsurface conditions. The same trend is observed for bacterial endospores that are as abundant as vegetative prokaryotic cells in the deep biosphere (53). Recently, Jørgensen (54) proposed that most deep-subseafloor microbial cells are on physiological standby and that only a few cells may be active at any given time. The metabolic activities of long-buried microbes could be activated due to tectonic activity or if subsurface fluid flows deliver an infusion of new electron donors and acceptors. This hypothesis fits well with our finding that some fungi may possess a range of physiological adaptations for handling different physical and chemical stressors, while others might be microbial zombies (55). Complementary genomic, transcriptomic, and proteomic analyses are needed to better understand the metabolic capabilities of deep-subseafloor fungi.

Biotechnological potential of deep-sediment fungal isolates. Many marine microorganisms have been screened for novel bioactive compounds (56, 57), and some research has been specifically dedicated to marine fungal secondary metabolites (17). In this study, we examined the secondary metabolite synthesis potential of deep-subsurface fungal isolates under the assumption that deep-sea sediments represent an untapped reservoir of bio- and chemodiversity.

Almost all fungal isolates (96%) had at least one gene involved in a secondary metabolite biosynthesis pathway. This clearly indicates their genetic potential for the synthesis of numerous secondary metabolites. Many of these genes might be responsible for the biosynthesis of natural compounds that may help these fungi to compete with other microorganisms for available substrates (28). Isolates affiliated with the genera *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Rhodotorula* have genetic differences depending on sampling depth. Taxa from shallow depths (from 4 to 25 mbsf) harbored type III PKS genes, while taxa from deeper layers (from 25 to 700 mbsf) did not. These subseafloor fungi may have lost or gained some of these genes in order to adapt to their environment. Indeed, as previously demonstrated, secondary metabolism gene clusters evolve rapidly through multiple rearrangements, duplications, or losses (58). It may confirm our conclusion that some of these isolates exhibit evidence of ecophysiological adaptation. More detailed genome-based and/or phylogenetic analyses should be performed to determine their evolutionary origin.

Our results (i) demonstrate our success in isolating some representatives of fungal taxa occurring within deep-subseafloor communities, (ii) give insights into their adaptation to subsurface *in situ* conditions, with fungi from deeper layers appearing to be more adapted to deep-subseafloor conditions, and (iii) illustrate the potential for their synthesis of genes for secondary metabolites of possible biotechnological importance. While new molecular methods have recently allowed the genetic capacities of uncultured microorganisms to be studied using single-cell genomics and metatranscriptomics, many important physiological features

remain culture dependent. Our established culture collection offers the possibility for future applied biotechnological investigations specifically dedicated to the expression of selected genes of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study received grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Paris, France), Région Bretagne, Rennes, France, and EU project MaCuMBA (Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving Their Biotechnological Applications, FP7, grant agreement 311975, Brussels, Belgium).

We thank Virginia Edgcomb and Maria G. Pachiadaki for proofreading of the manuscript.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. **Gadanho M, Sampaio JP.** 2005. Occurrence and diversity of yeasts in the mid-Atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. Microb Ecol **50:**408–417. http://dx.doi.org/10.1007/s00248-005-0195-y.
2. **Burgaud G, Le Calvez T, Arzur D, Vandenkoornhuyse P, Barbier G.** 2009. Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. Environ Microbiol **11:**1588–1600. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01886.x.
3. **Le Calvez T, Burgaud G, Mahé S, Barbier G, Vandenkoornhuyse P.** 2009. Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. Appl Environ Microbiol **75:**6415–6421. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00653-09.
4. **Burgaud G, Arzur D, Durand L, Cambon-Bonavita MA, Barbier G.** 2010. Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. FEMS Microbiol Ecol **73:**121–133. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00881.x.
5. **Damare S, Raghukumar C, Raghukumar S.** 2006. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap **53:**14–27. http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2005.09.005.
6. **Lai X, Cao L, Tan H, Fang S, Huang Y, Zhou S.** 2007. Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea. ISME J **1:**756–762. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2007.51.
7. **Nagano Y, Nagahama T, Hatada Y, Nunoura T, Takami H, Miyazaki J, Takai K, Horikoshi K.** 2010. Fungal diversity in deep-sea sediments—the presence of novel fungal groups. Fungal Ecol **3:**316–325. http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2010.01.002.
8. **Edgcomb VP, Beaudoin D, Gast R, Biddle JF, Teske A.** 2011. Marine subsurface eukaryotes: the fungal majority. Environ Microbiol **13:**172–183. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02318.x.
9. **Nagahama T, Takahashi E, Nagano Y, Abdel-Wahab MA, Miyazaki M.** 2011. Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane coldseep sediments. Environ Microbiol **13:**2359–2370. http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02507.x.
10. **Mouton M, Postma F, Wilsenach J, Botha A.** 2012. Diversity and characterization of culturable fungi from marine sediment collected from St. Helena Bay, South Africa. Microb Ecol **64:**311–319. http://dx.doi.org/10.1007/s00248-012-0035-9.
11. **Singh P, Raghukumar C, Meena RM, Verma P, Shouche Y.** 2012. Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. Fungal Ecol **5:**543–553. http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2012.01.001.
12. **Orsi W, Biddle JF, Edgcomb V.** 2013. Deep sequencing of subseafloor eukaryotic rRNA reveals active fungi across marine subsurface provinces. PLoS One **8:**e56335. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056335.
13. **Orsi WD, Edgcomb VP, Christman GD, Biddle JF.** 2013. Gene expression in the deep biosphere. Nature **499:**205–208. http://dx.doi.org/10.1038/nature12230.
14. **Nagano Y, Nagahama T.** 2012. Fungal diversity in deep-sea extreme environments. Fungal Ecol **5:**463–471. http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2012.01.004.
15. **Ciobanu MC, Burgaud G, Dufresne A, Breuker A, Rédou V, BenMaamar S, Gaboyer F, Vandenabeele-Trambouze O, Lipp JS, Schippers A, Vandenkoornhuyse P, Barbier G, Jebbar M, Godfroy A, Alain K.** 2014. Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. ISME J **8:**1370–1380. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.250.
16. **Teske A, Sørensen KB.** 2008. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? ISME J **2:**3–18. http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2007.90.
17. **Rateb ME, Ebel R.** 2011. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. Nat Prod Rep **28:**290–344. http://dx.doi.org/10.1039/c0np00061b.
18. **Fulthorpe CS, Hoyanagi K, Blum P, the Expedition 317 Scientists.** 2011. Proceedings of the Integrated Ocean Drilling Program, vol 317. Integrated Ocean Drilling Program Management International, Inc, Tokyo, Japan. http://dx.doi.org/10.2204/iodp.proc.317.104.2011.
19. **Rédou V, Ciobanu MC, Pachiadaki MG, Edgcomb V, Alain K, Barbier G, Burgaud G.** 2014. In-depth analyses of deep subsurface sediments using 454-pyrosequencing reveals a reservoir of buried fungal communities at record-breaking depths. FEMS Microbiol Ecol **90:**908–921. http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12447.
20. **Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R.** 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol **31:**2274–2280.
21. **Sampaio JP, Gadanho M, Santos S, Duarte FL, Pais C, Fonseca A, Fell JW.** 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. Int J Syst Evol Microbiol **51:**687–697.
22. **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p 315–322. *In* PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Orlando, FL.
23. **Vilgalys R, Hester M.** 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J Bacteriol **172:**4238–4246.
24. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol **28:**2731–2739. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121.
25. **Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D.** 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol **215:**403–410. http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
26. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res **22:**4673–4680. http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673.
27. **Joubert A, Calmes B, Berruyer R, Pihet M, Bouchara JP, Simoneau P, Guillemette T.** 2010. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. Biotechniques **48:**399–404. http://dx.doi.org/10.2144/000113399.
28. **Amnuaykanjanasin A, Punya J, Paungmoung P, Rungrod A, Tachaleat A, Pongpattanakitshote S, Cheevadhanarak S, Tanticharoen M.** 2005. Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. FEMS Microbiol Lett **194:**125–136. http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.038.
29. **Slightom JL, Metzger BP, Luu HT, Elhammer AP.** 2009. Cloning and molecular characterization of the gene encoding the aureobasidin A biosynthesis complex in *Aureobasidium pullulans* BP-1938. Gene **43:**67–79. http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.011.
30. **Kawaide H, Imai R, Sassa T, Kamiya Y.** 1997. Ent-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. J Biol Chem **272:**21706–21712.
31. **Khaldi N, Seifuddin FT, Turner G, Haft D, Nierman WC, Wolfe KH, Fedorova ND.** 2010. SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. Fungal Genet Biol **47:**736–741. http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.003.
32. **Singh P, Raghukumar C, Verma P, Shouche Y.** 2010. Phylogenetic diversity of culturable fungi from the deep-sea sediments of the Central Indian Basin and their growth characteristics. Fungal Divers **40:**89–102. http://dx.doi.org/10.1007/s13225-009-0009-5.
33. **Nagahama T, Hamamoto M, Nakase T, Takami H, Horikoshi K.** 2001. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. Antonie Van Leeuwenhoek **80:**101–110. http://dx.doi.org/10.1023/A:1012270503751.
34. **Smith A, Popa R, Fisk M, Nielsen M, Wheat CG, Jannasch HW, Fisher AT, Becker K, Sievert SM, Flores G.** 2011. *In situ* enrichment of ocean

crust microbes on igneous minerals and glasses using an osmotic flow-through device. Geochem Geophys Geosyst **12**:Q06007. http://dx.doi.org/10.1029/2010GC003424.

35. **Francis M.** 2013. A preliminary investigation of marine yeast biodiversity in New Zealand waters. M.S. thesis. Victoria University of Wellington, Wellington, New Zealand.
36. **Connell L, Barrett A, Templeton A, Staudigel H.** 2009. Fungal diversity associated with an active deep sea volcano: Vailulu'u Seamount, Samoa. Geomicrobiol J **26**:597–605. http://dx.doi.org/10.1080/01490450903316174.
37. **Bass D, Howe A, Brown N, Barton H, Demidova M, Michelle H, Li L, Sanders H, Watkinson SC, Willcock S, Richards TA.** 2007. Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. Proc Biol Sci **274**:3069–3077. http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.1067.
38. **Burgaud G, Woehlke S, Rédou V, Orsi W, Beaudoin D, Barbier G, Biddle FJ, Edgcomb VP.** 2013. Deciphering the presence and activity of fungal communities in marine sediments using a model estuarine system. Aquat Microb Ecol **70**:45–62. http://dx.doi.org/10.3354/ame01638.
39. **Cathrine SJ, Raghukumar C.** 2009. Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. Mycol Res **113**:100–109. http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2008.08.009.
40. **Wang Y, Zhang WP, Cao HL, Shek CS, Tian RM, Wong YH, Batang Z, Al-Suwailem A, Qian PY.** 2014. Diversity and distribution of eukaryotic microbes in and around a brine pool adjacent to the Thuwal cold seeps in the Red Sea. Front Microbiol **5**:37. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00037.
41. **Galkiewicz JP, Stellick SH, Gray MA, Kellogg CA.** 2012. Cultured fungal associates from the deep-sea coral *Lophelia pertusa*. Deep Sea Res Part I Oceanogr Res Pap **67**:12–20. http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2012.05.001.
42. **Höller U, Wright AD, Matthee GF, Konig GM, Draeger S, Aust HJ, Schulz B.** 2000. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. Mycol Res **104**:1354–1365. http://dx.doi.org/10.1017/S0953756200003117.
43. **Butinar L, Zalar P, Frisvad JC, Gunde-Cimerman N.** 2005. The genus Eurotium—members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. FEMS Microbiol Ecol **51**:155–166. http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.002.
44. **Kis-Papo T, Grishkan I, Oren A, Wasser SP, Nevo E.** 2001. Spatiotemporal diversity of filamentous fungi in the hypersaline Dead Sea. Mycol Res **105**:749–756. http://dx.doi.org/10.1017/S0953756201004129.
45. **Xu W, Pang KL, Luo ZH.** 2014. High fungal diversity and abundance recovered in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean. Microb Ecol **68**:688–698. http://dx.doi.org/10.1007/s00248-014-0448-8.
46. **Arfi Y, Marchand C, Wartel M, Record E.** 2012. Fungal diversity in anoxic-sulfidic sediments in a mangrove soil. Fungal Ecol **5**:282–285. http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2011.09.004.
47. **Lauro FM, Bartlett DH.** 2008. Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats. Extremophiles **12**:15–25. http://dx.doi.org/10.1007/s00792-006-0059-5.
48. **Lorenz R, Molitoris HP.** 1997. Cultivation of fungi under simulated deep-sea conditions. Mycol Res **101**:1355–1365. http://dx.doi.org/10.1017/S095375629700405X.
49. **Raghukumar C, Raghukumar S.** 1998. Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. Aquat Microb Ecol **15**:153–163. http://dx.doi.org/10.3354/ame015153.
50. **Simonato F, Campanaro S, Lauro FM, Vezzi A, D'Angelo M, Vitulo N, Giorgio V, Bartlett DH.** 2006. Piezophilic adaptation: a genomic point of view. J Biotechnol **126**:11–25. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.038.
51. **Biddle JF, House CH, Brenchley JE.** 2005. Microbial stratification in deeply buried marine sediment reflects changes in sulfate/methane profiles. Geobiology **3**:287–295. http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-4669.2006.00062.x.
52. **Sass H, Parkes RJ.** 2011. Sub-seafloor sediments: an extreme but globally significant prokaryotic habitat (taxonomy, diversity, ecology), p 1016–1036. *In* Horikoshi K, Antranikian G, Bull AT, Robb FT, Stetter KO (ed), Extremophiles handbook. Springer, Tokyo, Japan.
53. **Lomstein BA, Langerhuus AT, D'Hondt S, Jørgensen BB, Spivack AJ.** 2012. Endospore abundance, microbial growth and necromass turnover in deep sub-seafloor sediment. Nature **484**:101–104. http://dx.doi.org/10.1038/nature10905.
54. **Jørgensen BB.** 2011. Deep subseafloor microbial cells on physiological standby. Proc Natl Acad Sci U S A **108**:18193–18194. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1115421108.
55. **Colwell FS, D'Hondt S.** 2013. Nature and extent of the deep biosphere. Rev Mineral Geochem **75**:547–574. http://dx.doi.org/10.2138/rmg.2013.75.17.
56. **Weber T.** 2014. In silico tools for the analysis of antibiotic biosynthetic pathways. Int J Med Microbiol **304**:230–235. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.02.001.
57. **Keller NP, Turner G, Bennett JW.** 2005. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. Nat Rev Microbiol **3**:937–947. http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1286.
58. **Khaldi N, Collemare J, Lebrun MH, Wolfe KH.** 2008. Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. Genome Biol **9**:R18. http://dx.doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r18.
59. **Letunic I, Bork P.** 2011. Interactive Tree of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. Nucleic Acids Res **23**:127–128. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr201.

Appendixes

Fig. S1. MSP-PCR profiles obtained for filamentous fungi. Representatives of clusters selected for sequencing were identified using the * symbol.

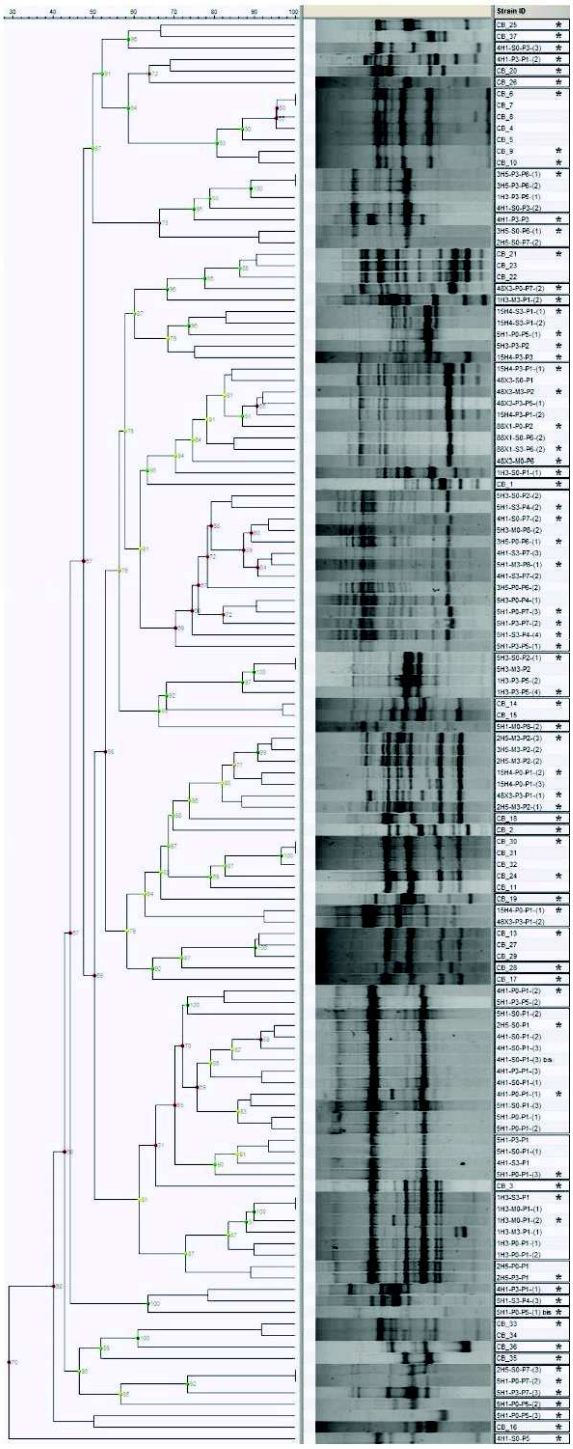


Fig. S2. MSP-PCR profiles obtained for the yeasts. Representatives of clusters selected for sequencing were identified using the * symbol.

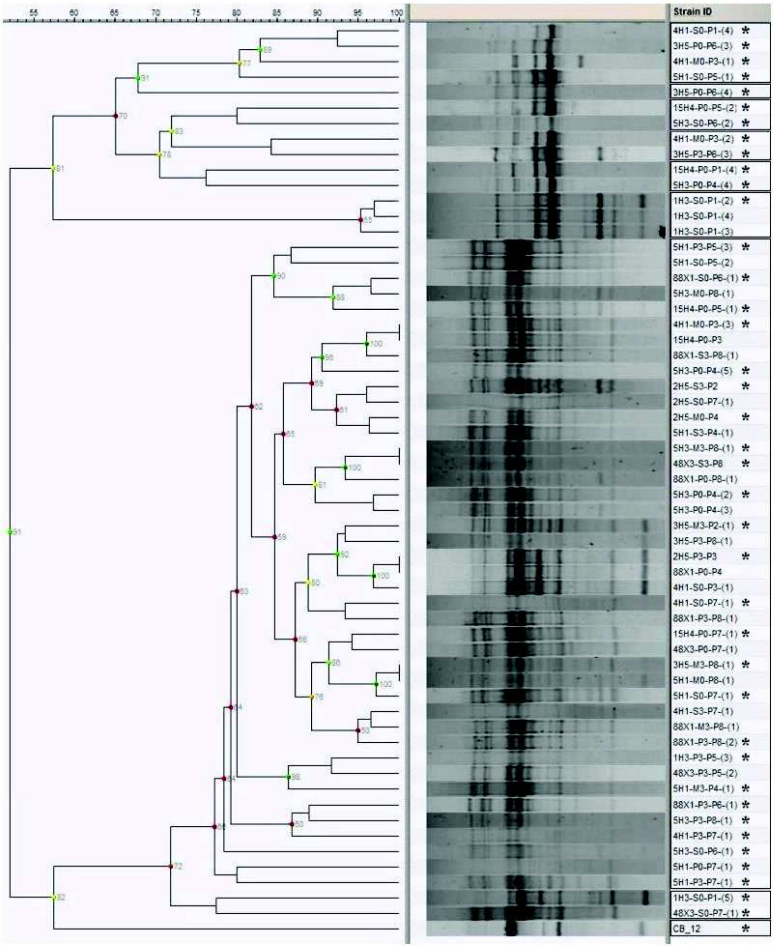


Table S1. Fungal isolates identification, their accession numbers (A) and their phylogenetic nearest taxon (B).

(A)

UBOCC number	Genus	Species	Sample ID	Accession numbers		
				18S	ITS	26S
UBOCC-A-114001	*Fusarium*	*oxysporum*	1H3-P0-P1-1			
UBOCC-A-114002	*Fusarium*	*oxysporum*	1H3-P0-P1-2			
UBOCC-A-114003	*Aspergillus*	*terreus*	1H3-S0-P1-1	KM222201	KM232439	
UBOCC-A-214003	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	1H3-S0-P1-2	KM222231		KM222311
UBOCC-A-214004	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	1H3-S0-P1-3			
UBOCC-A-214005	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	1H3-S0-P1-4			
UBOCC-A-214006	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	1H3-S0-P1-5	KM222232		KM222320
UBOCC-A-114004	*Fusarium*	*oxysporum*	1H3-S3-P1	KM222233	KM232440	
UBOCC-A-114005	*Fusarium*	*oxysporum*	1H3-M0-P1-1			
UBOCC-A-114006	*Fusarium*	*oxysporum*	1H3-M0-P1-2	KM222200	KM232436	
UBOCC-A-114007	*Fusarium*	*oxysporum*	1H3-M3-P1-1			
UBOCC-A-114008	*Paecilomyces*	sp.	1H3-M3-P1-2	KM222228	KM232437	
UBOCC-A-114009	*Fusarium*	sp.	2H5-P0-P1			
UBOCC-A-114010	*Fusarium*	sp.	2H5-P3-P1	KM222202	KM232443	
UBOCC-A-114011	*Fusarium*	*oxysporum*	2H5-S0-P1	KM222238	KM232444	
UBOCC-A-114012	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-P0-P1-1	KM222252	KM232449	
UBOCC-A-114013	*Paecilomyces*	sp.	4H1-P0-P1-2	KM222253	KM232450	
UBOCC-A-114014	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-P3-P1-1	KM222203	KM232451	
UBOCC-A-114015	*Penicillium*	sp.	4H1-P3-P1-2	KM222254	KM232452	
UBOCC-A-114016	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-P3-P1-3			
UBOCC-A-114017	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-S0-P1-1			
UBOCC-A-114018	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-S0-P1-2			
UBOCC-A-114019	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-S0-P1-3			
UBOCC-A-114020	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-S0-P1-3BIS			
UBOCC-A-214007	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	4H1-S0-P1-4	KM222257		KM222321
UBOCC-A-114021	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-S3-P1			
UBOCC-A-114022	*Fusarium*	*oxysporum*	5H1-P0-P1-1			

UBOCC-A-114023	*Fusarium*	*oxysporum*	5H1-P0-P1-2			
UBOCC-A-114024	*Fusarium*	*oxysporum*	5H1-P0-P1-3	KM222282	KM232459	
UBOCC-A-114025	*Fusarium*	*oxysporum*	5H1-P3-P1			
UBOCC-A-114026	*Fusarium*	*oxysporum*	5H1-S0-P1-1			
UBOCC-A-114027	*Fusarium*	*oxysporum*	5H1-S0-P1-2			
UBOCC-A-114028	*Fusarium*	*oxysporum*	5H1-S0-P1-3			
UBOCC-A-114029	*Aspergillus*	*fumigatus*	15H4-P0-P1-1	KM222291	KM232473	
UBOCC-A-114030	*Penicillium*	*chrysogenum*	15H4-P0-P1-2	KM222292	KM232474	
UBOCC-A-114031	*Penicillium*	*chrysogenum*	15H4-P0-P1-3			
UBOCC-A-214008	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	15H4-P0-P1-4	KM222293		KM222322
UBOCC-A-114032	*Fusarium*	sp.	15H4-P3-P1-1	KM222297	KM232475	
UBOCC-A-114033	*Fusarium*	sp.	15H4-P3-P1-2			
UBOCC-A-114034	*Sistotrema*	*brinkmannii*	15H4-S3-P1-1	KM222299	KM232477	
UBOCC-A-114035	*Sistotrema*	*brinkmannii*	15H4-S3-P1-2			
UBOCC-A-114036	*Penicillium*	*chrysogenum*	48X3-P3-P1-1	KM222303	KM232481	
UBOCC-A-114037	*Aspergillus*	*fumigatus*	48X3-P3-P1-2			
UBOCC-A-114038	*Fusarium*	sp.	48X3-S0-P1			
UBOCC-A-214009	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	2H5-S3-P2	KM222240		KM222323
UBOCC-A-114039	*Penicillium*	*chrysogenum*	2H5-M3-P2-1	KM222235	KM232441	
UBOCC-A-114040	*Penicillium*	*chrysogenum*	2H5-M3-P2-2			
UBOCC-A-114041	*Penicillium*	*chrysogenum*	2H5-M3-P2-3	KM222236	KM232442	
UBOCC-A-214010	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	3H5-M3-P2-1	KM222241		KM222324
UBOCC-A-114042	*Penicillium*	*chrysogenum*	3H5-M3-P2-2			
UBOCC-A-114043	*Sistotrema*	*brinkmannii*	5H3-P3-P2-1	KM222271	KM232472	
UBOCC-A-114044	*Sarocladium*	sp.	5H3-S0-P2-1	KM222288	KM242082	
UBOCC-A-114045	*Acremonium*	sp.	5H3-S0-P2-2			
UBOCC-A-114046	*Sarocladium*	sp.	5H3-M3-P2			
UBOCC-A-114047	*Fusarium*	sp.	48X3-M3-P2	KM222301	KM232479	
UBOCC-A-114048	*Fusarium*	sp.	88X1-P0-P2	KM222306	KM232482	
UBOCC-A-214011	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	2H5-P3-P3	KM222237		KM222325
UBOCC-A-114049	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-P3-P3	KM222255	KM232453	
UBOCC-A-214012	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	4H1-S0-P3-1			
UBOCC-A-114050	*Sarocladium*	sp.	4H1-S0-P3-2			
UBOCC-A-114051	*Penicillium*	sp.	4H1-S0-P3-3	KM222258	KM232454	

UBOCC-A-214013	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	4H1-M0-P3-1	KM222249		KM222326
UBOCC-A-214014	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	4H1-M0-P3-2	KM222250		KM222327
UBOCC-A-214015	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	4H1-M0-P3-3	KM222251		KM222328
UBOCC-A-214016	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	15H4-P0-P3			
UBOCC-A-114052	*Sistotrema*	*brinkmannii*	15H4-P3-P3	KM222298	KM232476	
UBOCC-A-214017	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	2H5-M0-P4-1	KM222234		KM222329
UBOCC-A-214018	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H1-S3-P4-1			
UBOCC-A-114053	*Acremonium*	sp.	5H1-S3-P4-2	KM222278	KM232469	
UBOCC-A-114054	*Purpureocillium*	*lilacinum*	5H1-S3-P4-3	KM222279	KM232470	
UBOCC-A-114055	*Acremonium*	sp.	5H1-S3-P4-4	KM222280	KM232471	
UBOCC-A-214019	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H1-M3-P4-1	KM222263		KM222330
UBOCC-A-114056	*Acremonium*	sp.	5H3-P0-P4-1			
UBOCC-A-214020	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H3-P0-P4-2	KM222283		KM222331
UBOCC-A-214021	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H3-P0-P4-3			
UBOCC-A-214022	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	5H3-P0-P4-4	KM222284		KM222332
UBOCC-A-214023	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H3-P0-P4-5	KM222285		KM222333
UBOCC-A-214024	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	88X1-P0-P4			
UBOCC-A-114057	*Sarocladium*	sp.	1H3-P3-P5-1			
UBOCC-A-114058	*Sarocladium*	sp.	1H3-P3-P5-2			
UBOCC-A-214025	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	1H3-P3-P5-3	KM222229		KM222334
UBOCC-A-114059	*Sarocladium*	sp.	1H3-P3-P5-4	KM222230	KM232438	
UBOCC-A-114060	*Penicillium*	sp.	4H1-S0-P5-1	KM222259	KM232455	
UBOCC-A-114061	*Sistotrema*	*brinkmannii*	5H1-P0-P5-1	KM232435	KM232460	
UBOCC-A-114062	*Sistotrema*	*brinkmannii*	5H1-P0-P5-1bis	KM222265	KM232461	
UBOCC-A-114063	*Trametes*	*versicolor*	5H1-P0-P5-2	KM222266	KM232462	
UBOCC-A-114064	*Penicillium*	sp.	5H1-P0-P5-3	KM222267	KM232463	
UBOCC-A-114065	*Acremonium*	sp.	5H1-P3-P5-1	KM222272	KM232466	
UBOCC-A-114066	*Paecilomyces*	sp.	5H1-P3-P5-2			
UBOCC-A-214026	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H1-P3-P5-3	KM222286		KM222335
UBOCC-A-214027	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	5H1-S0-P5-1	KM222276		KM222317
UBOCC-A-214028	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H1-S0-P5-2			
UBOCC-A-214029	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	15H4-P0-P5-1	KM222294		KM222315
UBOCC-A-214030	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	15H4-P0-P5-2	KM222295		KM222314
UBOCC-A-114067	*Fusarium*	sp.	48X3-P3-P5-1			

UBOCC-A-214031	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	48X3-P3-P5-2			
UBOCC-A-114068	*Acremonium*	sp.	3H5-P0-P6-1	KM222243	KM232446	
UBOCC-A-114069	*Acremonium*	sp.	3H5-P0-P6-2			
UBOCC-A-214032	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	3H5-P0-P6-3	KM222244		KM222318
UBOCC-A-214033	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	3H5-P0-P6-4	KM222245		KM222319
UBOCC-A-114070	*Sarocladium*	sp.	3H5-P3-P6-1	KM222246	KM232447	
UBOCC-A-114071	*Sarocladium*	sp.	3H5-P3-P6-2			
UBOCC-A- 214143	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	3H5-P3-P6-3	KM222247		KM222336
UBOCC-A-114073	*Sarocladium*	sp.	3H5-S0-P6-1	KM222248	KM232448	
UBOCC-A-214034	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H3-S0-P6-1	KM222289		KM222337
UBOCC-A-214035	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	5H3-S0-P6-2	KM222290		KM222316
UBOCC-A-114074	*Fusarium*	sp.	48X3-M0-P6	KM222300	KM232478	
UBOCC-A-214036	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	88X1-P3-P6-1	KM222307		KM222338
UBOCC-A-214037	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	88X1-S0-P6-1	KM222309		KM222339
UBOCC-A-114075	*Fusarium*	sp.	88X1-S0-P6-2			
UBOCC-A-114076	*Fusarium*	sp.	88X1-S3-P6-2	KM222310	KM232483	
UBOCC-A-214038	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	2H5-S0-P7-1			
UBOCC-A-114077	*Sarocladium*	sp.	2H5-S0-P7-2			
UBOCC-A-114078	*Exophiala*	sp.	2H5-S0-P7-3	KM222239	KM232445	
UBOCC-A-214039	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	4H1-P3-P7-1	KM222256		KM222340
UBOCC-A-214040	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	4H1-S0-P7-1	KM222260		KM222341
UBOCC-A-114079	*Acremonium*	sp.	4H1-S0-P7-2	KM222261	KM232456	
UBOCC-A-214041	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	4H1-S3-P7-1			
UBOCC-A-114080	*Acremonium*	sp.	4H1-S3-P7-2			
UBOCC-A-114081	*Acremonium*	sp.	4H1-S3-P7-3			
UBOCC-A-214042	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H1-P0-P7-1	KM222268		KM222342
UBOCC-A-114082	*Exophiala*	sp.	5H1-P0-P7-2	KM222269	KM232464	
UBOCC-A-114083	*Acremonium*	sp.	5H1-P0-P7-3	KM222270	KM232465	
UBOCC-A-214043	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H1-P3-P7-1	KM222273		KM222343
UBOCC-A-114084	*Phialophora*	sp.	5H1-P3-P7-2	KM222274	KM232467	
UBOCC-A-114085	*Exophiala*	sp.	5H1-P3-P7-3	KM222275	KM232468	
UBOCC-A-214044	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H1-S0-P7-1	KM222277		KM222344
UBOCC-A-214045	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	15H4-P0-P7-1	KM222296		KM222345
UBOCC-A-214046	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	48X3-P0-P7-1			

UBOCC-A-114086	*Fusarium*	*solani*	48X3-P0-P7-2	KM222302	KM232480	
UBOCC-A-214047	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	48X3-S0-P7-1	KM222304		KM222346
UBOCC-A-214048	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	3H5-P3-P8-1			
UBOCC-A-214049	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	3H5-M3-P8-1	KM222242		KM222347
UBOCC-A-214050	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H1-M0-P8-1			
UBOCC-A-114087	*Penicillium*	sp.	5H1-M0-P8-2	KM222262	KM232457	
UBOCC-A-114088	*Acremonium*	sp.	5H1-M3-P8-1	KM222264	KM232458	
UBOCC-A-214051	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H3-P3-P8-1	KM222287		KM222348
UBOCC-A-214052	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H3-M0-P8-1			
UBOCC-A-114089	*Acremonium*	sp.	5H3-M0-P8-2			
UBOCC-A-214053	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	5H3-M3-P8-1	KM222281		KM222349
UBOCC-A-214054	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	48X3-S3-P8	KM222305		KM222313
UBOCC-A- 214144	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	88X1-P0-P8-1			
UBOCC-A- 214145	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	88X1-P3-P8-1			
UBOCC-A-214055	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	88X1-P3-P8-2	KM222308		KM222312
UBOCC-A- 214146	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	88X1-S3-P8-1			
UBOCC-A- 214147	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	88X1-M3-P8-1			
UBOCC-A-114094	*Cladosporium*	sp.	CB1	KM222206	KM232484	
UBOCC-A-114095	*Bjerkandera*	sp.	CB2	KM222207	KM232485	
UBOCC-A-114096	*Fusarium*	sp.	CB3	KM222208	KM232486	
UBOCC-A-114097	*Penicillium*	*brevicompactum*	CB4			
UBOCC-A-114098	*Penicillium*	*brevicompactum*	CB5			
UBOCC-A-114099	*Penicillium*	*brevicompactum*	CB6	KM222209	KM232487	
UBOCC-A-114100	*Penicillium*	*brevicompactum*	CB7			
UBOCC-A-114101	*Penicillium*	*brevicompactum*	CB8			
UBOCC-A-114102	*Penicillium*	*brevicompactum*	CB9	KM222210	KM232488	
UBOCC-A-114103	*Penicillium*	*brevicompactum*	CB10	KM222211	KM232489	
UBOCC-A-114104	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB11			
UBOCC-A- 214148	*Bullera*	*unica*	CB12	KM222212	KM232490	
UBOCC-A-114106	*Penicillium*	sp.	CB13	KM222213	KM232491	
UBOCC-A-114107	*Microascus*	*cirrosus*	CB14	KM222204	KM232492	
UBOCC-A-114108	*Microascus*	*cirrosus*	CB15			
UBOCC-A-114109	*Penicillium*	sp.	CB16	KM222214	KM232493	
UBOCC-A-114110	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB17	KM222215	KM232494	

UBOCC-A-114111	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB18	KM222216	KM232495
UBOCC-A-114112	*Cladophialophora*	*bantiana*	CB19	KM222217	KM232496
UBOCC-A-114113	*Cladosporium*	sp.	CB20	KM222205	KM232497
UBOCC-A-114114	*Agaricomycetes*	sp.	CB21	KM222218	KM232498
UBOCC-A-114115	*Agaricomycetes*	sp.	CB22		
UBOCC-A-114116	*Agaricomycetes*	sp.	CB23		
UBOCC-A-114117	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB24	KM222219	KM232499
UBOCC-A-114118	*Cladophialophora*	*bantiana*	CB25	KM222220	KM232500
UBOCC-A-114119	*Cladophialophora*	*bantiana*	CB26	KM222221	KM232501
UBOCC-A-114120	*Penicillium*	sp.	CB27		
UBOCC-A-114121	*Cordyceps*	*confragosa*	CB28	KM222222	KM232502
UBOCC-A-114122	*Penicillium*	sp.	CB29		
UBOCC-A-114123	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB30	KM222223	KM232503
UBOCC-A-114124	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB31		
UBOCC-A-114125	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB32		
UBOCC-A-114126	*Eurotium*	*herbariorum*	CB33	KM222224	KM232504
UBOCC-A-114127	*Eurotium*	*herbariorum*	CB34		
UBOCC-A-114128	*Sistotrema*	*brinkmannii*	CB35	KM222225	KM232505
UBOCC-A-114129	*Oidiodendron*	*griseum*	CB36	KM222226	KM232506
UBOCC-A-114130	*Sistotrema*	*brinkmannii*	CB37	KM222227	KM232507

(B)

UBOCC number	Genus	Species	Sample ID	GenBank accession number of the closest relative	Identity
UBOCC-A-114003	*Aspergillus*	*terreus*	1H3-S0-P1-1	KF660536.1	1575/1576(99%)
UBOCC-A-214003	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	1H3-S0-P1-2	KC178873.1	1587/1596(99%)
UBOCC-A-214006	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	1H3-S0-P1-5	JQ838010.1	1594/1594(100%)
UBOCC-A-114004	*Fusarium*	*oxysporum*	1H3-S3-P1	KC143070.1	1584/1586(99%)
UBOCC-A-114008	*Paecilomyces*	sp.	1H3-M3-P1-2	KC790497.1	1583/1583(100%)
UBOCC-A-114010	*Fusarium*	sp.	2H5-P3-P1	KC790525.1	1636/1636(100%)
UBOCC-A-114011	*Fusarium*	*oxysporum*	2H5-S0-P1	KC143070.1	1584/1586(99%)
UBOCC-A-114013	*Paecilomyces*	sp.	4H1-P0-P1-2	KC790497.1	1165/1165(100%)
UBOCC-A-114014	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-P3-P1-1	JF807401.1	1640/1640(100%)
UBOCC-A-114015	*Penicillium*	sp.	4H1-P3-P1-2	HM161749.1	1167/1169(99%)
UBOCC-A-114024	*Fusarium*	*oxysporum*	5H1-P0-P1-3	KC493355.1	1168/1168(100%)
UBOCC-A-114029	*Aspergillus*	*fumigatus*	15H4-P0-P1-1	AF548062.1	1586/1586(100%)

UBOCC-A-114030	*Penicillium*	*chrysogenum*	15H4-P0-P1-2	JX480902.1	1586/1587(99%)
UBOCC-A-214008	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	15H4-P0-P1-4	KC178873.1	1584/1584(100%)
UBOCC-A-114032	*Fusarium*	sp.	15H4-P3-P1-1	FJ613599.1	1584/1587(99%)
UBOCC-A-114043	*Sistotrema*	*brinkmannii*	5H3-P3-P2-1	DQ898714.1	1581/1588(99%)
UBOCC-A-114049	*Fusarium*	*oxysporum*	4H1-P3-P3	KC493355.1	1168/1168(100%)
UBOCC-A-114051	*Penicillium*	sp.	4H1-S0-P3-3	HM161749.1	1586/1586(100%)
UBOCC-A-214013	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	4H1-M0-P3-1	KC178873.1	1584/1585(99%)
UBOCC-A-214017	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	2H5-M0-P4-1	KC186124.1	1172/1172(100%)
UBOCC-A-114053	*Acremonium*	sp.	5H1-S3-P4-2	AJ278754.1	1573/1578(99%)
UBOCC-A-114054	*Purpureocillium*	*lilacinum*	5H1-S3-P4-3	KC143069.1	1578/1579(99%)
UBOCC-A-114059	*Sarocladium*	sp.	1H3-P3-P5-4	KC987205.1	1573/1575(99%)
UBOCC-A-114060	*Penicillium*	sp.	4H1-S0-P5-1	HM161749.1	1586/1586(100%)
UBOCC-A-114061	*Sistotrema*	*brinkmannii*	5H1-P0-P5-1	DQ898712.1	1140/1143(99%)
UBOCC-A-114062	*Sistotrema*	*brinkmannii*	5H1-P0-P5-1bis	DQ898714.1	1589/1593(99%)
UBOCC-A-114063	*Trametes*	*versicolor*	5H1-P0-P5-2	AY336751.1	1591/1591(100%)
UBOCC-A-114064	*Penicillium*	sp.	5H1-P0-P5-3	KF741226.1	1586/1590(99%)
UBOCC-A-114065	*Acremonium*	sp.	5H1-P3-P5-1	AJ278754.1	1576/1582(99%)
UBOCC-A-214033	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	3H5-P0-P6-4	KC178873.1	1589/1589(100%)
UBOCC-A-114070	*Sarocladium*	sp.	3H5-P3-P6-1	KC987205.1	1579/1581(99%)
UBOCC-A-214143	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	3H5-P3-P6-3	KC178873.1	1589/1590(99%)
UBOCC-A-114073	*Sarocladium*	sp.	3H5-S0-P6-1	KC987205.1	1579/1580(99%)
UBOCC-A-214035	*Meyerozyma*	*guilliermondii*	5H3-S0-P6-2	KC178873.1	1168/1172(99%)
UBOCC-A-114078	*Exophiala*	sp.	2H5-S0-P7-3	EU090193.1	1585/1587(99%)
UBOCC-A-114079	*Acremonium*	sp.	4H1-S0-P7-2	AJ278754.1	1581/1589(99%)
UBOCC-A-114084	*Phialophora*	sp.	5H1-P3-P7-2	AJ278753.1	1571/1585(99%)
UBOCC-A-114086	*Fusarium*	*solani*	48X3-P0-P7-2	AB473810.1	1581/1584(99%)
UBOCC-A-114087	*Penicillium*	sp.	5H1-M0-P8-2	KF741226.1	1585/1586(99%)
UBOCC-A-214054	*Rhodotorula*	*mucilaginosa*	48X3-S3-P8	GQ433375.1	1594/1594(100%)
UBOCC-A-114094	*Cladosporium*	sp.	CB1	KF776916.1	1627/1627(100%)
UBOCC-A-114095	*Bjerkandera*	sp.	CB2	DQ060083.1	1121/1122(99%)
UBOCC-A-114096	*Fusarium*	sp.	CB3	KC790525.1	883/883(100%)
UBOCC-A-114099	*Penicillium*	*brevicompactum*	CB6	AF548083.1	881/883(99%)
UBOCC-A-214148	*Bullera*	*unica*	CB12	AY887945.1	884/887(99%)
UBOCC-A-114106	*Penicillium*	sp.	CB13	JX192598.1	1634/1635(990%)
UBOCC-A-114107	*Microascus*	*cirrosus*	CB14	M89994.1	1636/1641(99%)
UBOCC-A-114109	*Penicillium*	sp.	CB16	EU667999.1	1625/1632(99%)
UBOCC-A-114110	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB17	JX480902.1	881/882(99%)
UBOCC-A-114111	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB18	JX480902.1	881/882(99%)
UBOCC-A-114112	*Cladophialophora*	*bantiana*	CB19	KC977560.1	885/885(100%)
UBOCC-A-114113	*Cladosporium*	sp.	CB20	KF776914.1	1586/1589(99%)
UBOCC-A-114114	*Agaricomycetes*	sp.	CB21	GU305981.1	885/885(100%)
UBOCC-A-114117	*Penicillium*	*chrysogenum*	CB24	JX480902.1	881/882(99%)
UBOCC-A-114118	*Cladophialophora*	*bantiana*	CB25	KC977560.1	864/864(100%)
UBOCC-A-114119	*Cladophialophora*	*bantiana*	CB26	KC977560.1	885/885(100%)
UBOCC-A-114121	*Cordyceps*	*confragosa*	CB28	JF310743.1	422/425(99%)

UBOCC-A-114126	*Eurotium*	*herbariorum*	CB33	AB008402.1	1643/1646(99%)
UBOCC-A-114128	*Sistotrema*	*brinkmannii*	CB35	DQ898714.1	883/887(99%)
UBOCC-A-114129	*Oidiodendron*	*griseum*	CB36	AY618676.1	491/493(99%)
UBOCC-A-114130	*Sistotrema*	*brinkmannii*	CB37	DQ898714.1	873/875(99%)

Table S2. Relative occurrence of PKSI, PKSIII, NRPS, Hybrids and TPS genes in filamentous fungi (A) and yeasts (B).

A	FILAMENTOUS FUNGI				
Depth (mbsf)	PKS I	PKS III	NRPS	Hybrids	TPS
4	0.76	0.52	0.76	0.71	0.67
12	0.75	0.83	0.58	0.83	0.42
21	1.00	0.57	0.57	0.57	0.14
25	1.00	0.59	0.94	0.82	0.47
34	0.90	0.41	0.83	0.66	0.31
37	1.00	0.82	0.71	0.82	0 ;00
137	0.88	0.50	0.88	0.63	0.75
403	1.00	0.25	0.86	0.63	0.13
765	1.00	0.25	1.00	1.00	0.25
1884	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00

B	YEASTS				
Depth (mbsf)	PKS I	PKS III	NRPS	Hybrids	TPS
4	0.40	0.20	1.00	0	0.40
12	0.80	0.40	0.80	0	0.60
21	0.50	0.33	0.50	0	0.33
25	0.50	0.38	0.63	0	0.50
34	1.00	0.56	0.78	0	0.67
37	0.78	0.44	0.78	0	0.78
137	0.60	0.20	0.20	0	0.40
403	0.75	0.25	1.00	0	1.00
765	0.50	0.38	0.38	0	0.50

CHAPITRE 2

Criblage d'activités antimicrobiennes et extraction des composés bioactifs de champignons de sédiments marins profonds

---

Deep subseafloor fungi as an untapped reservoir of amphipathic antimicrobial compounds

Marion Navarri, Camille Jégou, Laurence Meslet-Cladière, Benjamin Brillet, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud, Yannick Fleury. 2016. *Marine Drugs*. **14** (3) : 50

Le potentiel génétique des champignons marins isolés de sédiment a été révélé au cours du chapitre précédent par *genome mining*, en recherchant la présence de gènes impliqués dans la synthèse de polycétides, peptides non ribosomiques, terpènes et hybrides. Dans un contexte, d'antibiorésistance menaçant les systèmes de santé publique et où la recherche de nouvelles molécules antimicrobiennes est devenue une priorité, nous nous sommes concentrés sur les activités antimicrobiennes de cette collection originale. Dans la mesure où les gènes détectés ne sont pas exclusivement impliqués dans la biosynthèse de métabolites antimicrobiens, nous avons mené dans ce chapitre un criblage fonctionnel sur une sélection de souches de la collection.

Ainsi, 110 représentants (24 levures et 86 champignons filamenteux) ont été sélectionnés en fonction de leur appartenance aux différents groupes établis par *MSP-PCR fingerprinting*, de leur profondeur d'isolement et de leur potentiel génétique. Les souches sélectionnées ont été criblées contre 16 cibles (12 bactéries et 4 champignons) identifiées comme pathogènes cliniques ou aquacoles. Les levures de la collection ont été cultivées en milieu liquide Yeast extract Peptone Glucose medium (YPG) alors que les champignons filamenteux ont été cultivés sur milieu solide Potato Dextrose Agar (PDA). Les tests d'activité, ont été réalisés en diffusion dans la gélose. Aucune des levures criblées n'a démontrée d'activité contre les cibles étudiées. En revanche une forte proportion de champignons filamenteux (32.5%) a montré des activités antibactériennes (principalement sur les bactéries à Gram-positif) et antifongiques. Le spectre d'activité de ces souches de champignon reste limité puisqu'ils sont actif spécifiquement contre une catégorie de micro-organismes. Seules 5 souches sur 28 actives ont inhibé 2 catégories de micro-organismes (Champignon et bactérie Gram-positif ou bactérie Gram-positif et négatif)

Les souches actives ont été essentiellement isolées dans les premiers mètres de la carotte sédimentaire, là où la biodiversité est la plus importante, suggérant un rôle de ces composés dans la compétition pour la niche écologique. Le long de la carotte de sédiment, la proportion de souches fongiques aux propriétés antimicrobiennes diminue avec la profondeur et donc avec la biodiversité microbienne.

Nous avons tenté d'optimiser la production des métabolites antimicrobiens afin de faciliter leur caractérisation ultérieure. Pour ce faire, 6 souches parmi les plus actives ont été sélectionnées.

Elles ont été cultivées dans du PDB (Potato Dextrose Broth) contenant différentes concentrations en agar (0%, 0,2%, 1,7%). Après 14 jours de culture à 25°C, une extraction des composés amphiphiles a été réalisée. L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée sur la souche la plus sensible révélée par le criblage précédent. Elle a été détectée pour 5 des 6 souches soulignant ainsi le caractère amphiphile des molécules actives. Par ailleurs, aucune activité antimicrobienne n'a été détectée dans les extraits issus de surnageant de culture en l'absence d'agar. Bien qu'aucune corrélation n'ait été observée entre la concentration en agar et l'intensité de l'activité antimicrobienne ces résultats illustrent l'importance des conditions de cultures dans la production de métabolites bioactifs.

La forte proportion de souches fongiques avec des activités antimicrobiennes et le caractère amphiphile des molécules actives, renforcent l'idée que les champignons de sédiment marins profonds constituent un réservoir de molécules antimicrobiennes avec un rôle écologique potentiellement majeur dans la compétition entre communautés microbiennes.

marine drugs

MDPI

Article

Deep Subseafloor Fungi as an Untapped Reservoir of Amphipathic Antimicrobial Compounds

Marion Navarri, Camille Jégou, Laurence Meslet-Cladière, Benjamin Brillet, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud and Yannick Fleury *

Laboratoire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (EA 3882), Université de Brest, Technopole Brest Iroise, 29280 Plouzané, France; marion.navarri@univ-brest.fr (M.N.); camille.jegou@univ-brest.fr (C.J.); laurence.meslet@univ-brest.fr (L.M.-C.); benjamin.brillet@univ-brest.fr (B.B.); georges.barbier@univ-brest.fr (G.B.); gaetan.burgaud@univ-brest.fr (G.B.)
* Correspondence: yannick.fleury@univ-brest.fr; Tel.: +33-298-641-935

Academic Editor: Olivier Grovel
Received: 14 January 2016; Accepted: 2 March 2016; Published: 10 March 2016

Abstract: The evolving global threat of antimicrobial resistance requires a deep renewal of the antibiotic arsenal including the isolation and characterization of new drugs. Underexplored marine ecosystems may represent an untapped reservoir of novel bioactive molecules. Deep-sea fungi isolated from a record-depth sediment core of almost 2000 m below the seafloor were investigated for antimicrobial activities. This antimicrobial screening, using 16 microbial targets, revealed 33% of filamentous fungi synthesizing bioactive compounds with activities against pathogenic bacteria and fungi. Interestingly, occurrence of antimicrobial producing isolates was well correlated with the complexity of the habitat (in term of microbial richness), as higher antimicrobial activities were obtained at specific layers of the sediment core. It clearly highlights complex deep-sea habitats as chemical battlefields where synthesis of numerous bioactive compounds appears critical for microbial competition. The six most promising deep subseafloor fungal isolates were selected for the production and extraction of bioactive compounds. Depending on the fungal isolates, antimicrobial compounds were only biosynthesized in semi-liquid or solid-state conditions as no antimicrobial activities were ever detected using liquid fermentation. An exception was made for one fungal isolate, and the extraction procedure designed to extract amphipathic compounds was successful and highlighted the amphiphilic profile of the bioactive metabolites.

Keywords: deep subseafloor fungi; antimicrobial metabolites; amphipathic compounds; solid-state fermentation

1. Introduction

The increasing trend of bacterial resistance currently jeopardizes global public health and thus the global healthcare system. Outbreaks due to antimicrobial resistant microorganisms kill about 3 million people each year in the world [1] including 23,000 American [2] and 37,000 European people [3]. The threat is of particularly of concern as most of the currently available antibiotics have lost their efficiency [4]. To counteract antibiotic resistance, Centers for Disease Prevention and Control are developing and financing research programs dedicated to (i) the prevention of healthcare-associated infections; (ii) the improvement of antibiotic prescription; and (iii) the promotion of new antibiotics exploration.

Natural and natural-derived drugs in pharmaceutical pipelines represent 71% of newly approved molecules [5]. According to J. Bérdy (2012), 60,000–80,000 microbial compounds have been characterized, 32,000–34,000 were bioactive of which 15,000 are of fungal origin [6] some of them being real blockbusters. Some examples of fungal success stories are the well-known (i) penicillin,

which started the antibiotic era [7], statins preventing coronary heart diseases [8] or cyclosporins as immunosuppressive agents [9].

Marine ecosystems paid special attention as a new reservoir of antimicrobials as emphasized by Blunt *et al.* since 2003 in their annual reviews on marine natural products. Oceans harbor a broad diversity of ecosystems colonized by a huge diversity of microorganisms synthetizing a wide array of original bioactive metabolites [10,11]. Marine fungi have usually been considered as uncommon microorganisms and are still largely underexplored. Logically, the number of marine fungal natural products characterized to date (almost 700 new molecules between 2006 and 2010 [12]) remains low, albeit following an increasing trend. However, marine fungal chemodiversity appears original with numerous novel structures described. As numerous shallow-water marine fungi have been screened for bioactive compounds, the challenge now is to search for untapped fungal resources in untargeted ecological niches as marine extreme environments. Deep-sea ecosystems, as deep-sea hydrothermal vents or the deep subseafloor appear as extreme and complex habitats, *i.e.*, harboring numerous microorganisms [13], which may be allegorized as chemical battlefields [14] of interest for biotechnological applications.

In this underexplored context, a collection of almost 200 deep subseafloor fungal strains obtained from a sediment core, recently established by Rédou *et al.* [15], highlighted (i) the fungal diversity within the deep-subseafloor from 4 to 1884 mbsf and (ii) its biotechnological potential using genome mining for specific genes involved in biosynthesic pathways of bioactive secondary metabolites [16]. Here, we report the functional screening of this deep subseafloor fungal collection for antimicrobial activities. A set of 110 fungal strains was selected, as a representative sub-collection, in all identified clusters and at different depths of isolation. We also discuss their ecological significance and finally report first insights into the antimicrobial compound production and their chemical nature.

2. Results and Discussion

2.1. Antimicrobial Screening

A selection of 110 deep subseafloor fungal isolates was screened against a panel of 16 microbial targets using agar diffusion method. Surprisingly, in our culture conditions, no antimicrobial activity was ever detected from the 24 assayed marine yeast isolates, identified as strains of *Bullera alba*, *Meyerozyma guillermondii* and *Rhodotorula mucilaginosa* species [15]. Some terrestrial representatives of those species were already demonstrated as antimicrobial peptide producers [17–20]. Alternatively, a high proportion of filamentous fungi exhibiting antimicrobial activities was revealed. Indeed, 28 fungal strains of the 86 assayed exhibited antimicrobial activity (even partial) against at least one microbial target (Figure 1 and Figure S1). Thus, around 33% of the deep subseafloor filamentous fungal collection was shown to produce antimicrobial compounds. Such a high proportion of antimicrobial producing fungal strains has already been described from marine sediment- or invertebrate-associated fungi [21–24]. As a comparison, a screening of deep-sea surface sediment bacteria against eight microbial targets revealed 13% of bacterial strains synthesizing bioactive compounds [25]. Thus, deep-sea complex habitats, such as deep subseafloor, do appear as reservoirs of bioactive secondary metabolites.

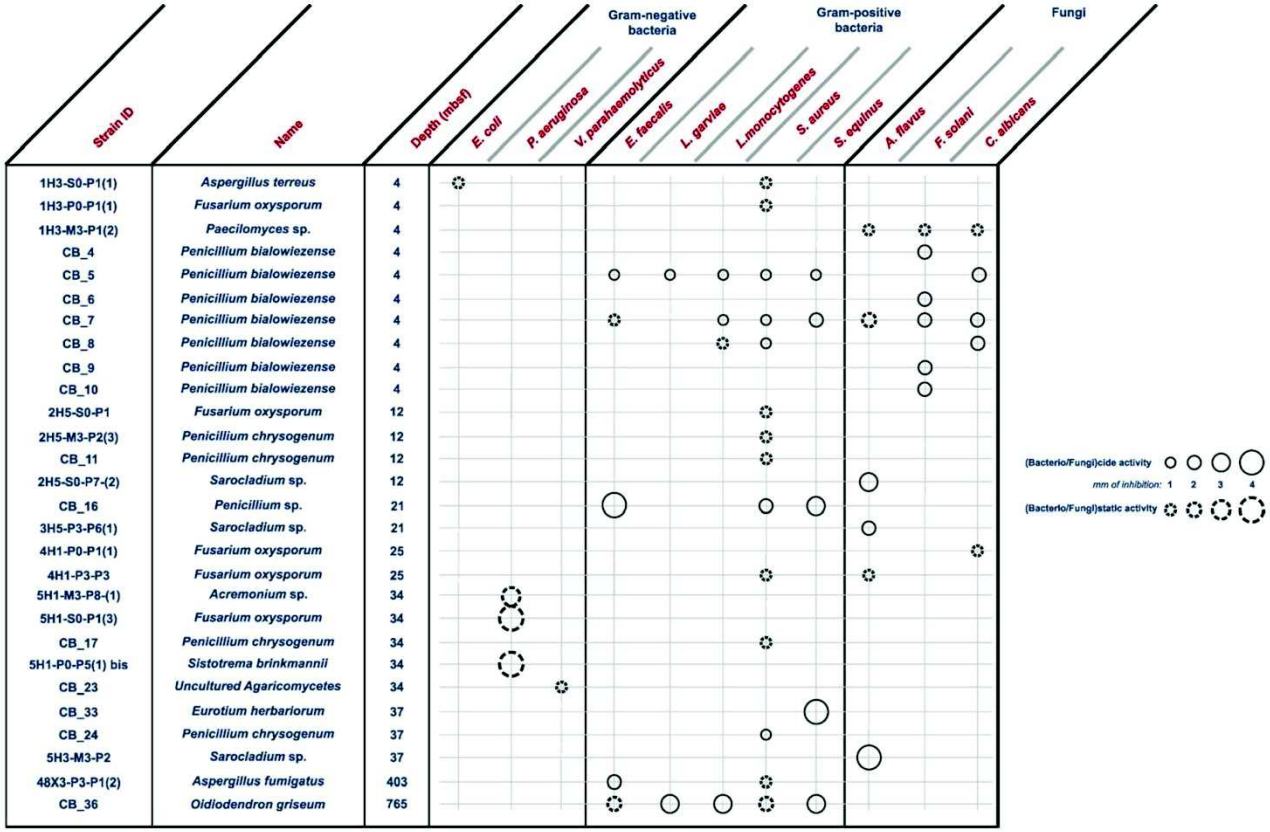


Figure 1. Antimicrobial spectrum of the 28 deep subseafloor antimicrobial producing fungal isolates.

Fungal strains synthesizing antimicrobial compounds could be divided into three groups depending on their antimicrobial spectrum:

- Anti Gram-positive fungi, as the most important group clustering 15 strains (53% of the bioactive strains). Isolates were identified as belonging to *Aspergillus fumigatus* 48X3-P3-P1(2), *Aspergillus terreus* 1H3-S0-P1(1), *Eurotium herbariorum* CB_33, *Fusarium oxysporum* (1H3-P0-P1(1), 4H1-P0-P1(1) and 4H1-P3-P3), *Penicillium bialowiezense* (CB_5, CB_7 and CB_8), *Penicillium chrysogenum* (2H5-M3-P2-(3), CB_11, CB_17 and CB_24), *Penicillium* sp. CB_16 (1 strain), and *Oidiodendron griseum* CB_36 species. Marine species of *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* genera are well-known as producers of a wide array of bioactive metabolites, *i.e.*, polyketides, alkaloids and peptides, with a broad spectrum of biological activities [12,26–28]. Several marine-derived *Eurotium* species have been investigated for antimicrobial activity with a special focus on *Eurotium cristatum*. An algae-associated *E. cristatum* strain was assessed as producer of the tardioxopiperazine A antibiotic inhibiting *Staphylococcus aureus* [29] contrary to one sponge-associated *E. cristatum* strain [30]. Interestingly, and to the best of knowledge, no antimicrobial activity was ever detected from marine-derived *Oidiodendron* strains while, some terrestrial strains, as *Oidiodendron truncatum* or *Oidiodendron fuscum*, are able to synthesize antibacterial polyketide (fuscin) [31] and terpenoid (clerocidin) [32].
- Anti-fungal strains gathering: *Penicillium bialowiezense* (CB_4, CB_5, CB_6, CB_7, CB_8, CB_9 and CB_10), *Sarocladium* sp (2H5-S0-P7(2), 3H5-P3-P6(1) and 5H3-M3-P2), *Fusarium oxysporum* (4H1-P0-P1(1) and 4H1-P3-P3) and *Paecilomyces* sp. 1H3-M3-P1(2) species. Marine species of *Penicillium* and *Fusarium* genera have already been described as producers of antifungal terpenoids like penicisteroids and polyketides as fusarielin E, respectively [33–38]. Marine-derived *Paecilomyces* species, isolated from mangrove habitats, have been shown to produce antifungal polyketides [39,40]. *Sarocladium kiliense* and *Sarocladium oryzae* are known to produce antifungal terpenoid and polyketide against phytopathogenic fungi [41] and *C. albicans* [42,43]. A marine endophytic *Sarocladium* sp. was described for its ability to inhibit bacterial *quorum sensing* [44]. Here, we report an original ability of a deep subseafloor *Sarocladium* isolate to biosynthesize bioactive compounds against *A. flavus*.
- Five deep subseafloor fungal isolates had a weak antibacterial activity against Gram-negative bacteria (partial inhibition). Those isolates were identified as *Acremonium* sp. 5H1-M3-P8(1), *Aspergillus terreus* 1H3-S0-P1(1), *Fusarium oxysporum* 5H1-S0-P1(3), *Sistotrema brinkmanii* 5H1-P0-P5(1)bis and an uncultured Agaricomycete CB_23. If species of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Acremonium* genera have already been described to produce an array of anti-Gram-negative compounds [45–50], to the best of knowledge we here described an original antimicrobial activity from a *Sistotrema brinkmannii* species.

As clearly shown in the Venn diagram (Figure 2), most of the deep subseafloor fungal isolates produce narrow-spectrum antimicrobial compounds. Indeed, 82% of antimicrobial producing isolates are active against a specific category of microorganisms, *i.e.*, Gram-positive bacteria (10 isolates), fungi (nine isolates) or Gram-negative bacteria (four isolates). Only five isolates could be characterized as producers of a broader spectrum of activity with a mix of Gram-positive and fungal inhibition (*P. bialowiezense* CB_5, CB_7, CB_8 and *F. oxysporum* 4H1-P3-P3) or Gram-positive and Gram-negative inhibition (*A. terreus*1H3-S0-P1(1)).

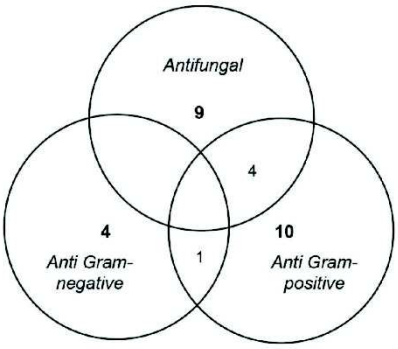


Figure 2. Venn diagram summarizing the spectrum of activity of the 28 antimicrobial producing deep subseafloor fungal isolates.

This screening seems to exhibit a distribution pattern of antimicrobial activities with higher occurrence of antimicrobial producing fungal isolates at shallow sediment core depths (4–37 mbsf) compared to deeper layers (>100 mbsf) (Figure 1 and Figure S1). It is thus attractive to try glimpsing for any statistical correlations between antimicrobial potential and some environmental parameters, as depth or microbial richness.

2.2. Ecological Significance

Specific attention on the antimicrobial screening revealed a pattern of activity along the sediment core with a trend consisting in decreasing of the proportion of strains producing antimicrobial compounds when depth increases (Figure 3A). Indeed, relative occurrence of fungal isolates synthesizing bioactive compounds was higher at shallow depths compared to deeper layers.

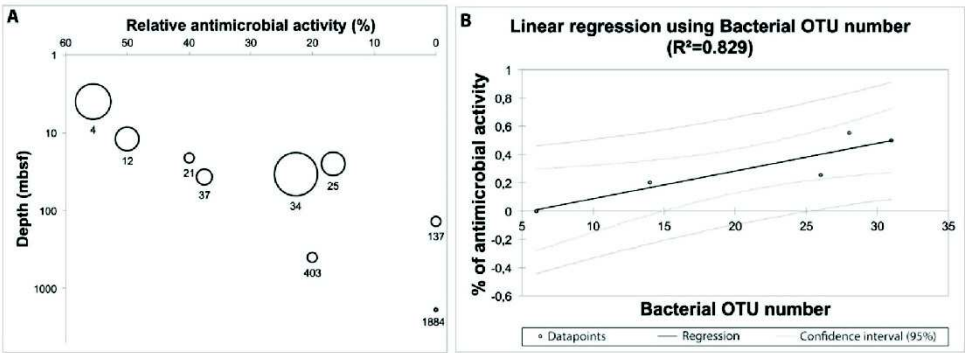


Figure 3. Antimicrobial activity along the sediment core. (**A**) Antimicrobial activity (%) expressed as a function of depth (size of the circles is directly linked to the number of screened fungal isolates, from one isolate (1884 mbsf) to 22 isolates (34 mbsf); (**B**) Relationship between antimicrobial activity (%) and bacterial Operational Taxonomic Unit (OTU) number (used as a proxy to estimate the complexity of the different sediment samples). The number of prokaryotic OTU was 28, 31, 26, 14 and 6 between 4–6 mbsf, 15–12 mbsf, 24–37 mbsf, 346–403 and 1827–1884 mbsf, respectively. The reader is referred to Ciobanu *et al.* [13].

Deep subseafloor sediments harbor a great reservoir of microbial cells, from 10^3 to 10^8 cells/cm^3 [51,52] decreasing with depth [53]. Such a global trend was also obtained in the Canterbury basin sediment core with a significant decrease of bacterial and archaeal OTUs [13]. Linear regression was thus processed (Figure 3B) using diversity richness (in terms of Operational Taxonomic

Units) at different depth layers, an exception being made for 765 mbsf depth, which was not used for diversity analyses [13]. Such analysis revealed a significant correlation between bacterial OTU number and deep subseafloor antimicrobial activity (p-value = 0.032), indicating that the more complex the microbiota is (NB: the highest OTU is observed in the shallow-layer sediment), the more the potential of deep subseafloor fungal isolates to synthesize antimicrobial compounds is important. From an ecological point of view, it seems to indicate that complex deep-sea ecosystems harboring a high diversity of microorganisms, with complex interactions to maintain/settle/colonize, can be allegorized as untapped chemical battlefields, as previously defined in other marine ecosystems [54–56].

2.3. Antimicrobial Compounds Production and Extraction

From the 28 deep subseafloor fungal isolates synthesizing antimicrobial compounds, a selection was performed according to different criteria as novelty, isolation depth and genetic potential based on a previous study [13]. Doing so, six strains namely, *Aspergillus fumigatus* 48X3-P3-P1(2), *Eurotium herbariorum* CB_33, *Penicillium bialowiezense* CB_7, *Penicillium* sp. CB_16, *Oidiodendron griseum* CB_36 and *Sarocladium* sp. 5H3-M3-P2 have been selected for deeper investigations to get insights into an optimized culture condition for an efficient production of bioactive metabolites. *Sistrotema brinkmanii* 5H1-P0-P5(1)bis was exluded because of its partial activity (Figure 1).

After extraction, antimicrobial activity was checked against the most sensitive target (see Figure 1). An exception was made for *Sarocladium* sp 5H3-M3-P2, antimicrobial activity was recovered and thus highlights the amphipathic chemical nature of the secreted bioactive compounds (Figure 2). Overall, as no antimicrobial activity was ever detected from culture in liquid medium Potato Dextrose Broth (PDB), semi-liquid (PDB complemented with 0.2% agar, (PDA 0.2%) or solid (PDB complemented with 1.7% agar, PDA 1.7%) medium were the best culture conditions to be used for an efficient antimicrobial production.

These results clearly indicate that specific culture conditions, *i.e.*, here liquid *versus* solid-state fermentation, trigger antimicrobial production. Interestingly, agar-based media seem to boost the production of antimicrobial compounds as no activity was ever detected in C18-SPE cell-free supernatant fractions (F10-90) of strains cultivated in PDB (data not shown). Interestingly, Bigelis *et al.* [57] have demonstrated that only solid-state fermentation allowed the fungal synthesis of antimicrobial compounds, albeit such organisms were able to grow in liquid media and thus support our findings on deep subseafloor marine fungi. As a result, solid state fermentation recently has received growing interest [58]. On the other hand, submerged fermentation have been extensively used as a large scale method to maximize the production of bioactive metabolites. We have assessed different kinds of fermentation: submerged fermentation (PDB and PDA 0.2%) and solid-sate fermentation (PDA 1.7%). No positive correlation was observed between the increasing agar concentration and the bioactivity. Culture conditions that stimulate the production of antimicrobial compounds thus appear strain-dependent, the different culture conditions leading to different metabolisms as desmonstrated in literature [59,60].

The antimicrobial producing deep subseafloor fungal isolates harbor many genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites (Figure 4). If this genetic pattern illustrates the biotechnological potential of the deep-sea fungal isolates, it does not allow to clearly identify the chemical nature of the bioactive compounds but rather to obtain hints. Here, polyketides, non ribosomal peptides and/or terpenes might be responsible for the detected antimicrobial activities. LC-MS/MS analyses coupled with a dereplication strategy will allow researchers to go deeper into the characterization of the deep subseafloor fungal chemodiversity.

Strain	Depth (mbsf)	Genes involved in secondary bioactive metabolites synthesis					Target	Inhibition zone (mm)	
		PKS I	PKS III	NRPS	Hybrids	TPS		PDA 0.2% supernatant F10-90	PDA 1.7% biomass+thalli OP
CB_7 *P. bialowiezense*	4	✓	✓	✓	✓	✓	*F. solani*	O (10)	O (10)
CB_16 *Penicillium* sp.	21	✓	×	✓	✓	✓	*E. faecalis*	- (23)	O (10)
CB_33 *E. herbariorum*	37	✓	✓	✓	✓	×	*S. equinus*	O (9)	- (10)
5H3-M3-P2 *Sarocladium* sp.	37	✓	✓	×	✓	×	*A. flavus*	-	-
48X3-P3-P1(2) *A. fumigatus*	403	✓	×	✓	✓	✓	*E. faecalis*	O (21)	O (10)
CB_36 *O. griseum*	765	✓	✓	✓	✓	×	*L. monocytogenes*	na	O (10)

Figure 4. Antimicrobial activity after extraction. **O**: size of the inhibition zone 2, 3 and 5 mm. ✓ Presence, or × absence of genes coding PKS I, PKS III, NRPS, PKS-NRPS and TPS [15]. F10-90: C18-SPE fraction eluted with acetonitrile 90%. OP: Organic phase. In bracket the concentration (mg/mL) of the crude extract. Na: Not assayed

3. Materials and Methods

3.1. Strains Collection

Marine fungal strains were isolated from a sediment core drilled in the Canterbury Basin on the eastern margin off New Zealand during the Integrated Ocean Drilling Program (IODP) Leg 317 Expedition [15]. All the isolated strains were identified, characterized and cryopreserved at −80 °C in the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC) [61]. Here, 110 fungal isolates were chosen as an exhaustive strain sub-collection in order to select all representatives of the different taxonomic clusters isolated at different depths, from 4 to 1884 mbsf.

3.2. Cultivation Methods

Filamentous fungal isolates were cultivated on Potato Dextrose Agar (PDA) for 7 days at 25 °C. Then, isolates were subcultured onto PDA plates by central inoculation for 14 days at 25 °C. Spores suspension were calibrated at 1×10^7 spores/mL and 500 µL were used to inoculate 50 mL liquid medium (PDB) or semi liquid (PDB + 0.2% Agar; PDA 0.2%). Solid medium (PDA) was centrally inoculated by dropping 10 µL of the spores suspension (1×10^7 spores/mL). All media were incubated at 25 °C for 14 days. Broths were under rotary shaking (100 rpm) and plates were in static conditions.

Yeast isolates were first cultivated on Yeast extract Peptone Dextrose Agar (YPDA) for 2 days at 25 °C. Then, one colony was used to inoculate a 5 mL YPD Broth (YPDB) for 24 h at 25 °C with rotary shaking at 100 rpm. Finally 50 µL of this pre-culture was incubated in 5 mL of YPDB during 4 days at 25 °C and 100 rpm.

3.3. Antimicrobial Screening

Sixteen microbial targets, belonging to human or marine animal pathogenic bacteria and fungi were selected in different culture collections: (i) *Enterobacter aerogenes* CIP 6086, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella oxytoca* CIP 7932, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* CIP 8297, *Vibrio parahaemolyticus* Ifremer 01/252 and *Yersinia ruckeri* ATCC 29473, representing the Gram-negative bacterial targets; (ii) *Enterococcus faecalis* CIP A 186, *Lactococcus garviae* ATCC 43921, *Listeria monocytogenes* SOR 100 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus equinus* NRRL B-4268 representing the Gram-positive bacterial targets. Antimicrobial activity was also assessed against

different filamentous fungi: *Aspergillus flavus* CBS 100927, *Exophiala dermatidis* UBOCC-A-113043, *Fusarium solani* CBS 181.29 and the yeast *Candida albicans* ATCC 2092. All of the target cells were cultivated according to the ATCC standards.

For antimicrobial assays, bacterial and yeast target cells were respectively included in Trypton Soy and in YPDA agar at 1×10^6 cfu/mL, while, filamentous fungi spores were included at 1×10^5 spores/mL in PDA.

Antimicrobial screenings were assessed using agar diffusion methods. After 4 days incubation for yeast, 5 µL of culture was inoculated into a well made in the target cell medium. While, after 14 days incubation for filamentous fungi a plug of culture was dropped off into a well made in the target cell medium. The antimicrobial activity was expressed as the radius of the inhibition zone in mm.

3.4. Extraction of Amphipathic Bioactive Compounds

Fungal isolates producing antimicrobial compounds were cultivated during 14 days in PDB, PDA 0.2% and PDA 1.7%. In order to extract amphipathic metabolites, cell-free supernatants (20 mL) from PDB and PDA 0.2%, were collected (centrifugation, 8000 *g*, 4 °C, 40 min), loaded and fractionated onto Solid Phase Extraction C-18 cartridge (SPE/C18 UPTI-clean, Interchim, France). After a first washing step performed with 10% acetonitrile +0.07% Trifluoroacetic Acid (TFA), the retained compounds were eluted using 90% acetonitrile +0.07% TFA in a fraction named F10-90. and finally freeze-dryed [62].

Biomass and solid culture media (PDA 1.7%) were collected crushed in liquid nitrogen and then extracted using Methanol/Chloroform/Water (4V/5V/1V; 1 g/10 mL) for 10 min at 100 rpm and finally centrifuged (4 °C, 8000 *g*, and 20 min). The aqueous phase was removed, and Organic Phase (OP) was dried under vacuum and solubilized in 20% acetonitrile (1 g of fresh mycelium/5 mL). All fractions of interest (F10-90 and OP) were freeze-dried and solubilized in 20% acetonitrile. Since the examined fractions arose from an extraction onto non polar phase and then were soluble in a more polar solvent (*i.e.*, 20% acetonitrile), they were considered as made of amphipathic compounds.

4. Conclusions

Our study revealed the antimicrobial properties of a unique deep subseafloor fungal collection obtained from a record-depth sediment core. A sub-collection of 110 fungal strains was screened for antimicrobial activities against 16 Gram-negative, Gram-positive and fungal targets. A relatively high proportion of bioactivity was obtained as 33% of filamentous fungi inhibit the growth of at least one microbial target. Antimicrobial activities were mainly directed towards Gram-positive bacteria and fungi. To the best of our knowledge, this is the first screening to deal with deep subseafloor fungi. Here, the high proportion of fungi producing antimicrobial compounds coupled with the evidence that deep subseafloor fungi possess a range of adaptations to cope with numerous biological, physical and chemical stressors clearly highlights such organisms as an untapped reservoir to investigate for novel molecules of biotechnological interest. Complementary analyses will now been focused on the fractionation, dereplication and identification of molecules in search of putatively novel antimicrobial compounds.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/1660-3397/14/3/50/s1, Figure S1: Antimicrobial screening of 110 deep subseafloor fungi.

Acknowledgments: This research project is a part of the European project MaCuMBA (Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving Their Biotechnological Applications) and has been founded by the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no 311975 and Brittany region under grant agreement 8433. Thanks to Amélie Weil who cultivated strains after preservation, and Denis Rousseaux for giving liquid nitrogen.

Author Contributions: All authors conceived and designed the experiments; Marion Navarri and Camille Jégou performed the experiments; Marion Navarri, Yannick Fleury and Gaëtan Burgaud analyzed the data. All authors wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. World Health Organization. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014.
2. Frieden, T. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Available online: http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf (accessed on 20 November 2015).
3. Monnet, D.L.; Albiger, B. European Centre for Disease Prevention and Control. Available online: http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/ARHAI/Pages/about_programme.aspx (accessed on 10 November 2015).
4. Brooks, B.D.; Brooks, A.E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *78*, 14–27. [CrossRef] [PubMed]
5. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335. [CrossRef] [PubMed]
6. Bérdy, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2012**, *65*, 385–395. [CrossRef] [PubMed]
7. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236. [CrossRef]
8. Endo, A.; Kuroda, M.; Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterogensis produced by Penicillium citrinum. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1976**, *29*, 1346–1348. [CrossRef] [PubMed]
9. Fliri, H.; Baumann, G.; Enz, A.; Kallen, J.; Luyten, M.; Mikol, V.; Movva, R.; Quesniaux, V.; Schreier, M.; Walkinshaw, M.; *et al.* Cyclosporins. Structure-activity relationships. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *696*, 47–53. [CrossRef] [PubMed]
10. Debbab, A.; Aly, A.H.; Lin, W.H.; Proksch, P. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi: Marine bioactive compounds. *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3*, 544–563. [CrossRef] [PubMed]
11. Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 116–211. [CrossRef] [PubMed]
12. Rateb, M.E.; Ebel, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 290–344. [CrossRef] [PubMed]
13. Ciobanu, M.-C.; Burgaud, G.; Dufresne, A.; Breuker, A.; Rédou, V.; Ben Maamar, S.; Gaboyer, F.; Vandenabeele-Trambouze, O.; Lipp, J.S.; Schippers, A.; *et al.* Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. *ISME J.* **2014**, *8*, 1370–1380. [CrossRef] [PubMed]
14. Hay, M.E. Marine chemical ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2009**, *1*, 193–212. [CrossRef] [PubMed]
15. Rédou, V.; Navarri, M.; Meslet-Cladière, L.; Barbier, G.; Burgaud, G. Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 3571–3583. [CrossRef] [PubMed]
16. Wiemann, P.; Keller, N.P. Strategies for mining fungal natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 301–313. [CrossRef] [PubMed]
17. Golubev, W.I. Antagonistic interactions among yeasts. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*; Péter, G., Rosa, C., Eds.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; pp. 197–219.
18. Vaz, A.B.M.; Mota, R.C.; Bomfim, M.R.Q.; Vieira, M.L.A.; Zani, C.L.; Rosa, C.A.; Rosa, L.H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *55*, 1381–1391. [CrossRef] [PubMed]
19. Coda, R.; Rizzello, C.G.; Di Cagno, R.; Trani, A.; Cardinali, G.; Gobbetti, M. Antifungal activity of Meyerozyma guilliermondii: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiol.* **2013**, *33*, 243–251. [CrossRef] [PubMed]
20. Joel, E.L.; Valentin Bhimba, B. Evaluation of secondary metabolites from mangrove associated fungi Meyerozyma guilliermondii. *Alex. J. Med.* **2013**, *49*, 189–194. [CrossRef]

21. Zhang, X.-Y.; Bao, J.; Wang, G.-H.; He, F.; Xu, X.-Y.; Qi, S.-H. Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi isolated from six species of the South China Sea gorgonians. *Microb. Ecol.* **2012**, *64*, 617–627. [CrossRef] [PubMed]
22. Zhang, X.-Y.; Zhang, Y.; Xu, X.-Y.; Qi, S.-H. Diverse deep-sea fungi from the South China Sea and their antimicrobial activity. *Curr. Microbiol.* **2013**, *67*, 525–530. [CrossRef] [PubMed]
23. Henríquez, M.; Vergara, K.; Norambuena, J.; Beiza, A.; Maza, F.; Ubilla, P.; Araya, I.; Chávez, R.; San-Martín, A.; Darias, J.; *et al.* Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 65–76. [CrossRef] [PubMed]
24. Qin, X.-Y.; Yang, K.-L.; Li, J.; Wang, C.-Y.; Shao, C.-L. Phylogenetic diversity and antibacterial activity of culturable fungi derived from the Zoanthid *Palythoa haddoni* in the South China Sea. *Mar. Biotechnol.* **2015**, *17*, 99–109. [CrossRef] [PubMed]
25. Romanenko, L.A.; Tanaka, N.; Kalinovskaya, N.I.; Mikhailov, V.V. Antimicrobial potential of deep surface sediment associated bacteria from the Sea of Japan. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 1169–1177. [CrossRef] [PubMed]
26. Schueffler, A.; Anke, T. Fungal natural products in research and development. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1425–1448. [CrossRef] [PubMed]
27. Skropeta, D.; Wei, L. Recent advances in deep-sea natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 999–1025. [CrossRef] [PubMed]
28. Xu, L.; Meng, W.; Cao, C.; Wang, J.; Shan, W.; Wang, Q. Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 3479–3513. [CrossRef] [PubMed]
29. Du, F.-Y.; Li, X.-M.; Li, C.-S.; Shang, Z.; Wang, B.-G. Cristatumins A–D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 4650–4653. [CrossRef] [PubMed]
30. Gomes, N.M.; Dethoup, T.; Singburaudom, N.; Gales, L.; Silva, A.M.S.; Kijjoa, A. Eurocristatine, a new diketopiperazine dimer from the marine sponge-associated fungus *Eurotium cristatum*. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 717–720. [CrossRef]
31. Michael, S.E. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 79. Fuscin, a metabolic product of Oidiodendron fuscum Robak. Part 1. Preparation, properties and antibacterial activity. *Biochem. J.* **1948**, *43*, 528–533. [CrossRef] [PubMed]
32. Andersen, N.R.; Lorck, H.O.B.; Rasmussen, P.R. Fermentation, isolation and characterization of antibiotic PR-1350. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1983**, *36*, 753–760. [CrossRef] [PubMed]
33. Gai, Y.; Zhao, L.L.; Hu, C.Q.; Zhang, H.P. Fusarielin E, a new antifungal antibiotic from *Fusarium* sp. *Chin. Chem. Lett.* **2007**, *18*, 954–956. [CrossRef]
34. Shao, C.; Wang, C.; Wei, M.; Gu, Y.; Xia, X.; She, Z.; Lin, Y. Structure elucidation of two new xanthone derivatives from the marine fungus *Penicillium* sp. (ZZF 32#) from the South China Sea. *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 1066–1069. [PubMed]
35. Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. Lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F44. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2009**, *57*, 1100–1102. [CrossRef] [PubMed]
36. Gao, S.-S.; Li, X.-M.; Li, C.-S.; Proksch, P.; Wang, B.-G. Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2894–2897. [CrossRef] [PubMed]
37. Park, M.S.; Fong, J.J.; Oh, S.-Y.; Kwon, K.K.; Sohn, J.H.; Lim, Y.W. Marine-derived Penicillium in Korea: Diversity, enzyme activity, and antifungal properties. *Antonie van Leeuwenhoek* **2014**, *106*, 331–345. [CrossRef] [PubMed]
38. Hussain, H.; Drogies, K.-H.; Al-Harrasi, A.; Hassan, Z.; Shah, A.; Rana, U.A.; Green, I.R.; Draeger, S.; Schulz, B.; Krohn, K. Antimicrobial constituents from endophytic fungus *Fusarium* sp. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2015**, *5*, 186–189. [CrossRef]
39. Wen, L.; Lin, Y.-C.; She, Z.-G.; Du, D.-S.; Chan, W.-L.; Zheng, Z.-H. Paeciloxanthone, a new cytotoxic xanthone from the marine mangrove fungus *Paecilomyces* sp. (Tree1-7). *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2008**, *10*, 133–137. [CrossRef] [PubMed]

40. Mosadeghzad, Z.; Zuriati, Z.; Asmat, A.; Gires, U.; Wickneswari, R.; Pittayakhajonwut, P.; Farahani, G.H.N. Chemical components and bioactivity of the marine-derived fungus *Paecilomyces* sp. Collected from Tinggi Island, Malaysia. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49*, 621–625. [CrossRef]
41. Lou, J.; Fu, L.; Luo, R.; Wang, X.; Luo, H.; Zhou, L. Endophytic fungi from medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activity. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2013**, *7*, 5343–5349.
42. Sakthivel, N.; Gnanamanickam, S. Isolation of and assay for cerulenin produced by sheath rot pathogen, *Sarocladium oryzae* (Saw.) Gams. *Curr. Sci.* **1986**, *55*, 988–989.
43. Tschen, J.S.-M.; Chen, L.-L.; Hsieh, S.-T.; Wu, T. Isolation and phytotoxic effects of helvolic acid from plant pathogenic fungus *Sarocladium oryzae*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **1997**, *38*, 251–256.
44. Martín-Rodríguez, A.J.; Reyes, F.; Martín, J.; Pérez-Yépez, J.; León-Barrios, M.; Couttolenc, A.; Espinoza, C.; Trigos, Á.; Martín, V.S.; Norte, M.; *et al.* Inhibition of bacterial quorum sensing by extracts from aquatic fungi: First report from marine endophytes. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5503–5526. [CrossRef] [PubMed]
45. Wang, Y.; Zheng, J.; Liu, P.; Wang, W.; Zhu, W. Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1368–1378. [CrossRef] [PubMed]
46. Julianti, E.; Oh, H.; Jang, K.H.; Lee, J.K.; Lee, S.K.; Oh, D.-C.; Oh, K.-B.; Shin, J. Acremostrictin, a highly oxygenated metabolite from the marine fungus *Acremonium strictum*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2592–2594. [CrossRef] [PubMed]
47. Li, D.; Xu, Y.; Shao, C.-L.; Yang, R.-Y.; Zheng, C.-J.; Chen, Y.-Y.; Fu, X.-M.; Qian, P.-Y.; She, Z.-G.; de Voogd, N.J.; *et al.* Antibacterial bisabolane-type sesquiterpenoids from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 234–241. [CrossRef] [PubMed]
48. Zhang, X.-Y.; Xu, X.-Y.; Peng, J.; Ma, C.-F.; Nong, X.-H.; Bao, J.; Zhang, G.-Z.; Qi, S.-H. Antifouling potentials of eight deep-sea-derived fungi from the South China Sea. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 741–748. [CrossRef] [PubMed]
49. Deshmukh, R.; Mathew, A.; Purohit, H.J. Characterization of antibacterial activity of bikaverin from *Fusarium* sp. HKF15. *J. Biosci. Bioeng.* **2014**, *117*, 443–448. [CrossRef] [PubMed]
50. Shiono, Y.; Ogata, K.; Koseki, T.; Murayama, T.; Funakoshi, T. A cleistanthane diterpene from a marine-derived fusarium species under submerged fermentation. *Z. Für Naturforschung B* **2014**, *65*, 753–756. [CrossRef]
51. Parkes, R.J.; Cragg, B.A.; Wellsbury, P. Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: A review. *Hydrogeol. J.* **2000**, *8*, 11–28. [CrossRef]
52. D'Hondt, S.; Spivack, A.J.; Pockalny, R.; Ferdelman, T.G.; Fischer, J.P.; Kallmeyer, J.; Abrams, L.J.; Smith, D.C.; Graham, D.; Hasiuk, F.; *et al.* Subseafloor sedimentary life in the south Pacific Gyre. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 11651–11656. [CrossRef] [PubMed]
53. Kallmeyer, J.; Pockalny, R.; Adhikari, R.R.; Smith, D.C.; D'Hondt, S. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 16213–16216. [CrossRef] [PubMed]
54. Burkepile, D.E.; Parker, J.D.; Woodson, C.B.; Mills, H.J.; Kubanek, J.; Sobecky, P.A.; Hay, M.E. Chemically mediated competition between microbes and animals: Microbes as consumers in food webs. *Ecology* **2006**, *87*, 2821–2831. [CrossRef]
55. Taylor, M.W.; Hill, R.T.; Piel, J.; Thacker, R.W.; Hentschel, U. Soaking it up: The complex lives of marine sponges and their microbial associates. *ISME J.* **2007**, *1*, 187–190. [CrossRef] [PubMed]
56. Strom, S.L. Microbial ecology of ocean biogeochemistry: A community perspective. *Science* **2008**, *320*, 1043–1045. [CrossRef] [PubMed]
57. Bigelis, R.; He, H.; Yang, H.Y.; Chang, L.-P.; Greenstein, M. Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 815–826. [CrossRef] [PubMed]
58. Hölker, U.; Lenz, J. Solid-state fermentation—Are there any biotechnological advantages? *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 301–306. [CrossRef] [PubMed]
59. Barrios-González, J.; Baños, J.G.; Covarrubias, A.A.; Garay-Arroyo, A. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 179–186. [CrossRef] [PubMed]
60. Bode, H.B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619–627. [CrossRef]

61. Souchothèque. Available online: http://www.univ-brest.fr/souchotheque (accessed on 10 November 2015).
62. Defer, D.; Desriac, F.; Henry, J.; Bourgougnon, N.; Baudy-Floc, H.M.; Brillet, B.; Le Chevalier, P.; Fleury, Y. Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: The bacterial connection. *Fish Shellfish Immunol.* **2013**, *34*, 1439–1447. [CrossRef] [PubMed]

© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons by Attribution (CC-BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Supplementary data : Figure S1

Fungi ID	Depth (cm)	Identification	Genes involved in secondary bioactive metabolites synthesis					Gram-negative Bacteria							Gram-positive Bacteria					Fungi			
			PKS I	PKS III	NRPS	HybPKS	TPS	*E. aerogenes*	*E. coli*	*K. oxytoca*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*V. parahaemolyticus*	*Y. rockeri*	*B. fungorum*	*L. gladii*	*L. monocytogenes*	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*C. albicans*	*A. flavus*	*F. oxysporum*	*F. solani*
1H3-S0-P1(1)	4	*Aspergillus terreus*	✓	✓	✓	×	✓	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-
CB_2	4	*Bjerkandera* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_1	4	*Cladosporium* sp.	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1H3-P0-P1(1)	4	*Fusarium oxysporum*	×	×	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-
1H3-S3-P1	4	*Fusarium oxysporum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1H3-M0-P1(2)	4	*Fusarium oxysporum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_3	4	*Fusarium* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1H3-S0-P1(2)	4	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1H3-M3-P1(2)	4	*Paecilomyces* sp.	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	○	-	○	-
CB_4	4	*Penicillium biloiwiezense*	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-
CB_5	4	*Penicillium biloiwiezense*	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	○	○	○	○	○	○	-	-	-
CB_6	4	*Penicillium biloiwiezense*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-
CB_7	4	*Penicillium biloiwiezense*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	○	-	○	○	○	○	○	○	-
CB_8	4	*Penicillium biloiwiezense*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	○	-	○	-	-	-
CB_9	4	*Penicillium biloiwiezense*	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-
CB_10	4	*Penicillium biloiwiezense*	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-
1H3-S0-P1(5)	4	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1H3-P3-P5(3)	4	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	✓	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1H3-P3-P5(1)	4	*Saroclodium* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1H3-P3-P5(4)	4	*Saroclodium* sp.	×	×	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_12	12	*Bullera unica*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2H5-S0-P7-(3)	12	*Exophiala* sp.	×	✓	×	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2H5-S0-P1	12	*Fusarium oxysporum*	✓	✓	×	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-
2H5-P0-P1	12	*Fusarium* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2H5-P3-P1	12	*Fusarium* sp.	✓	×	×	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_14	12	*Microascus cirrosus*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2H5-M3-P2(3)	12	*Penicillium chrysogenum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-
CB_11	12	*Penicillium chrysogenum*	×	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-
CB_13	12	*Penicillium* sp.	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2H5-S3-P2	12	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	×	×	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2H5-S0-P7-(2)	12	*Saroclodium* sp.	✓	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
3H5-P0-P6(2)	21	*Acremonium* sp.	✓	×	×	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3H5-P0-P6(3)	21	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	×	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3H5-P0-P6(4)	21	*Meyerozyma guilliermondii*	×	×	×	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3H5-P3-P6(3)	21	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_16	21	*Penicillium* sp.	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	○	○	-	-	-	-
3H5-M3-P2(2)	21	*Penicillium chrysogenum*	✓	×	×	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3H5-M3-P2(1)	21	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3H5-P3-P6(1)	21	*Saroclodium* sp.	✓	✓	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
3H5-S0-P6(1)	21	*Saroclodium* sp.	✓	×	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-S3-P7-(3)	25	*Acremonium* sp.	×	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-P0-P1(1)	25	*Fusarium oxysporum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-
4H1-P3-P3	25	*Fusarium oxysporum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	○	-	-	-
4H1-P3-P1(1)	25	*Fusarium oxysporum*	×	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-S0-P1(2)	25	*Fusarium oxysporum*	×	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-S0-P1(3)	25	*Fusarium oxysporum*	×	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-S3-P1	25	*Fusarium oxysporum*	✓	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-S0-P1(4)	25	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-M0-P3(2)	25	*Meyerozyma guilliermondii*	×	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-P0-P1(2)	25	*Paecilomyces* sp.	×	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-P3-P1(2)	25	*Penicillium* sp.	✓	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-S0-P3(3)	25	*Penicillium* sp.	×	✓	×	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-S0-P5(1)	25	*Penicillium* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-M0-P3(3)	25	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4H1-S0-P3(2)	25	*Saroclodium* sp.	✓	✓	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-M3-P8-(1)	34	*Acremonium* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-S3-P4(2)	34	*Acremonium* sp.	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P3-P5(1)	34	*Acremonium* sp.	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P0-P7-(3)	34	*Acremonium* sp.	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_19	34	*Cladophialophora bantiana*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_20	34	*Cladosporium* sp.	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P0-P7-(2)	34	*Exophiala* sp.	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-S0-P1(3)	34	*Fusarium oxysporum*	✓	×	×	✓	✓	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P0-P1(1)	34	*Fusarium oxysporum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P0-P1(3)	34	*Fusarium oxysporum*	×	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-S0-P5(1)	34	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_17	34	*Penicillium chrysogenum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-
CB_18	34	*Penicillium chrysogenum*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P0-P5(3)	34	*Penicillium* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-M0-P8-(2)	34	*Penicillium* sp.	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P3-P7-(2)	34	*Phialophora* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-S3-P4(3)	34	*Purpureocillium lilacinum*	×	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P3-P5(3)	34	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P0-P5(1) bis	34	*Sistotrema brinkmannii*	✓	×	✓	×	×	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P0-P5(1)	34	*Sistotrema brinkmannii*	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H1-P0-P5(2)	34	*Trametes versicolor*	✓	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_23	34	*Uncultured Agaricomycetes*	×	×	✓	✓	×	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_21	34	*Uncultured Agaricomycetes*	✓	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_22	34	*Uncultured Agaricomycetes*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H3-M0-P8-(2)	37	*Acremonium* sp.	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_26	37	*Cladophialophora bantiana*	✓	×	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_33	37	*Eurotium herberiorum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-
5H3-P0-P4(4)	37	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	×	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H3-S0-P6(2)	37	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	×	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_24	37	*Penicillium chrysogenum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-	-	-	-
CB_31	37	*Penicillium chrysogenum*	✓	×	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_29	37	*Penicillium* sp.	✓	✓	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H3-P0-P4(5)	37	*Rhodotorula mucilaginosa*	×	×	×	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5H3-M3-P2	37	*Saroclodium* sp.	✓	✓	×	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	-
5H3-P3-P2(1)	37	*Sistotrema brinkmannii*	✓	✓	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15H4-P0-P1(1)	137	*Aspergillus fumigatus*	✓	×	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15H4-P3-P1(1)	137	*Fusarium* sp.	✓	×	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15H4-P3-P1(2)	137	*Fusarium* sp.	×	✓	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15H4-P0-P1(4)	137	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	✓	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15H4-P0-P5(2)	137	*Meyerozyma guilliermondii*	✓	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15H4-P0-P1(2)	137	*Penicillium chrysogenum*	✓	×	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15H4-P0-P5(1)	137	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	✓	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15H4-P3-P3	137	*Sistotrema brinkmannii*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48X3-P3-P1(2)	403	*Aspergillus fumigatus*	✓	×	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	○	-	-	○	-	-	-	-	-
48X3-P0-P7(2)	403	*Fusarium solani*	✓	✓	×	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48X3-M0-P6	403	*Fusarium* sp.	✓	✓	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48X3-P3-P1(1)	403	*Penicillium chrysogenum*	✓	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48X3-S0-P7(1)	403	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	✓	×	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48X3-S3-P8	403	*Rhodotorula mucilaginosa*	×	✓	✓	×	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_35	403	*Sistotrema brinkmannii*	✓	✓	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88X1-S0-P6(2)	765	*Fusarium* sp.	✓	✓	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_36	765	*Oidiodendron griseum*	✓	✓	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	○	○	○	○	○	-	-	-	-
88X1-S0-P6(1)	765	*Rhodotorula mucilaginosa*	✓	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88X1-P3-P8(2)	765	*Rhodotorula mucilaginosa*	×	×	✓	×	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_37	1884	*Sistotrema brinkmannii*	×	×	✓	✓	×	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure S1. Antimicrobial screening of 110 deep soil-seafloor fungi. ✓ presence, or × absence of genes coding PKS I, PKS III, NRPS, PKS-NRPS and TPS.

Hazy inhibition zone ○ ○ ○ ○

mm of inhibition 1 2 3 4

Clear inhibition zone ○ ○ ○ ○

CHAPITRE 3

Métabolites bioactifs produits par *Oidiodendron griseum* UBOCC-A-114129 isolé de sédiments marins profonds

Bioactive metabolites from the deep subseafloor fungus *Oidiodendron griseum* UBOCC-A-114129

Marion Navarri, Arnaud bondon, Sandrine Pottier, Stéphane Bach, Blandine Baratte, Sandrine Ruchaud, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud, Yannick Fleury. *Marine Drugs*

En préparation

Isolé à 765 mètres sous la surface du plancher océanique, *O. griseum* UBOCC-A-114129 représente l'isolat produisant des métabolites antimicrobiens le plus profond de cette collection et à notre connaissance le plus profond jamais décrit. Cet isolat apparait comme le plus original de cette collection, les autres espèces majoritairement affiliées aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium* étant communément décrits en milieu marin comme les principaux producteurs de métabolites bioactifs (Imhoff, 2016). De ce fait, nous avons focalisés nos travaux sur à cette souche d'*O. griseum* et ses métabolites secondaires antimicrobiens.

Après 14 jours d'incubation en milieu PDA 0,2%, à 25°C, sous agitation à 25°C, le surnageant de culture a été collecté et une extraction sur colonne SPE C-18 a été réalisée. Les deux fractions obtenues après élution par de l'acétonitrile à 10% puis à 90% en présence de 0,1% TFA, ont été lyophilisées puis leur activité antimicrobienne a été évaluée sur la bactérie cible la plus sensible, *Enterococcus faecalis* (chapitre 2). L'activité antibactérienne n'a été détectée que dans la fraction résultant de l'élution avec 90% d'acétonitrile. Cette fraction a été analysée et fractionnée par HPLC en phase inverse. L'activité antimicrobienne des différentes sous-fractions a été détectée dans les fractions dont les temps de rétentions (tr) sont 25, 26 et 30 min. Après optimisation du gradient d'élution, la purification des composés bioactifs a été menée. La caractérisation structurale par RMN a révélé la présence de la fuscine (1) et dihydrofuscine (2) co-éluées dans le même pic d'absorbance (tr=13,8min), la dihydrosecofuscine (3) (tr=15,3min) et de la secofuscine (4) (tr=23,1 min).

Ces 4 métabolites produits par *O griseum* UBOCC-A-114129*.,* ont été décrits chez d'autres champignons tels que *Potebniamyces gallicola*, un champignon terrestre. Seules la fuscine et la dihydrofuscine ont été précédemment décrites comme des métabolites bioactifs de champignons appartenant au genre *Oidodendron* (*O. fuscum*, et *O. griseum)*. La fuscine et ses dérivés sont les métabolites amphiphiles majoritairement produits par la souche UBOCC-A-114129 en phase stationnaire. Une étude a suggéré que la dihydrosecofuscine était un intermédiaire dans la biosynthèse de la fuscine. Les cinétiques de production des 4 métabolites évoluent de façon identique et présentent un maximum de production atteint vers 18 jours de culture.

Alors que la fuscine et la dihydrofuscine ont été décrites comme des métabolites antibactériens produits par *O. fuscum*, aucune activité biologique n'a été reportée dans la littérature pour la secofuscine

et dihydrosecofuscine. De ce fait, l'activité antibactérienne a été évaluée. Ainsi, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées sur un panel de 9 bactéries, en suivant les lignes directrices de la norme CLSI-M07-A9. Une faible activité antibactérienne (CMI de l'ordre de 100µg/mL) a été détectée sur les bactéries à Gram-positif. Cette faible activité est, néanmoins, significative puisque un mode d'action bactéricide a été mis en évidence aux concentrations identiques à la CMI contre *S. aureus*, *S. aureus* résistant à la méthicilline, *A. baumannii* et *K. pneumoniae*. Néanmoins, cette activité est plus faible que celle d'autres polycétides isolés de champignons marins.

Nous avons également évalué l'activité d'inhibition de kinase de la dihydrosecofuscine. Un criblage sur un panel de 12 kinases a permis de révéler l'activité anti-kinase de la dihydrosecofuscine sur la CLK1. L'IC_{50} a été déterminée à 15,56µg/mL et est comparable à d'autres inhibiteurs de kinase, tels que les hypochromines A et B, isolées de champignons marins affiliées à l'espèce *Hypocrea vinosa*. La CLK1 est impliquée dans la maladie d'Alzheimer et représente une cible intéressante dans la lutte contre cette maladie neurodégénérative. Bien que l'IC_{50} obtenue pour la dihydrosecofuscine soit nettement inférieure aux inhibiteurs de kinase les plus efficaces, cette molécule peut représenter un nouveau modèle de structure moléculaire pour de nouvelles molécules thérapeutiques.

O. griseum UBOCC-A-114129 représente la souche antimicrobienne la plus profonde de la collection et plus globalement la plus profonde jamais décrite. Bien que les composés purifés aient déjà été isolés précédemment, ce travail décrit pour la première fois leur production par une espèce marine d'*Oidiodendron*. De plus, cette étude a mis en évidence une nouvelle activité biologique d'inhibition de kinase jusqu'alors inexploré pour ces molécules.

marine drugs

MDPI

Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Bioactive metabolites from the deep subseafloor fungus *Oidiodendron griseum* UBOCC-A-114129

Marion Navarri[1], Arnaud bondon[2], Sandrine Pottier[2], Stéphane Bach[3], Blandine Baratte[3], Sandrine Ruchaud[3], Georges Barbier[1], Gaëtan Burgaud[1], Yannick Fleury[1]*

[1] marion.navarri@univ-brest.fr; Georges.barbier@univ-brest.fr; Gaetan.burgaud@univ-brest.fr; Yannick.fleury@univ-brest.fr

[2] arnaud.bondon@univ-rennes1.fr; sandrine.pottier@univ-rennes1.fr

[3] bach@sb-roscoff.fr; baratte@sb-roscoff.fr; sruchaud@sb-roscoff.fr

* Yannick.fleury@univ-brest.fr; Tel.: +33-298-641-935

Academic Editor: name
Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Four bioactive compounds have been isolated from the fungus *Oidiodendron griseum* UBOCC-A-114129 cultivated from deep subsurface sediment. They were structurally characterized using a combination LC-MS/MS and NMR analyses as Fuscin and derivatives (dihydrofuscin , dihydrosecofuscin and secofuscin) and identified as polyketides. Albeit those compounds were already obtained from terrestrial fungi, this is the first report of their production by a *Oidiodendron* species and moreover by a the deepest subseafloor isolate ever studied for biological activities. We report a weak antibacterial activity of dihydrosecofuscin and secofuscin mainly directed against Gram-positive bacteria (MIC = MBC, in the range of 100μg/mL). The activity of kinase inhibition was also screened. It has revealed an inhibition of CLK1 by dihysecofuscin at relatively low concentration ((IC$_{50}$=15.56μg/mL).

Keywords: deep subseafloor fungi; bioactivities; antibacterial, anti-kinase

1. Introduction

The Ocean harbors a tremendous diversity of habitats, ranging from coastal waters to the deep biosphere, where microorganisms, through their biotic and abiotic interactions, are the major actors of the biogeochemical processes [1,2]. Bacteria, Archaea and protists are the most commonly documented microorganisms in the marine environment. However, recent studies strongly support the idea that marine microbial communities also host fungi as an important component in different kind of habitats, including the deep biosphere [3]. Deep subseafloor sediment microbial communities are in constant interactions though the production of a wide array of secondary metabolites, as recently revealed using metatranscriptomics [4,5]. If a huge number of marine microorganisms is able to produce a wide array of bioactive metabolites and has consequently received a great attention in the search of natural compounds [6–8], the deep biosphere still appears as an untapped reservoir.

Recently, an exhaustive culture-based approach allowed us to isolate 183 deep subsurface marine fungi [3]. An antimicrobial screening on 110 of those fungal isolates highlighted 33% of strains with antimicrobial properties [9]. Among those 110 fungal isolates, 14 were considered as promising based on their antimicrobial activities and finally the strain *Oidiodendron griseum* CB_36 UBOCC-A-114129 (isolated at 765 meters below the sea floor) was selected for further investigation since it appeared as the bioactive strain with the deepest origin known to date.

In this study, the bioactive metabolites of *O. griseum* CB_36 were investigated using a bioguided fractionation. Four antimicrobial compounds have been characterized using NMR: Fuscin (1), dihydrofuscin (2), dihydrosecofuscin (3) and secofuscin (4). Surprisingly, although those structures are known for years from terrestrial fungi [10,11], no biological activity has been ever described to the best of our knowledge for secofuscin and dihydrosecofuscin.

Antimicrobial resistance represents an increasing threat jeopardizing global public health. The antibiotic resistance crisis has been partly attributed to the lack of new drug development by the pharmaceutical industry. The "old" chemical structures discovered during the Golden age of antibiotic and abandoned because of their toxicity or lack of efficiency are currently re-investigated for therapeutic use, such as polymyxins, fosfomycin, fusidic acid or chloramphenicol [12]. Therefore, we re-analyzed biological properties of fuscin and its derivatives using recent technologies. We described herein their antibacterial activity but also their ability to inhibit kinase enzyme activity. Our results suggest that these old known structures may not be obsolete for biotechnological applications.

2. Results

2.1. Purification and Characterization of the bioactive compounds produced by O. griseum UBOCC-A-114129

Cell-free culture supernatant resulting from a 14 day-long incubation culture of *O. griseum* UBOCC-A-114129 was subjected to a solid phase extraction step using C-18 cartridge. After a first washing step using 10% acetonitrile (ACN) + 0.07% Trifluoroacetic acid (TFA), elution were performed using 90% ACN + 0.07% TFA (F10-90). Both extracts (F0-10 and F10-90) were freeze-dried and solubilized in 20% ACN.

Antimicrobial activities were only recovered in the F10-90 extract supporting previous data [9]. The F10-90 extract was afterward analyzed by RP-HPLC (Figure 1). Fractions were collected along the elution, freeze-dried, resolubilized in 20% ACN and assayed for antimicrobial activity. Only, three fractions eluted from 24 min to 32 min exhibited antimicrobial activity against *E. faecalis* (Figure 1).

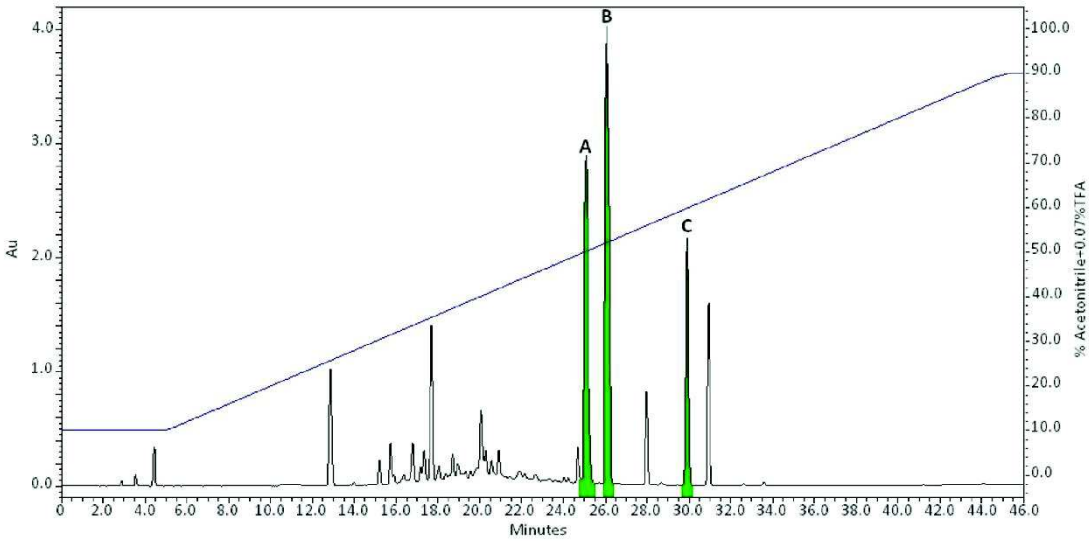


Figure 1. RP-HPLC analysis of the F10-90 fractions. Elution was performed using a linear gradient of ACN+0.07%TFA (blue line). The chromatogram represents the max plot recorded between 220 and

600 nm. Peaks exhibiting antimicrobial activity are overlaid in green. Bioactive compounds were numerated according to their elution order.

Purification of bioactive compounds was performed according to a linear gradient of ACN+0.07%TFA and leads to 4 compounds with antimicrobial properties against *E. faecalis*. LC/ESIMS analyses of the peak A revealed a co-elution of 2 compounds named **1** (m/z 277 [M+H]+) and **2** (m/z = 279 [M+H]+). They were obtained together as dark orange powder. The compound 3 (m/z 279 [M+H]+, white powder) and 4 (m/z 277 [M+H]+, dark orange powder) were eluted under the peak B and C, respectively.

Structural elucidations were conducted by NMR. The bioactive compounds isolated from *O. griseum* UBOCC-A-114129 were identified as fuscin (1), dihydrofuscin (2), dihydrosecofuscin (3) and secofuscin (4) (Figure 2). Fuscin and its derivatives characterized here appear as already known fungal compounds. Fuscin and dihydrofuscin have been isolated from *Oidiodendron fuscum* Robak, isolated from soil [10], the phytopathogenic fungus *Potebniamyces gallicola* n. sp.[11] and from *Oidiodendron griseum*, isolated from soil [13]. Fuscin and dihydrofuscin were described as antibacterial metabolites [10]. However secofuscin and dihydrosecofuscin, previously isolated from *P. gallicola* n. sp. [11], were not described for any kind of bioactivity.

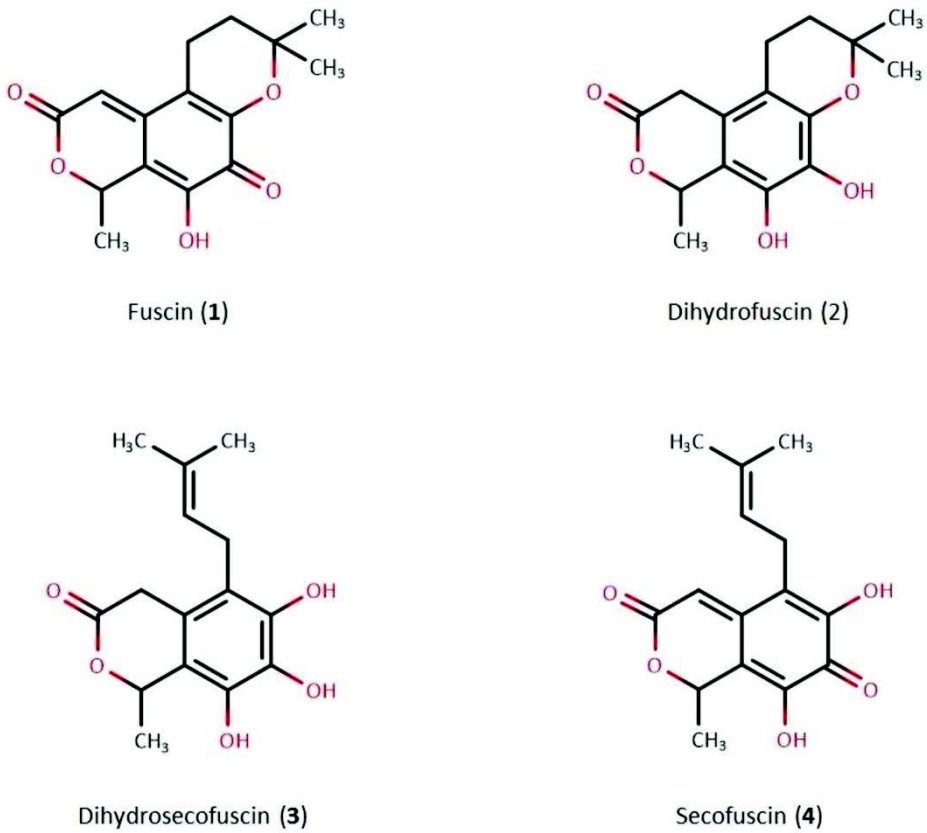


Figure 2. Chemical structures of the bioactive compounds produced by *O. griseum* CB_36

Interestingly fuscin and its derivatives were clearly the main amphiphilic metabolites produced by the strain of *O. griseum* since they represented almost 68% of the area of the chromatogram.

2.2 Kinetics of fuscin derivative production

The fungal biomass and the production of fuscin derivatives were quantified over time. Fuscin and its derivatives were only detected when *O. griseum* UBOCC-A-114129 reached the stationary phase of fungal growth. Fuscin and its derivatives were detected after 7 days of culture at 25°C and their production increased and achieved a maximal production after 18 days of culture. To date, the ecological role of these compounds is still unknown. Nevertheless, such a constitutive production during the stationary phase is commonly described for antimicrobial metabolites, such as citrinin produced by *Penicillium chrysogenum* [14].

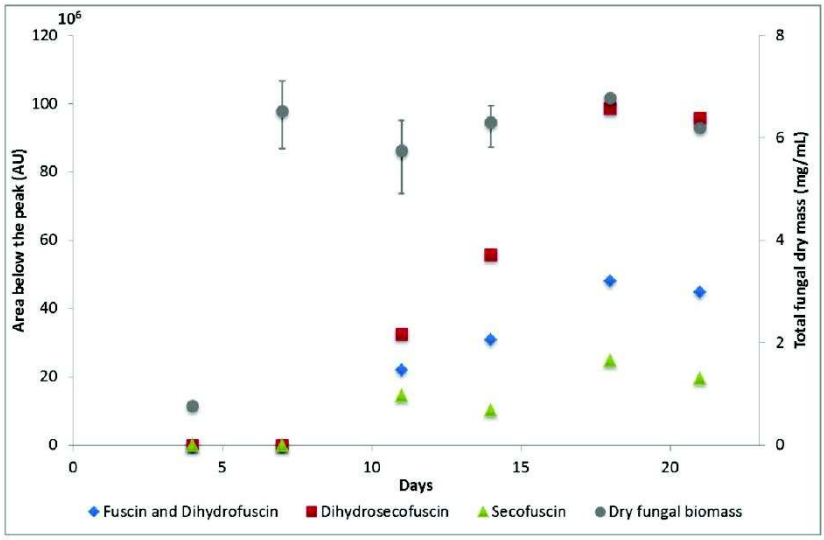


Figure 3. Kinetics of growth of *O. griseum* UBOCC-A-114129 and of fuscin and derivatives production. The latter was quantified by the area below the elution peak detected by RP-HPLC after SPE extraction of the cell-free supernatant.

2.3. Biological activities

2.3.1 Antimicrobial activity

We investigated the antimicrobial activity of secofuscin and dihydrosecofuscin since these metabolites (HPLC fractions) exhibited antimicrobial activity against *E. faecalis*. Their minimal inhibitory concentrations (MIC) were defined in accordance with the international standards (CLSI guidelines M7-A09) against a panel of 9 bacterial targets. The MIC of positive controls, in agreement with MIC listed by CLSI, validated the MIC values of secofuscin and dihydrosecofuscin. A weak antibacterial activity was detected (MIC in the range of 100μg/mL). To get insights into the antibacterial mode of action (bactericidal versus bacteriostatic), 5 μL of suspension at MIC and MIC/2 was dropped onto Tryptone Soy Agar (TSA) medium and incubated at the optimal temperature for bacterial target growth. Interestingly, these compounds were not only bacteriostatic but also bactericidal at MIC for *S. aureus*, MRSA, *A. baumannii* and *K. pneumoniae* (Table 1)

127 **Table 1**. Antimicrobial activity of isolated compounds. MICs were determined according CLSI
128 guidelines M7-A09. Controls for Gram-negative and Gram-positive bacteria were polymixin B and
129 and erythromycin, respectively. NA: Not Assayed. (*) indicates that a bactericidal mode of action
130 was highlighted

	MIC (µg/mL)		
	Dihydrosecofuscin	Secofuscin	Control
E. faecalis **ATCC 29212**	128-256	>256	4
VRE BM4147	128-256	>256	NA
S. aureus **ATCC 29213**	128*	256*	1-2
MRSA	128*	≥256	NA
S. equinus **NRRL-B-4268**	64-128	256	NA
A. baumannii **CIP70.34T**	128-256*	≥256	NA
E. coli **ATCC 25922**	>256	>256	4
K. pneumoniae **ATCC 8045**	128-256*	>256	NA
P. aeruginosa **ATCC 27853**	≥256	≥256	4

131

132 2.3.2.Enzymatic inhibition of Kinase

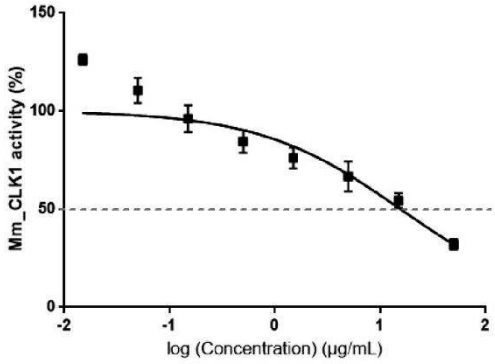
133 Dihydrosecofuscin obtained from *Oidiodendron griseum* UBOCC-A-114129 was assayed on a panel of
134 twelve disease-related kinases. It was first assayed at a final concentration of 50µg/mL. When
135 enzymatic inhibition was lower than 50% (IC50>50µg/ml), dihydrosecofuscin was considered as
136 inactive (Table 2). At 50µg/mL dihydrosecofuscin was able to inhibit by 83% the activity of the
137 CLK1.

138 **Table 2**. Residual kinase activity (%) in the presence of t dihydrosecofuscin (50 µg/mL).

Kinase Compounds	Rn_DYRK1A	Mm_CLK1	Hs_CDK9/ CyclinT	HsCDK5/p25	Hs_CDK2/ CyclinA	Ssc_GSK3a/b	Ssc_CK1	Lm_CK1	Ld_TLK	Hs_PIM1	Hs_Haspin	Hs_RIPK3
Dihydrosecofuscin	63	**17**	69	57	55	57	72	89	nd	86	60	67

139 nd: not determined Bold values showed inhibition of kinase activity at 50µg/mL

140 When kinase inhibition was higher than 50%, the IC50 was defined from the dose response curves
141 using a wide range of concentrations (usually from 0.015µg/ml to 50µg/ml) (Figure 4). The IC_{50} value
142 of diyhdrosecofuscin against CLK1 was estimated at 15.56µg/mL.



143

144 **Figure 4**. Normalized curve of log dose-response for Mm_CLK1 kinase

145

146 **3. Discussion**

147 Ocean covers almost 70% of the earth surface with a wide array of contrasting habitats
148 harboring complex microbial communities. Marine microorganisms were proved to be a great
149 reservoir of secondary bioactive metabolites [15]. Among them, marine fungi represent a potential
150 new reservoir of bioactive natural and sustainable products [16,17]. Deep-sea and subseafloor fungi
151 are the least studied marine fungi and therefore may appear as an untapped diversity with
152 biotechnological potential [18,19]. Indeed, deep sea fungal communities can feed natural
153 compounds libraries with putatively novel structures and mode of actions [20].
154
155 To reveal the chemical structure of the bioactive metabolites, we investigated the deepest fungal
156 strain (765 meters below the sea floor), *O. griseum* UBOCC-A-114129. Fuscin (**1**), dihydrofuscin (**2**),
157 dihydrosecofuscin (**3**) and secofuscin (**4**) were structurally characterized from *O. griseum*
158 UBOCC-A-114129. These compounds have already been described from terrestrial *Oidiodendron*
159 *fuscum* [10], *O. griseum*[13] and *Potebniamyces gallicola* n. sp.[11]. However, to the best of our
160 knowledge, this is the first report of (i) the production of fuscin and its derivatives by a marine
161 fungus in the meantime and (ii) the antimicrobial activity of secofuscin and dihydrosecofuscin.
162
163 The production of fuscin (**1**), dihydrofuscin (**2**), dihydrosecofuscin (**3**) and secofuscin (**4**)
164 occurred after the fungus has completed his growth and can thus be qualified as secondary
165 metabolites [21]. Secondary metabolites are small molecular weight molecules produced by
166 microorganisms to compete with environmental stressing conditions as temperature, pressure,
167 salinity or with other microorganisms [22]. Some of them could be beneficial as antimicrobial or
168 antitumor ones whereas other could be deleterious to human kind (*e.g* mycotoxins) [23].
169 .
170 Dihydrosecofuscin was previously described as a biosynthesic precursor of fuscin [24]. It was
171 here the most produced metabolite and appeared to co-occured with the other derivatives. This is
172 the first report on their co-production in a *Oidiodendron* species. Although fuscin and its derivatives
173 appear as the major metabolites produced during the stationary phase, their ecological role remains
174 to clarify. The chemical structure of those compounds suggested a polyketide, a terpenoid structure
175 or a hybrid of both as suggested by Birch and his colleagues [25]. Previous investigation of genes
176 coding polyketides synthases and terpene synthases revealed the unique presence of polyketide
177 synthases in *O. griseum* UBOCC-A-114129 genome [3] and so likely highlighted the polyketide
178 nature of the bioactive metabolites produced by this isolate.
179

Although fuscin (**1**) and dihydrofuscin (**2**) were previously investigated for antimicrobial activities, no data were available regarding dihydrosecofuscin (**3**) and secofuscin (**4**). MIC values reflected a weak but significant antimicrobial activity. A bactericidal mode of action was also revealed against various Gram-positive bacterial targets.

Finally, dihydrosecofuscin showed *in vitro* inhibition of kinase activity against CLK1. *Penicillium terrestre*, a marine fungus isolated from marine sediment, has also been described for its anti-kinase activity. A 35% inhibition of tyrosine kinases was observed when incubated with 3μg/mL of the bioactive metabolite terrestrol G synthetized by *Penicillium terrestre* [26]. So dihydrosecofuscin weakly inhibited CLK1 activity with an IC_{50} of 15.56 μg/mL. Since this kinase has been reported to be a relevant target in Alzheimer's disease, dihydrosecofuscin may provide a structural pattern for developing new therapeutic drugs.

4. Materials and Methods

4.1. Fungal isolation and identification

Isolation and identification of the fungal isolate selected in this study was described in an earlier report [3]. Briefly, sediment samples were plated onto five low nutrient media with or without sea salts, at different temperatures and different hydrostatic pressures. Subcultures of each colony were performed to obtain pure cultures. Purified isolates were then cryo-preserved on beads at preserved at -80°C.

The sequence analysis of 18SrDNA and ITS genes revealed *Oidiodendron griseum* as the nearest relative of our strain with 99% of similarity in GenBank database under the accession number KM222226. The strain was deposited in the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection under the UBOCC-A-114129 number (www.univ-brest.fr/ubocc)

4.2. Cultivation method and fermentation

One bead was plated onto Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at 25°C for 10 days. Then, the strain was subculture onto PDA for 14 days at 25°C. Six 250-mL Erlenmeyer, containing 50mL of PDB complemented with 0.2% agar (PDA 0.2%), were inoculated with 2 plugs of 4mm diameter cut from the edge of the actively growing culture of 14 days old. They were incubated under rotary shaking (100 rpm) at 25°C for 21 days.

4.3. Kinetics of biomass and metabolite production

The production of biomass and bioactive metabolites were assessed during 21 days. At 4, 7, 11, 14, 18 and 21 days of incubation, antimicrobial assays were performed before extraction of the culture. The culture was filtered under vacuum to separate broth from biomass: (i) The biomass was dried at 58°C for at least one week and then was weighed. (ii) The broth was centrifuged (8000g, 20min, 4°C) and supernatant (25mL) was loaded and fractionated onto Solid Phase Extraction C-18 column. After a washing step, a first elution with 10% acetonitrile+0.07%TFA (Tri Fluoro Acetic acid) (Fraction 0-10), and a second using 90% acetonitrile+0.07% TFA (Fraction 10-90) were performed. The obtained fractions were freeze-dried and suspended into 2.5mL of 20% acetonitrile to obtain a crude extract 10-times concentrated.

4.4. Bio-guided isolation

Antimicrobial assays were performed on *Enteroccocus faecalis* CIP-A-186 as the most sensitive target of this fungal strain [9]. An overnight culture of the target was performed in Trypton Soy

226 broth. Then this culture was diluted and included in Trypton soy Agar (TSA) to obtain 1.0×10^6
227 cfu/mL. Finally, 20μL crude extracts or fractions were dropped into wells, previously performed in
228 the TSA including *E. faecalis*. Inhibition diameter was measured after 24h incubation at 37°C.

229 *4.5. Purification of bioactive compounds*

230 Active extracts were fractionated (each 2 minutes) on a semi-preparative column
231 C18-reverse-phase HPLC (Interchim Uptisphere strategy; 5μm; 250 x 10mm; 4mL/min). A gradient
232 from 20% to 90% acetonitrile+0.07% TFA in water+0.1%TFA over 35 min was used and allowed the
233 isolation of 19 fractions. Antimicrobial activity of those fractions was assessed. The antimicrobial
234 compounds in the F10-90 were then purified using a gradient from 36% to 45% Acetonitrile+0.07%
235 TFA in water+0.1%TFA over 18min (data not shown). It yield to the isolation of compounds 1 and 2
236 which were co-eluted in Fraction 1 (13.8min and 1.2mg), 3 (15.3min and 2.5mg), and 4 (23.1min and
237 0.8mg) with antimicrobial activities.
238

239 *4.6. Characterization/Spectral data*

240 ^{1}H NMR measurements were carried out on a Bruker AVANCE 500 spectrometer with a TCI
241 cryoprobe. The spectra were recorded at 298K. Homonuclear and hetero-nuclear standard pulse of
242 Bruker database were used. Samples were solubilized in d6-DMSO and chemical shift were
243 expressed as ppm.

244 *4.7. Biological activities*

245 4.7.1. Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

246 MIC of Fraction 1, dihydrosecofuscin (3) and secofuscin (4) and commercial fuscin (Adipogen
247 Life Science, USA) were determined using micro-broth dilution methods on *Enterococcus faecalis*
248 ATCC 29212, vancomycin-*resistant Enterococcus faecium* BM4147 (VRE), *Staphylococcus aureus* ATCC
249 29213, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and *Streptococcus equinus* NRRL-B-4268 for
250 Gram-positive bacteria, *Acinetobacter baumannii* CIP70.34T, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella*
251 *pneumoniae* ATCC8045, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 representing Gram-negative
252 bacteria. Experiments were performed as described in CLSI standard M07-A9: methods for dilution
253 antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically [27]. Targets were cryo-preserved
254 at -20°C. Strains were streaked onto Trypton Soy Agar and incubated 24h at 37°C. One colony was
255 suspended into 5mL of Mueller Hinton and incubated 4h at 37°C under rotary shaking. Then a
256 suspension at 1.0×10^6cfu/mL was performed in Mueller-Hinton 2X and then 50μL of this suspension
257 were dispended in 96-wells microplate containing 50μL of our compounds. Final bacterial
258 concentration reached 5.0×10^6cfu/mL, and antibiotic final concentration was 256μg/mL and then
259 two-fold serial dilution to 0.5μg/mL half serial diluted.
260

261 4.7.3. Anti-kinase activity

262
263 Kinase activities were assayed in appropriate kinase buffer, with either protein or peptide as
264 substrate in the presence of 15μM [γ-33P] ATP (3,000Ci/mmol; 10mCi/ml) in a final volume of 30 μl
265 following the assay described in [28]. Controls were performed with appropriate dilutions of
266 dimethylsulfoxide. Full-length kinases are used unless specified. Peptide substrates were obtained
267 from Proteogenix (Oberhausbergen, France). The inhibitory activity of dihydrosecofuscin (3) was
268 assayed on twelve disease-related kinases incubated in appropriate buffer: (i) DYRK1A
269 (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase1A) from Rattus norvegicus; (ii) murine
270 CLK1 (CDC2-like kinase 1); (iii) human CDK9/CyclinT (Cyclin-dependent Kinase 9); (iv) human
271 CDK5/p25; (v) human CDK2/CyclinA; (vi) GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3α/β) from porcine

brain; (vii) CK1 (casein kinase 1) from porcine brain and from the parasite, Leishmania major; (viii) TLK1 (Tousled-like kinase) from the parasite, Leishmania donovani; (ix) human PIM1; (x) human Haspin; (xi) human RIPK3 (receptor-interacting protein kinase-3) (see supplementary data for details on buffer composition and enzymes condition incubation).

5. Conclusions

In this study, we characterized 4 bioactive compounds produced by *O. griseum*, isolated from a sample collected at 765 meters below the sea floor. To our knowledge, this strain is the deepest ever studied for biological activities. Although, all the compounds were previously described from terrestrial fungus, two of them, dihydrosecofuscin and secofuscin, were not previously described as bioactive ones. Here we investigated their biological activities and showed their antibacterial activities against Gram-positive bacteria, with bactericidal mode of action. Moreover, dihydrosecofuscin inhibited CLK1 kinase activity with IC_{50}=15.56μg/mL, highlighting a possible interest for putative applications in human disease treatment such as Alzheimer. Such compounds, especially dihydrosecofuscin, could represent new structural patterns in the search for new bioactive compounds to fight antimicrobial resistance and neurodegenerative disease threats. Albeit no new structures were revealed here for *Oidiodendron griseum* UBOCC-A-114129, the collection of deep subsurface isolates still represents an untapped reservoir of bioactive compounds since many other promising isolates remained to be screened for their secondary metabolites.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/link, NMR spectral data of identified compounds and Buffer composition for anti-kinase activity

Acknowledgments: This research project is a part of the European project MaCuMBA (Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving Their Biotechnological Applications) and has been founded by the European Union's Seventh Framework Programme (FP7 /2007-2013) under grant agreement no 311975 and Brittany region under grant agreement 8433. Thanks to PRISM and KISSf, for NMR and kinase activity analysis, respectively. Thanks to Amélie Weil who cultivated strains after preservation, and Denis Rousseaux for giving liquid nitrogen.

Author Contributions: "All authors conceived and designed the experiments; Marion Navarri, Yannick Fleury Arnaud bondon, Sandrine Pottier, Stéphane Bach, Blandine Baratte, Gaëtan Burgaud and performed the experiments; All authors analyzed the data; All authors wrote the paper."

Conflicts of Interest: "The authors declare no conflict of interest."

References

1. Gadd, G. M. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **2010**, *156*, 609–643.

2. Arnosti, C. Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2011**, *3*, 401–425.

3. Rédou, V.; Navarri, M.; Meslet-Cladière, L.; Barbier, G.; Burgaud, G. Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 3571–3583.

4. Orsi, W. D.; Edgcomb, V. P.; Christman, G. D.; Biddle, J. F. Gene expression in the deep biosphere. *Nature* **2013**, *499*, 205–208.

5. Pachiadaki, M. G.; Rédou, V.; Beaudoin, D. J.; Burgaud, G.; Edgcomb, V. P. Fungal and prokaryotic activities in the marine subsurface biosphere at peru margin and canterbury basin inferred from RNA-Based analyses and microscopy. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 846.

6. Haefner, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 536–544.

7. Fenical, W.; Jensen, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 666–673.

8. Pettit, R. K. Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. *Mar. Biotechnol.* **2011**, *13*, 1–11.

9. Navarri, M.; Jégou, C.; Meslet-Cladière, L.; Brillet, B.; Barbier, G.; Burgaud, G.; Fleury, Y. Deep subseafloor fungi as an untapped reservoir of amphipathic antimicrobial compounds. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 50.

10. Michael, S. E. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 79. Fuscin, a metabolic product of *Oidiodendron fuscum* Robak. Part 1. Preparation, properties and antibacterial activity. *Biochem. J.* **1948**, *43*, 528–533.

11. Boulet, C. A.; Poulton, G. A. Pentaketide metabolites from *Potebniamyces gallicola* n. sp. *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 2285–2286.

12. Falagas, M. E.; Grammatikos, A. P.; Michalopoulos, A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2008**, *6*, 593–600.

13. Yoganathan, K.; Rossant, C.; Ng, S.; Huang, Y.; Butler, M. S.; Buss, A. D. 10-Methoxydihydrofuscin, fuscinarin, and fuscin, novel antagonists of the human CCR5 receptor from *Oidiodendron griseum*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1116–1117.

14. Devi, P.; D'Souza, L.; Kamat, T.; Rodrigues, C.; Naik, C. G. Batch culture fermentation of *Penicillium chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. *IJMS Vol381 March 2009* **2009**.

15. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 382–431.

16. Ebada, S. S.; Proksch, P. Marine-derived fungal metabolites. In *Springer Handbook of Marine Biotechnology*; Prof, S.-K. K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 2015; pp. 759–788.

17. Rateb, M. E.; Ebel, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 290.

18. Yu, Z.; Lang, G.; Kajahn, I.; Schmaljohann, R.; Imhoff, J. F. Scopularides A and B, cyclodepsipeptides from a marine sponge-derived fungus, *Scopulariopsis brevicaulis*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1052–1054.

19. Vansteelandt, M.; Blanchet, E.; Egorov, M.; Petit, F.; Toupet, L.; Bondon, A.; Monteau, F.; Le Bizec, B.; Thomas, O. P.; Pouchus, Y. F.; Le Bot, R.; Grovel, O. Ligerin, an antiproliferative chlorinated sesquiterpenoid from a marine-derived *Penicillium* Strain. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 297–301.

20. Wang, Y.-T.; Xue, Y.-R.; Liu, C.-H. A brief review of bioactive metabolites derived from deep-sea fungi. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4594–4616.

21. Calvo, A. M.; Wilson, R. A.; Bok, J. W.; Keller, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 447–459.

22. Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, J. W. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 937–947.

23. Shephard, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Addit. Contam. Part A* **2008**, *25*, 146–151.

24. Pyuskyulev, B.; Rindone, B.; Scolastico, C. A new synthesis of fuscin. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 2849–2850.

25. Birch, A. J.; Massy-Westropp, R. A.; Rickards, R. W.; Smith, H. 66. Studies in relation to biosynthesis. Part XIII. Griseofulvin. *J. Chem. Soc. Resumed* **1958**, 360–365.

26. Chen, L.; Fang, Y.; Zhu, T.; Gu, Q.; Zhu, W. Gentisyl alcohol derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 66–70.

27. CLSI, F. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition; *Clinical and Laboratory Standards Institute.*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pa., 2012.

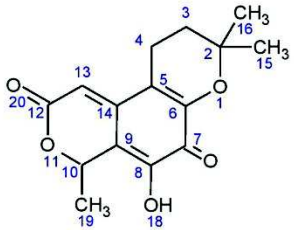
28. Bach, S.; Knockaert, M.; Reinhardt, J.; Lozach, O.; Schmitt, S.; Baratte, B.; Koken, M.; Coburn, S. P.; Tang, L.; Jiang, T.; Liang, D.-C.; Galons, H.; Dierick, J.-F.; Pinna, L. A.; Meggio, F.; Totzke, F.; Schächtele, C.; Lerman, A. S.; Carnero, A.; Wan, Y.; Gray, N.; Meijer, L. Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31208–31219.

© 2016 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

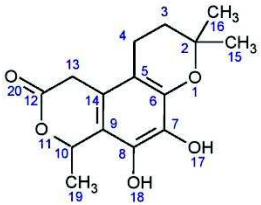
Supplementary Data : NMR Spectral Data

	Fuscin		Dihydrofuscin	
Atome	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H
2	76,9		75,6	
3	31,5	1,87 (br t) J=6,7Hz	32,6	1,85 (br t) J=6,4Hz
4	18	2,61 (m)	18,7	2,51 (m) et 2,61 (m)
5	116,4		109,9	
6	147,1		141,1	
7	175,5		130,5	
8	142,1		137,3	
9	114,4		114,1	
10	72,5	5,73 (q) J=6,7Hz	74,3	5,83 (q) J=6,8Hz
12	163,0		170,9	
13	117,2	6,35 (s)	30,6	3,43 (d) J=19,8Hzet 3,66 (d) J=19,8Hz
14	139,9		118,0	
15	26,2	1,39 (s)	26,3	1,33 (s)
16	26,6	1,42 (s)	27,0	1,37 (s)
17				5,32 (s)
18		6,90 (br s)		5,29 (s)
19	22,4	1,60 (d) J=6,7Hz	22	1,57 (d) J=6,8Hz

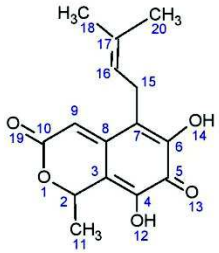
	Secofuscin		Dihydrosecofuscin	
Atome	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H
2	72,7	5,76 (q) J=6,6Hz	74,0	5,84 (q) J=6,8Hz
3	117,1		115,1	
4	141,2		138,3	
5	175,3		130,5	
6	145,8		142,1	
7	121,3		115,8	
8	139,4		118,7	
9	121,2	6,52 (s)	31,3	3,49 (d) J=19,6Hz et 3,76 (d) J=19,6Hz
10	162,6		170,6	
11	22,6	1,60 (d) J=6,6Hz	21,9	1,57 (d) J=6,8Hz
12		6,62 (s)		5,24 *(br s)
13				5,32* (br s)
14		6,67 (s)		5,46* (br s)
15	23,5	3,35 (br d) J=6,8Hz	25,0	3,27 (br d) J=7,0Hz
16	120,2	5,07 (tspt) J=6,8Hz et J=1,5Hz	120,9	5,14 (tspt) J=7,0Hz et J=1,5Hz
17	134,3		136,6	
18	18,1	1,78 (br d) J=1,5Hz	18,1	1,84 (br d) J=1,5Hz
20	25,7	1,71 (br d) J=1,5Hz	25,8	1,78 (br d) J=1,5Hz
			*may be interchanged	



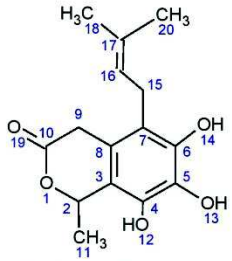
Fuscin



Dihydrofuscin



Secofuscin



Dihydrosecofuscin

Supplementary Data

Anti-kinase activity

– Buffer composition

Buffer A: 10mM MgCl2, 1mM EGTA, 1mM DTT, 25mM Tris-HCl pH 7.5, 50μg/ml heparin;

Buffer B: 60mM β-glycerophosphate, 30mM p-nitrophenyl-phosphate, 25mM MOPS (pH 7), 5mM EGTA, 15 mM MgCl2, 1mM DTT, 0.1mM sodium orthovanadate;

Buffer H: MOPS 25mM pH 7.5, 10mM MgCl2;

Buffer K: Tris 50mM pH 7.5, 20mM MgCl2, 2mM MnCl2;

Buffer R: 1.67mM MOPS pH 7.2, 0.83mM ◎-glycerophosphate, 1.33mM MgCl2, 0.83mM MnCl2, 0.33mM EGTA, 0.13mM EDTA, 16.67μg/ml BSA, 0.017mM DTT

– Kinases Incubation :

*Hs*RIPK3 (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) was assayed in buffer R with 0.1 μg/μl of MBP as substrate.

*Hs*PIM1_(human proto-oncogene, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer B with 0.8 μg/μl of histone H1 (Sigma #H5505) as substrate.

*Hs*Haspin-kd (human, kinase domain, amino acids 470 to 798, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer H with 0.007 μg/μl of Histone H3 (1-21) peptide (ARTKQTARKSTGGKAPRKQLA) as substrate;

*Hs*CDK2/CyclinA_(cyclin-dependent kinase-2, human, kindly provided by Dr. A. Echalier-Glazer, Leicester, UK) was assayed in buffer A (+ 0.15 mg/ml of BSA + 0.23 mg/ml of DTT) with 0.8 μg/μl of histone H1 as substrate.

*Hs*CDK9/CyclinT (human, recombinant, expressed by baculovirus in Sf9 insect cells) was assayed in buffer A (+ 0.15 mg/ml of BSA + 0.23 mg/ml of DTT) with 0.27 μg/μl of the following peptide: YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK, as substrate.

*Hs*CDK5/p25 (human, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer B, with 0.8 μg/μl of histone H1 as substrate.

*Ssc*GSK-3α/β (glycogen synthase kinase-3, porcine brain, native, affinity purified) was assayed in buffer A (+ 0.15 mg/ml of BSA + 0.23 mg/ml of DTT), with 0.010 μg/μl of GS-1 peptide, a GSK-3-selective substrate (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE, "Sp" stands for phosphorylated serine).

*Ssc*CK1δ/ε (casein kinase 1δ/ε, porcine brain, native, affinity purified) was assayed in buffer B, with 0.022 μg/μl of the following peptide: RRKHAAIGSpAYSITA as CK1-specific substrate.

*Rn*DYRK1A-kd (*Rattus norvegicus,* amino acids 1 to 499 including the kinase domain, recombinant, expressed in bacteria, DNA vector kindly provided by Dr. W. Becker, Aachen, Germany) was assayed in buffer A (+0.5 mg/ml of BSA + 0.23 mg/ml of DTT) with 0.033 μg/μl of the following peptide: KKISGRLSPIMTEQ as substrate.

*Mm*CLK1 (from *Mus musculus*, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer A (+ 0.15 mg/ml of BSA + 0.23 mg/ml of DTT) with 0.027μg/μl of the following peptide: GRSRSRSRSRSR as substrate.

*Ld*TLK (tousled-like kinase, from *Leishmania donovani*, recombinant, expressed in bacteria), was assayed in buffer K with 0.6 μg/μl of casein dephosphorylated from bovine milk (Sigma #C4032) as substrate.

*Lm*CK1 (from *Leishmania major*, recombinant, expressed in bacteria) was assayed in buffer B (adjusted at pH 8) with 0.028 μg/μl of the following peptide: RRKHAAIGSpAYSITA as CK1-specific substrate.

Résultats complémentaires

A la suite du criblage (chapitre 2), nous avons sélectionnés les 14 isolats les plus actifs. Tous ont été analysés en suivant la même procédure que celle décrite précédemment pour la souche *O. griseum* UBOCC-A-114129, à savoir (i) culture en PDA 0,2% pendant 14 jours, (ii) extraction des surnageants par SPE et (iii) analyse par RP-HPLC. A chacune des étapes l'activité antimicrobienne a été recherchée. De façon étonnante, seuls 3 des 14 isolats sélectionnés ont présentés des fractions antimicrobiennes après l'étape de fractionnement par RP-HPLC O. *griseum* UBOCC-A-114129, *Penicillium bialowiezense* UBOCC-A-114097 et, *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109. Les métabolites actifs des deux isolats affiliés au genre *Penicillium* ont été caractérisés par LC-MS-MS.

Ainsi, le métabolite bioactif produit par *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097 a montré un poids moléculaire de 320 Da, identique à celui de l'acide mycophénolique, bien documenté dans la littérature pour son activité antimicrobienne (Abraham, 1945; Franklin & Cook, 1969; Noto *et al.*, 1969; Bentley, 2000; Frisvad *et al.*, 2004). La comparaison des spectres de fragmentation obtenus par LC-MS-MS de l'acide mycophénolique commercial (Sigma-Aldrich, M5255) et du composé produit par *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097 a révélé la présence d'ions fragments majoritaires identiques. Les caractéristiques spectrales (spectres UV identiques) chromatographique (tr identiques) et moléculaires (masses et profils de fragmentation identiques) indiquent que le métabolite bioactif produit par *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097 est l'acide mycophénolique (Figures 22 et 23).

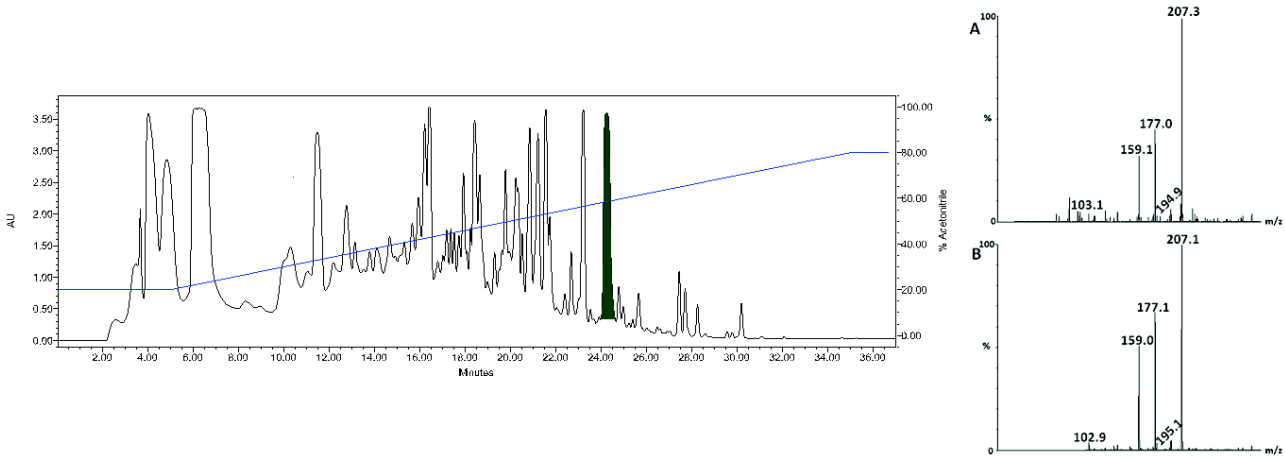


Figure 22 : Chromatogramme de l'extrait de PDA 0,2% de *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097. En vert le composé antimicrobien à 320Da. A droite le spectre de fragmentation du composé purifié (A) et de l'acide mycophénolique (B)

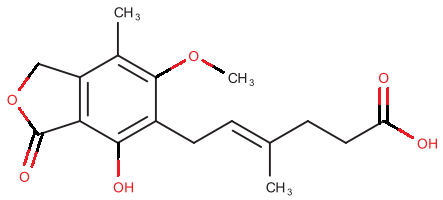


Figure 23 : Structure de l'acide mycophénolique

Le métabolite antibactérien produit par *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109 possède une masse moléculaire de 542Da. Cette masse correspond à celle de la rugusoline, décrite dans la littérature pour ces propriétés antimicrobiennes contre des bactéries à Gram-positif (Yamazaki *et al.*, 2010). De façon identique, nous avons identifié le métabolite bioactif isolé de *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109 comme de la rugulosine par comparaison des profils chromatographiques, spectraux et de fragmentation, de la molécule commerciale (AdipoGen Life science, AG-CN2-0124), (Figures 24 et 25).

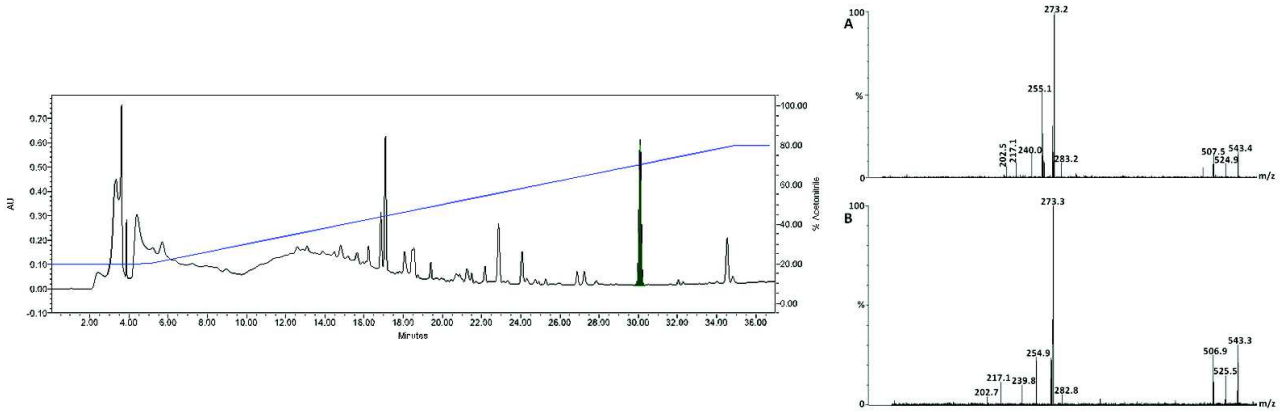


Figure 24 : Chromatogramme de l'extrait de PDA 0,2% de *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109. En vert le composé antimicrobien à 542Da. A droite le spectre de fragmentation du composé purifié (A) et de la rugulosine (B)

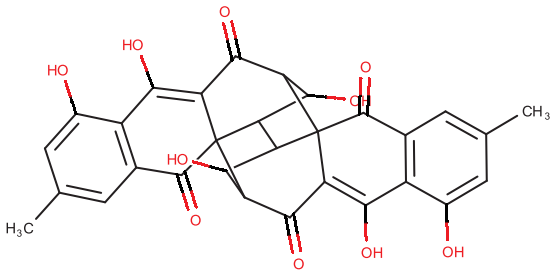


Figure 25 : Structure de la rugulosine

.

CHAPITRE 4

Déréplication métabolique

Bien qu'un fort potentiel de production de métabolites secondaires ait été mis en évidence (chapitre 1), l'approche que nous avons privilégiée n'a pas permis d'aboutir à des composés bioactifs originaux. Pour obtenir un inventaire exhaustif de la production de métabolites par les champignons de sédiments marins profonds, nous avons utilisé l'HPLC couplée à la détection de masse à haute résolution. Cette approche permet une déréplication des métabolites produits par les champignons marins. Cette étude a été menée en collaboration avec Catherine Roullier et Samuel Bertrand sur la plateforme Thalassomics (Corsaire, MMS Nantes).

La déréplication métabolique des extraits actifs consiste à analyser les extraits bruts par LC-HRMS et à identifier, les composés déjà décrits dans la littérature, en interrogeant différentes bases de données telles que Dictionary of Natural products, Dictionary of Marine Natural products, LipidMaps ou encore Universal Natural Products Database. Par conséquent, elle permet de détecter des composés originaux dans les extraits bruts bioactifs.

Par cette approche, nous avons ainsi analysés 24 extraits bruts provenant de 11 isolats cultivés dans différentes conditions de culture : PDA 0,2% et PDA 1,7%. Les milieux PDA 0,2% ont été extrait sur phase solide (colonne C-18) et ont conduit à 2 fractions : éluées avec 10% d'acétonitrile (0-10) et éluées avec 90% d'acétonitrile (10-90). Les thalles cultivés sur PDA 1,7% ont été broyés puis extraits avec un mélange de méthanol chloroforme et eau (4V/5V/1V) menant à deux fractions, l'une aqueuse et l'autre organique. Tous les extraits avec des activités antimicrobiennes (actifs) ont été analysés en déréplication. Si pour un même isolat des extraits actifs et inactifs (non antimicrobiens) ont été obtenus, alors les deux extraits ont été étudiés afin de comparer les profils métaboliques obtenus (Tableau 3) (voir annexe 1 pour le détail du matériel et méthode).

Cette étape a permis la détection de 352 molécules (tout extrait confondus) dont 44.9 % non référencées dans les bases de données interrogées. Ces résultats soulignent ainsi la grande chimio-diversité métabolique produite par les champignons de sub-surface.

Tableau 3 : Extraits analysés par RP-HPLC-HRMS. – : Aucun extrait analysé

Code souche	Identification	Profondeur d'isolement sous le plancher océanique (m)	PDA 0.2% Surnageant 0-10	PDA 0.2% Surnageant 10-90	PDA 1.7% thalle Phase aqueuse	PDA 1.7% thalle Phase organique
48X3-P3-P1(2) UBOCC-A-114037	*A. fumigatus*	403	1 actif	1 actif	–	1 actif
CB_33 UBOCC-A-114126	*E. herbariorum*	37	–	2 actifs	–	–
CB_4 UBOCC-A-114097	*P. bialowiezense*	4	–	1 actif et 1 inactif	–	1 actif et 1 inactif
CB_5 UBOCC-A-114098	*P. bialowiezense*	4	–	–	–	1 actif
CB_7 UBOCC-A-114100	*P. bialowiezense*	4	–	2 actifs	–	–
CB_8 UBOCC-A-114101	*P. bialowiezense*	4	–		1 actif	1 actif
CB_10 UBOCC-A-114103	*P. bialowiezense*	4	–	2 actifs	–	1 actif et 1 inactif
CB_16 UBOCC-A-114109	*Penicillium* sp.	21	–	–	–	2 actifs
CB_24 UBOCC-A-114117	*P. chrysogenum*	37	–	–	–	1 actif
CB_36 UBOCC-A-114129	*O. griseum*	765	–	–	–	1 actif
5H3-M3-P2 UBOCC-A-114046	*Sarocladium* sp.	37	–	–	–	1 actif et 1 inactif

Une analyse des correspondances multiples, basée sur l'absence ou la présence des molécules dans les extraits, a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse statistique XLSTAT. En ionisation positive, les résultats montrent une homogénéité dans 22 extraits (regroupés au niveau de l'origine des axes) (Figure 26). En revanche l'extrait du PDA 0,2%, élué avec 90% d'acétonitrile (0.2%_10-90) de la souche *A. fumigatus* UBOCC-A-114037 et l'extrait du PDA 1,7% de la souche *P. bialowiezense* UBOCC-A-114098 se distinguent respectivement par la présence de 60 et 26 molécules qui leur sont propres (Figure 26).

Pour différencier les 22 autres extraits qui semblent présenter un profil métabolique très proche, nous avons supprimé les composés « rares » c'est-à-dire spécifique à un extrait soit environ 230 molécules « rares » (Figure 27). Le nuage de point apparait plus dispersé et permet de mettre en évidence l'impact des conditions de culture sur le profil métabolique des différents isolats. Par exemple, les souches *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097 et UBOCC-A-114103, qui ont des profils métaboliques proches, affichent des différences métaboliques dans l'extrait PDA 0,2% et PDA 1,7% (les points sont éloignés). Cette méthode de déréplication illustre l'intérêt d'une approche de type OSMAC dans l'étude du métabolisme secondaire fongique et met en évidence l'effet indéniable de la concentration en agar dans la synthèse de métabolites.

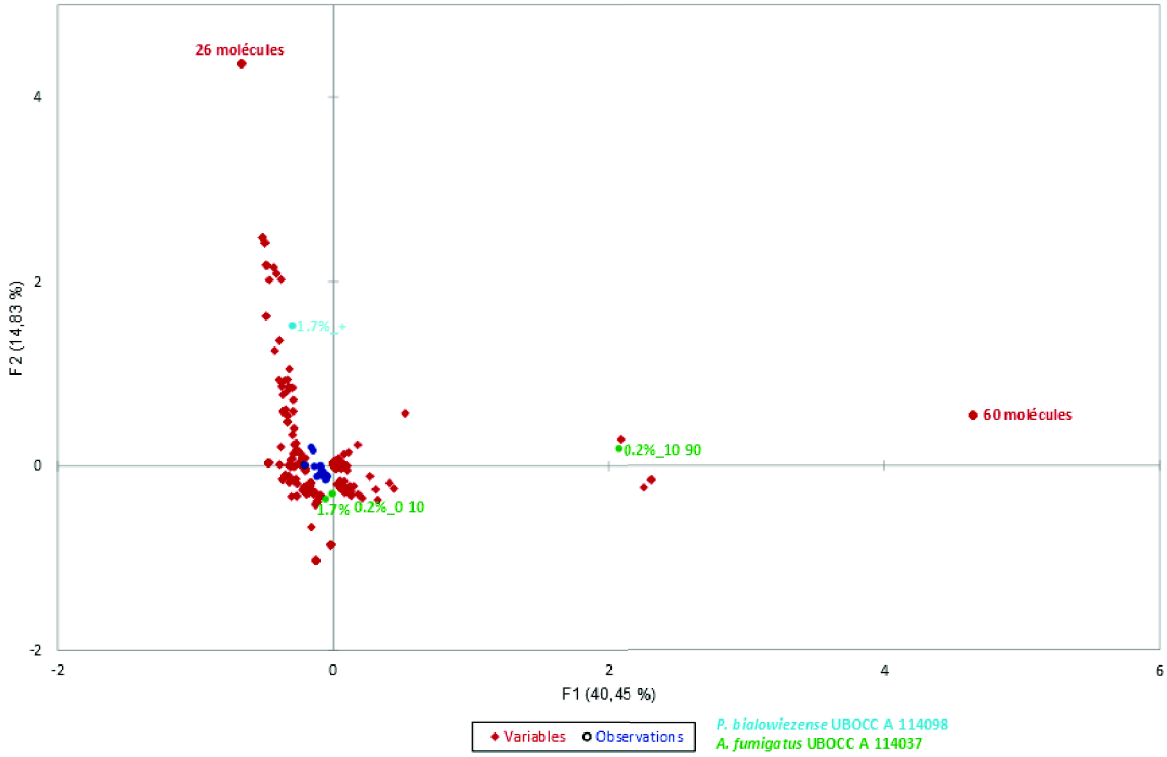


Figure 26 : Analyse en composante multiple de la répartition des métabolites produits par les différents isolats dans les différents extraits.

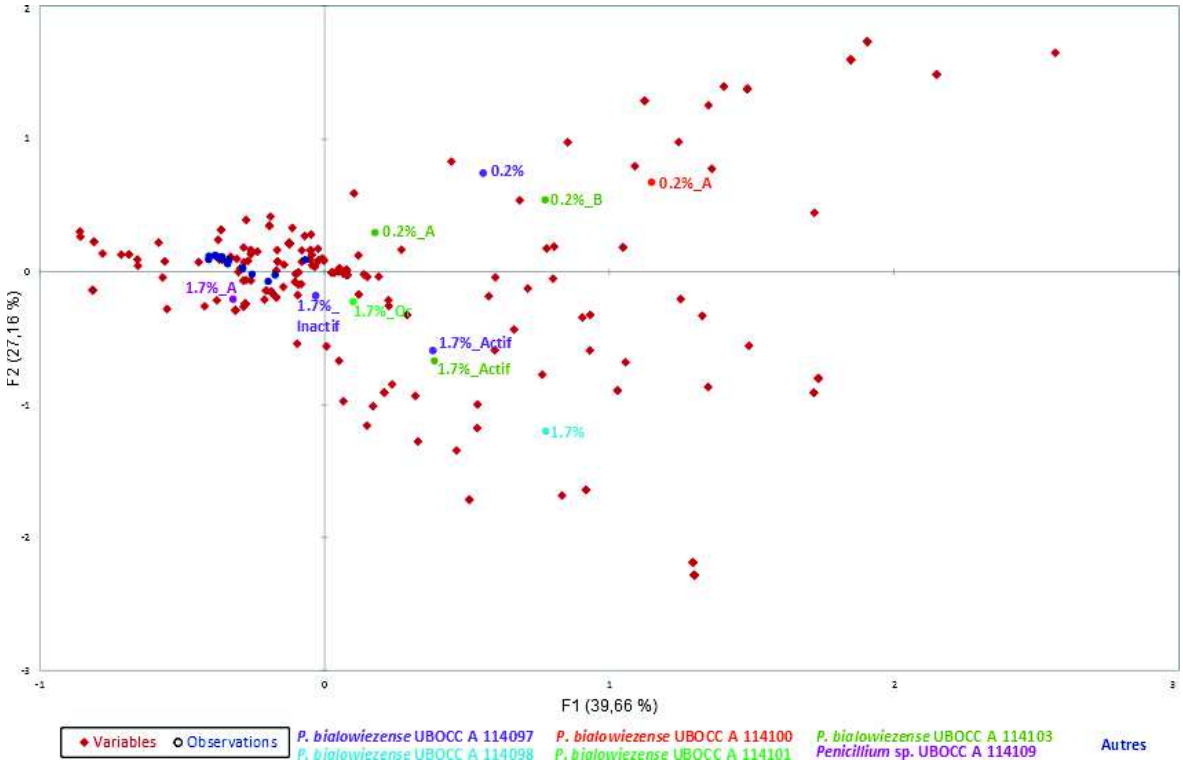


Figure 27 : Analyse en composante multiple de la répartition des métabolites produits par les différents isolats avec suppression des variables rares

Enfin une analyse des données de déréplication a permis d'obtenir un diagramme de Venn (Figure 28). Il révèle que la grande majorité de la chimio-diversité des composés est détectée au cours des analyses par LC-HRMS en ionisation positive. L'analyse complémentaire par ionisation en mode négatif n'est pas dénuée d'intérêt puisqu'elle révèle des composés spécifiques. Ce diagramme illustre également, l'effet des conditions de culture sur la production de métabolites secondaires. Ainsi, toutes souches confondues, la production de composés apparait équivalente en nombre de molécules entre les milieux PDA 0,2% et 1,7%. En effet, même si le milieu PDA 0,2% semble favoriser la production de métabolites secondaires (plus de métabolites détectés), le milieu PDA 1,7% offre une toute autre chimio-diversité.

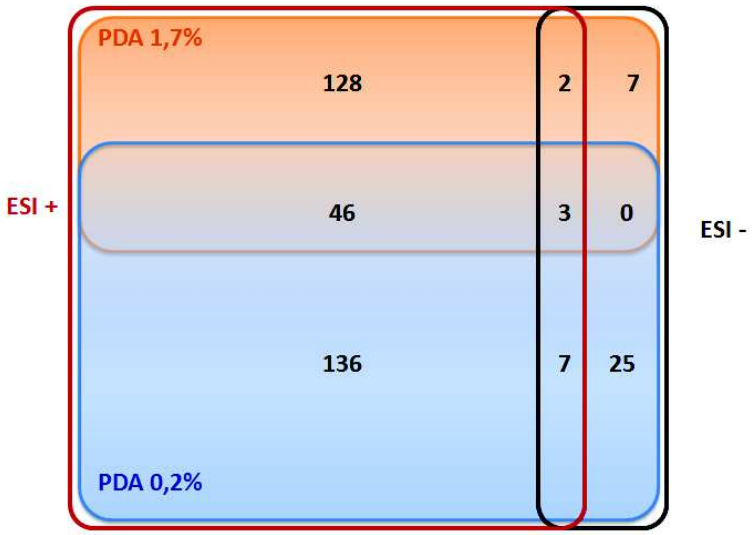


Figure 28 : Diagramme de Venn démontrant la distribution des métabolites secondaires en fonction des conditions de culture (PDA 0,2 et 1,7%) et d'analyse (ESI+ et ESI-)

Les extraits provenant des 3 isolats sélectionnés pour l'approche fonctionnelle ont également été analysés par cette méthode de déréplication : *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097 (PDA 0,2% et PDA 1,7%), *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109 (PDA 1,7%) et *O. griseum* UBOCC-A-114129 (PDA 1,7%).

L'acide mycophénolique a été identifié à partir des extraits de milieux PDA 0,2% est détecté dans toutes les conditions de cultures analysées par LC-HRMS (PDA 0,2% et PDA 1,7%). En revanche, la rugulosine, la fuscine et ses dérivés respectivement produite par *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109 et *O. griseum* UBOCC-A-114129 et purifiées à partir des extraits de PDA 0,2%, n'ont pas été détectée

en LC-HRMS dans les extraits provenant d'une culture en PDA 1.7%. Ces résultats illustrent à nouveau l'influence de la concentration en agar sur la production de métabolites antimicrobiens.

Bien que des composés originaux aient été détectés par LC-HRMS dans l'extrait PDA 0,2% de *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097, aucun n'a été caractérisé à ce jour. Il semble par conséquent que les composés originaux détectés ne présentent vraisemblablement pas d'activités antimicrobiennes aux concentrations testées.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. DISCUSSION GENERALE

L'OMS alerte les dirigeants nationaux et internationaux sur l'émergence et la propagation des micro-organismes résistants aux antibiotiques qui menacent le système mondial de santé publique. Une des stratégies préconisées pour lutter contre l'antibiorésistance est la recherche de nouvelles molécules pour renouveler l'arsenal thérapeutique. Les micro-organismes terrestres ont fourni à l'industrie pharmaceutique un grand nombre de molécules antimicrobiennes (Walsh & Wright, 2005; Aminov, 2010). Aujourd'hui, l'étude de ces micro-organismes conduit fréquemment au ré-isolement de molécules déjà décrites (Donadio *et al.*, 2010; Radić & Bratkovič, 2012). Par conséquent, la recherche de nouveaux composés bioactifs s'orientent vers des écosystèmes atypiques et/ou inexplorés. Le milieu marin, sa diversité d'habitats et sa composante microbienne représentent des écosystèmes d'intérêt. De nombreuses études ont depuis longtemps témoignés de l'intérêt des *Bacteria* et *Archaea* dans cette recherche de nouveaux métabolites bioactifs, notamment les actinomycètes marins qui sont à l'origine de plusieurs milliers de métabolites secondaires bioactifs (Fenical & Jensen, 2006; Zotchev, 2012). D'autres études tendent également à montrer que la composante micro-eucaryote et notamment fongique, est particulièrement riche tant en termes de diversité taxonomique et de chimio-diversité (Ebada & Proksch, 2015). Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient de (i) définir la diversité des champignons marins et leur écophysiologie dans un écosystème marin inexploré, à savoir la biosphère profonde à travers l'étude de sédiments de subsurface, (ii) d'évaluer leur potentiel de synthèse de métabolites secondaires, et (iii) d'établir leur production de métabolites bioactifs, en se concentrant principalement sur les molécules antimicrobiennes.

A. Diversité fongique et caractéristiques écophysiologiques des champignons de sédiment marins

Dans le cadre de l'exploration de la biosphère profonde, une collection de champignons, isolés de sédiments marins profonds, a été établie (Rédou *et al.*, 2015). Elle est constituée de 183 isolats collectés entre 4 et 1884 mètres sous la surface du plancher océanique. Elle est dominée par des formes fongiques filamenteuses appartenant aux champignons dits « supérieurs », notamment les Ascomycètes. Cette diversité cultivable apparaît cohérente au regard des différents travaux portant

sur la diversité fongique révélée dans les premiers centimètres des sédiments marins profonds (Damare *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014; Nagano *et al.*, 2016). Les isolats de cette collection sont majoritairement affiliés aux genres *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus*. Ces genres sont fréquemment rencontrés dans les sédiments marins (Damare *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014) mais également en milieux aquatique et terrestre. Par exemple, *Fusarium oxysporum*, champignon filamenteux ascomycète, est fréquemment impliqué dans des maladies végétales telles que la fusariose (Rekah *et al.*, 2000; Pérez-Vicente *et al.*, 2014). Il est également retrouvé dans des systèmes de distribution d'eau potable (Sautour *et al.*, 2015) et responsable d'infections de bassins de culture de poisson-zèbre (Kulatunga *et al.*, 2016). La découverte de cette espèce dans les sédiments marins de subsurface soulève de nombreuses questions sur son origine et son adaptation aux conditions du biotope.

Les informations bibliographiques relatives à l'origine des champignons marins restent assez sommaires à ce jour. Plusieurs transitions « milieu terrestre vers milieu marin » ont été mises en évidence sur la base d'analyses phylogénétiques ciblant les Halosphaeriales, un des principaux groupes de champignons marins dits « obligatoires » (Spatafora *et al.*, 1998), suggérant une origine terrestre des champignons suivie d'une colonisation du milieu marin. Néanmoins, de nombreuses séquences nucléotidiques affiliées à des lignées fongiques basales ont été retrouvées dans différents types d'écosystèmes marins, principalement extrêmes (Bass *et al.*, 2007; Le Calvez *et al.*, 2009; Nagano *et al.*, 2010; Nagahama *et al.*, 2011). Par conséquent, l'hypothèse de l'émergence et de la diversification des champignons (lignées basales) en milieu marin semble probable. La colonisation du milieu terrestre résulterait d'une étape ultérieure, elle-même suivie par des recolonisations secondaires du milieu terrestre vers le milieu marin. Néanmoins, la validation de cette hypothèse nécessiterait de nombreuses analyses à l'aide des outils omiques tels que la génomique comparative ou la transcriptomique.

Plusieurs analyses réalisées lors de cette étude ont permis de mettre en évidence des phénomènes adaptatifs des champignons aux conditions présentes dans des sédiments marins profonds. Bien que les souches de la collection ne soient pas piézophiles, elles ont majoritairement été isolées après une étape d'enrichissement sous pression hydrostatique élevée (Figure 29).

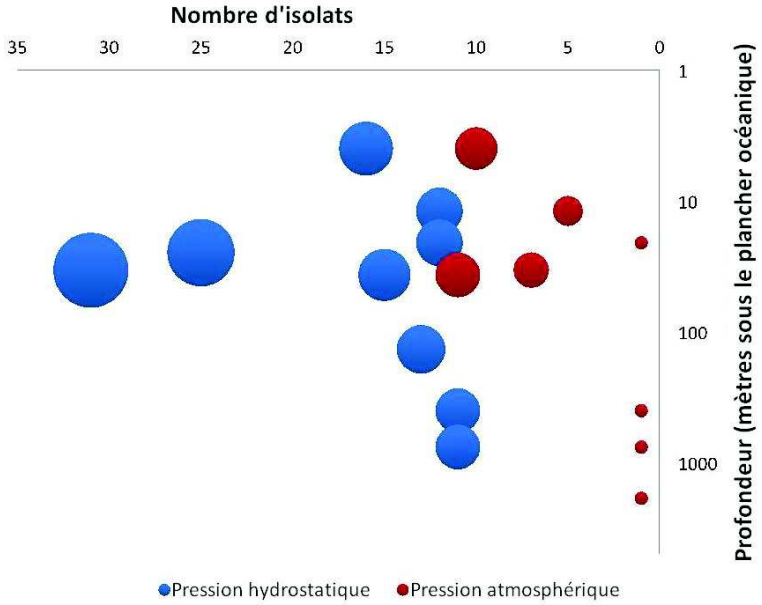


Figure 29 : Nombre d'isolats cultivés après une étape d'enrichissement sous une pression correspondant à la profondeur de collecte (bleu) et sous pression atmosphérique (rouge)

La pression (hydrostatique et lithostatique) élevée représente le principal facteur environnemental impactant la diversité au sein de la biosphère profonde (Bartlett, 2002). D'une façon similaire, d'autres études ont montré qu'une étape d'enrichissement sous pression hydrostatique, réalisée en amont de l'isolement, permettait d'augmenter le nombre d'isolats obtenus (Singh *et al.*, 2010, 2012). La pression hydrostatique élevée n'est donc pas un frein à la germination et/ou à la croissance. Cette caractéristique semble par conséquent indiquer une forme d'adaptation des isolats aux conditions de pression élevées.

La salinité et la température sont deux autres paramètres clés de l'environnement de la biosphère profonde. La concentration en sels de mer le long de la carotte sédimentaire analysée apparaît constante, proche des 3% du milieu marin. En revanche, la température augmente le long de la carotte de sédiment selon un gradient estimé entre 30 et 50°C par kilomètre, soit une température maximale comprise entre 60 et 100°C à 2km de profondeur (Ciobanu *et al.*, 2014). L'étude des caractéristiques de croissance de différents isolats obtenus à différentes profondeurs a été réalisée par néphélométrie laser, une technique haut-débit qui permet l'étude des caractéristiques de croissance de micro-organismes filamenteux. Contrairement à la densité optique qui mesure la quantité de lumière absorbée par une suspension, la néphélométrie laser mesure la quantité de lumière réfléchie par les particules en suspension, et permet ainsi d'estimer

la croissance fongique (Joubert *et al.*, 2010). Au cours de cette étude, la croissance de différentes souches, d'une même espèce, isolées à différentes profondeurs a été étudiée en fonction de la température et de la salinité. Elle a révélé un profil d'adaptation écophysiologique le long de la carotte sédimentaire. Les isolats les plus profonds apparaissant plus adaptés aux conditions de l'environnement que les isolats obtenus à faible profondeur.

Ce changement de caractéristiques éco-physiologiques en fonction de la profondeur d'isolement semble refléter la mise en place de mécanismes d'adaptation au cours de l'enfouissement. Certaines espèces fongiques, se déposant au niveau du plancher océanique par sédimentation semblent, au départ, peu adaptées aux conditions de l'environnement profond en termes de température et de salinité. Cependant, certaines apparaissent capables de survivre et de développer des mécanismes d'adaptation au cours de l'enfouissement. Damare et ses collaborateurs (2006) ont démontré que les champignons sont capables de s'adapter à une augmentation graduelle de pression hydrostatique. Cette capacité d'adaptation des champignons à différentes variables environnementales, même les plus extrêmes, leur permet de coloniser une grande diversité d'habitats depuis le sol jusqu'à des sédiments situés à plusieurs kilomètres sous la surface du plancher océanique.

L'analyse de la diversité microbienne dans les sédiments de subsurface est une thématique de recherche particulièrement dynamique sur le plan international. Ainsi, plusieurs études se sont concentrées sur cet écosystème en utilisant la métagénomique et/ou la métatranscriptomique. Récemment, il a été démontré que les 3 domaines du vivant sont en interaction dans cet écosystème *via* l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires comme les PKS ou les NRPS (Orsi *et al.*, 2013b; Pachiadaki *et al.*, 2016). De plus, les communautés microbiennes semblent impliquées dans des phénomènes de compétition *via* la synthèse de métabolites secondaires antimicrobiens. Les sédiments de sub-surface apparaissent donc comme un écosystème compétitif. De ce fait, l'activité métabolique de l'écosystème microbien des sédiments marins profonds pourrait constituer une nouvelle source de métabolites bioactifs et antimicrobiens en particuliers.

B. Recherche de métabolites antimicrobiens produits par les champignons de sédiments marins profonds

La stratégie élaborée prend en compte les résultats de criblage génétique ciblant les gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites bioactifs (*Genome mining*) ainsi qu'un criblage fonctionnel sur des activités antimicrobiennes (Figure 30).

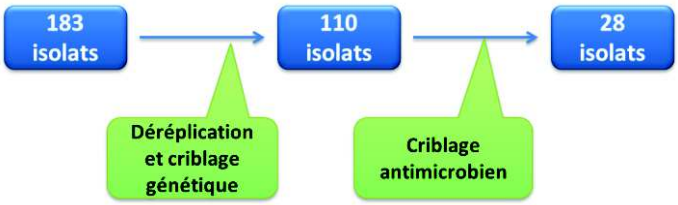


Figure 30 : Schéma de la stratégie élaborée pour sélectionner les isolats d'intérêt

1. Le criblage génétique

L'ensemble de la collection a été criblé pour la présence de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de métabolites secondaires potentiellement bioactifs, à savoir les PKS de type I et III, les NRPS, les hybrides PKS-NRPS et les TPS (Figure 30). En effet, certains composés de ces familles de molécules présentent des activités antimicrobiennes. (Keller *et al.*, 2005). Ainsi, le précurseur de la pénicilline ou de la céphalosporine est synthétisé par une NRPS (Aharonowitz *et al.*, 1992; Hamed *et al.*, 2013) ou encore la griseofulvine est synthétisée par une PKS (Cacho *et al.*, 2013). La présence de tels gènes dans les génomes fongiques de la collection laisse présager de la synthèse putative de métabolites secondaires bioactifs et potentiellement antimicrobiens. Ce criblage permet donc une sélection des isolats intéressants. Il a démontré que plus de 96 % des souches possèdent au moins un gène impliqué dans les voies de biosynthèse de métabolites secondaires. La présence des gènes de PKS de type I, de type III, de NRPS, d'hybrides et de TPS a été respectivement détectée dans environ 82%, 51%, 74%, 49% et 43% des isolats. La synthèse de métabolites secondaires bioactifs par les champignons marins des sédiments a déjà été démontrée à plusieurs reprises (Gao *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011a, 2013a; Shang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Ebada & Proksch, 2015). Néanmoins, il est surprenant de retrouver une proportion aussi importante de gènes impliqués dans leurs voies de biosynthèse. La prépondérance des gènes codant des PKS dans la collection reflète

les résultats de la littérature, puisque les polycétides représente plus de 40% des molécules bioactives des champignons marins (Rateb & Ebel, 2011; Ebada & Proksch, 2015). Comparativement, une telle proportion n'a été détectée que chez des actinobactéries (91%) isolées de sédiments de fjord (Undabarrena *et al.*, 2016). En revanche, les gènes impliqués dans le métabolisme secondaire sont largement sous-représentés chez les micro-organismes isolés de spongiaires et ne concernent que 10% à 25% des souches de collection de bactéries (Zhang *et al.*, 2009) et de champignons (Zhou *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013) testés pour la présence de gènes codant des PKS et/ou des NRPS. Ces résultats soulignent la richesse du potentiel métabolique des micro-organismes fongiques des sédiments profonds.

Néanmoins, ce criblage, aussi prometteur qu'il soit, n'est que peu discriminant. De plus, il n'indique en rien une production de métabolites secondaires bioactifs. En effet, leur expression reste hypothétique tout comme la nature de l'activité biologique des métabolites produits. Ce criblage génétique doit donc être associé à différents criblages fonctionnels.

2. Le criblage antimicrobien

Ce criblage antimicrobien a été réalisé sur 110 isolats de la collection (24 levures et 86 champignons filamenteux). Ces derniers ont été sélectionnés en fonction de leur appartenance aux différents groupes résultant de la déréplication des isolats par MSP-PCR, en fonction de leur profondeur d'isolement et de leurs caractéristiques génétiques (Figure 30). Le criblage d'activité antimicrobienne a été réalisé contre un panel de 16 souches cibles. Il a révélé 28 isolats aux propriétés antimicrobiennes soit 32,5% des souches filamenteuses. Un criblage de champignons de sédiments marins, collectés dans les 30 premiers centimètres du plancher océanique (à 2 000m de profondeur) a récemment révélé que plus de 55% de la collection avait des activités antimicrobiennes contre des pathogènes marins : *Micrococcus luteus*, *Pseudoalteromonas piscida*, *Aspergillus sydowii* et *Aspergillus versicolor* (Zhang *et al.*, 2013). Des proportions avoisinant les 50% ont également été obtenues à partir de collections de champignons isolés d'invertébrés marins (Baker *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012b). Ces différents résultats montrent que les champignons marins possèdent fréquemment des activités antimicrobiennes.

3. Caractérisation des molécules actives

Les isolats les plus actifs ont été retenus pour la caractérisation structurale des composés antimicrobiens (Figure 31). La fermentation en milieu liquide est très utilisée dans la recherche de molécules naturelles actives. Les micro-organismes (bactéries, champignons) sont cultivés dans de grands volumes de milieu de culture, ce qui permet de maximiser la quantité de métabolites produits (Hölker & Lenz, 2005). La fermentation en milieu solide est moins développée bien qu'elle se révèle pertinente dans la recherche de molécules naturelles isolées de champignons, puisqu'elle simulerait leurs conditions naturelles de croissance (Barrios-González, 2012) et donc stimulerait leur métabolisme secondaire (Hölker & Lenz, 2005). Une meilleure production de molécules naturelles sur des milieux gélosés est fréquemment décrite (Barrios-González *et al.*, 1993, 2008; Harris & Mantle, 2001; Bigelis *et al.*, 2006; Alani *et al.*, 2009; Nigam, 2009). Dans cette étude, les isolats les plus actifs ont été cultivés sur un milieu nutritif de composition identique (PDB) dont seule la concentration en agar a varié (un milieu sans agar, un milieu semi-liquide contenant 0.2% d'agar et un milieu solide avec 1.7% d'agar). Bien que les souches se soient bien développées dans les 3 milieux de culture, nos résultats ont démontré que les milieux contenant de l'agar semblaient plus propices à la production de molécules antimicrobiennes. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas permis de définir une concentration optimale en agar à utiliser pour l'ensemble des isolats, certaines montrant plus d'activités à 0,2% et d'autres à 1,7%.

La procédure d'extraction mise en place a permis de rechercher des molécules bioactives amphiphiles. En effet, les molécules amphiphiles sont susceptibles d'interagir avec la membrane lipidique des cellules cibles et peuvent désorganiser sa structure comme dans le cas des polymyxines (Newton, 1956).

Les extraits actifs ont été fractionnés par HPLC en phase inverse. Les fractions ont été analysées pour leurs activités antimicrobiennes. Cette étape a permis de sélectionner 3 souches (Figure 31) *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097, *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109 et *O. griseum* UBOCC-A-114129. La purification des composés actifs a abouti à l'identification de 6 molécules :

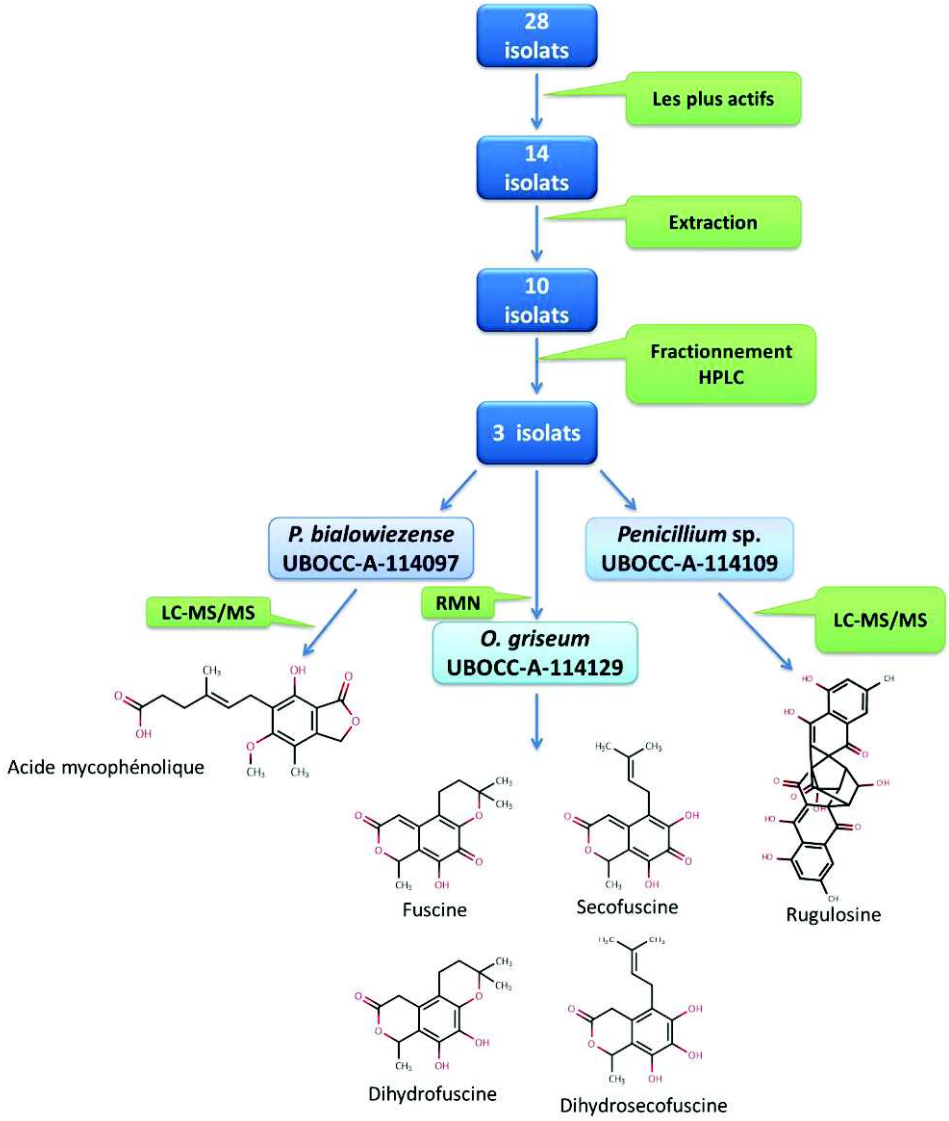


Figure 31 : Schéma de la stratégie suivie pour sélectionner les isolats fongiques à activité antimicrobienne et accéder aux composés antimicrobiens

– l'acide mycophénolique a été extrait à partir de *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097, isolé à 4 mètres sous le plancher océanique. Cette mycotoxine est décrite dans la littérature pour avoir des propriétés antimicrobiennes contre des *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, et *Staphylococcus aureus* (Abraham, 1945; Franklin & Cook, 1969; Noto *et al.*, 1969; Bentley, 2000; Frisvad *et al.*, 2004). Ce métabolite est produit par différentes espèces de *Penicillium* dont des souches marines de *P. brevicompactum*, collecté d'une éponge (Bringmann *et al.*, 2004), et de *Penicillium* sp. SOF07, isolé de sédiments marins (675m de profondeur sous le niveau de la mer) (Chen *et al.*, 2012). Même si les études concernant la synthèse d'acide mycophénolique en

milieu marin restent anecdotiques, il n'est pas exclu de considérer que *P. bialowiezense* soit capable d'entrer en compétition avec les communautés bactériennes et fongiques *via* la synthèse de ce métabolite.

- La rugulosine est produite par *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109, isolé à 21 mètres sous le plancher océanique. Cette mycotoxine fongique est produite par différentes espèces de *Penicillium* dont *Penicillium rugulosum*, morphologiquement proche de la souche productrice *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109 (Breen *et al.*, 1955; Ueno *et al.*, 1980). Isolée de *Penicillium* d'origine terrestre puis marine (Breen *et al.*, 1955; Sumarah *et al.*, 2008; Brunati *et al.*, 2009; Ellinger *et al.*, 2014), la rugulosine est décrite pour des activités antimicrobiennes contre des bactéries à Gram-positif comme *S. aureus* et *S. aureus* résistant à la méthicilline (Yamazaki *et al.*, 2010). Cependant elle est aussi nocive puisqu'elle est également décrite comme carcinogène et hépato-toxique chez les souris (Ueno *et al.*, 1980).

- La dihydrofuscine, la fuscine, la dihydrosecofuscine et la secofuscine sont des molécules produites par *O. griseum* UBOCC-A-114129 isolé à 765 mètres sous le plancher océanique, soit l'isolat produisant des composés antimicrobiens le plus profond jamais décrit à notre connaissance. Elles ont été caractérisées par RMN. La fuscine, produite par *Oidiodendron fuscum*, isolée d'écosystème terrestre, a été décrite pour des activités antibactériennes sur des bactéries à Gram-positif (Michael, 1948). La dihydrosecofuscine et la secofuscine n'ont été reportées que chez *Potebniamyces gallicola* (Boulet & Poulton, 1983).

Les 6 molécules caractérisées appartiennent à la famille des polycétides ou des méroterpènoides (hybride polycétide-terpène) pour l'acide mycophénolique (Shibata, 1973; Boulet & Poulton, 1983; Hansen *et al.*, 2012). Des gènes codant des PKS, enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des polycétides, ont été détectés chez les 3 isolats sélectionnés et plus globalement dans l'ensemble la collection de champignons de sub-surface, puisque plus de 80% des souches possèdent des gènes codant la PKS de type I.

A notre connaissance, aucune activité biologique n'a été décrite pour la dihydrosecofuscine et la secofuscine. Les activités antimicrobiennes des molécules purifiées à partir de *O. griseum* ont donc été évaluées. Les valeurs de CMI montrent une activité antibactérienne plus importante sur des bactéries à Gram-positif. Cependant les CMI obtenues de l'ordre de 100µg/mL indiquent une faible activité antibactérienne, comparée à celle de l'érythromycine (CLSI, 2014).

Malgré de faibles activités antibactériennes en suspension, des résultats préliminaires ont montré que la dihydrosecosfuscine est capable d'inhiber, jusqu'à 50%, la formation de biofilm de *E. faecalis* CIP-A-186 à une concentration de 32µg/mL (équivalente à la CMI/4).

4. Les activités anticancéreuses

Les molécules produites par *O. griseum*, et plus spécifiquement la fuscine, ont été décrites dans la littérature uniquement pour leurs propriétés antimicrobiennes. Par conséquent, afin de valoriser au mieux ces molécules, les activités anticancéreuses ont également été évaluées pour ces molécules.

En effet, les champignons marins sont également décrits pour produire des métabolites à activité anticancéreuse. La plinabuline, une molécule marine inspirée de l'halimide d'origine fongique, est actuellement en troisième phase d'étude clinique comme agent anticancéreux utilisé dans le traitement du cancer du poumon (Adis International Ltd, 2016; BeyondSpring Pharmaceuticals, 2016). Les scopularides A et B isolés de *Scopulariopsis brevicaulis* (provenant d'une éponge) sont des peptides originaux brevetés depuis 2009 comme nouvelles molécules thérapeutiques utilisables contre le cancer du pancréas, de l'intestin ou du colon (Yu *et al.*, 2008; Imhoff *et al.*, 2009). De plus, des champignons isolés de sédiments marins produisent des molécules actives contre des lignées cancéreuses (leucémie HL-60 et poumon A-549) (Du *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011b).

Afin de valoriser les molécules décrites précédemment, nous avons évalué leurs activités de : (i) modulation du signal calcique cellulaire (C. Brigaudeau, plateforme CalciScreen, CGO) et (ii)

d'inhibition de différentes kinases impliquées dans des mécanismes de cancérisation et dans les maladies neurodégénératives (S. Bach, plateforme Kissfs, SBR).

Le dérèglement de mécanismes cellulaires, tels qu'un dysfonctionnement des signaux calciques ou des protéines kinases, peut entrainer l'apparition de cancer et favoriser la prolifération de lignées cancéreuses. Dans les cellules, les ions calciques (Ca^{2+}) sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation intra-cellulaires (Berridge, 2012). Les flux de calcium dans la cellule sont régulés par les canaux calciques présents sur la membrane de la cellule et/ou des organites (réticulum endoplasmique, mitochondrie). Une altération de ces canaux induit un dysfonctionnement du signal calcique et peut entrainer l'apparition de cancer (Monteith *et al.*, 2012). Par conséquent, la modulation du signal calcique au travers des canaux calciques membranaires dans les cellules cancéreuses semble être une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement du cancer (Monteith *et al.*, 2012). La gliotoxine est une toxine fongique capable d'induire un influx de calcium dans la cellule entrainant la mort cellulaire (Hurne *et al.*, 2002). Cependant elle reste peu utilisée comme agent anticancéreux du fait de son manque de spécificité (Hagens *et al.*, 2006).

Les protéines kinases sont également des acteurs majeurs de la vie cellulaire. Souvent impliquées dans des mécanismes de cancérisation, elles représentent des cibles thérapeutiques dans le traitement cette maladie (Lapenna & Giordano, 2009; Bharate *et al.*, 2013). Plusieurs métabolites produits par des champignons marins ont été décrits comme inhibant l'activité de protéines kinases (Oda *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Ohkawa *et al.*, 2010).

La dihydrosecofuscine n'a démontré aucune modulation des flux calciques intracellulaires aux concentrations testées. En revanche, elle a provoqué une inhibition de l'activité enzymatique de la CLK1 (IC_{50}=15,56µg/mL), protéine kinase impliquée dans les maladies neurodégénératives (Feldmann *et al.*, 2010; Jain *et al.*, 2014). Cette activité est comparable à celles des hypochromine A et B capable d'inhiber l'activité d'une protéine tyrosine kinase avec respectivement une IC_{50}=32.22µg/mL et 10µg/mL. Ces molécules ont été extraites de *Hypocrea vinosa*, champignon ascomycète isolé d'un échantillon de sable, sur une plage (Ohkawa *et al.*, 2010). Brauers et ses collaborateurs ont extraits des anthraquinones de *Microsphaeropsis* sp., champignon isolé d'une

éponge aux activités inhibitrices de différentes kinases (PKCε, CDK4/cyclin D1, et EGF-R) à des IC_{50} comprises entre 4 et 20µg/mL (Brauers *et al.*, 2000). Le terrestrol G, extrait de *Penicillium terrestre*, isolé de sédiment, provoque une inhibition de 30% de l'activité tyrosine kinase dès 3µg/mL (Chen *et al.*, 2008).

II. PERSPECTIVES

Les analyses par HPLC-HRMS ont révélé l'importance relative de la diversité des molécules produites par quelques isolats de la collection. Sur les 11 souches analysées en LC-HRMS, près de 45% des composés détectés ne figurent pas dans les bases de données interrogées. Dans un objectif de valorisation de la collection, une stratégie focalisée sur l'originalité structurale des métabolites secondaires permettrait de caractériser de nouveaux métabolites. Il est probable que les composés originaux détectés soient minoritaires. De ce fait, même s'ils n'ont présenté aucune activité biologique dans les conditions testées, ils pourraient présenter des activités biologiques, y compris antimicrobiennes, à des concentrations supérieures. Dans l'idée de caractériser des molécules originales à partir de cette collection, nous proposons une nouvelle stratégie où la synthèse organique jouera un rôle clé (Figure 32) pour la suite de ce travail. Cette stratégie séquentielle, basée sur les premiers résultats de déréplication des isolats et de criblage génétique (chapitre 1), combinerait :

- Une première étape de déréplication métabolique des isolats permettrait (i) d'éliminer des isolats aux profils métaboliques similaires et (ii) de sélectionner ceux qui produisent des composé originaux

- Une approche OSMAC réalisée sur les isolats sélectionnés

- La synthèse organique des composés originaux identifiés

- L'évaluation des activités biologiques des produits de synthèses.

Les principaux verrous technologiques de cette stratégie se situent au niveau de l'approche OSMAC, des analyses par LC-HRMS et de la synthèse organique. En effet, des méthodes de cultures et d'analyses à haut- débit devraient être mises en place.

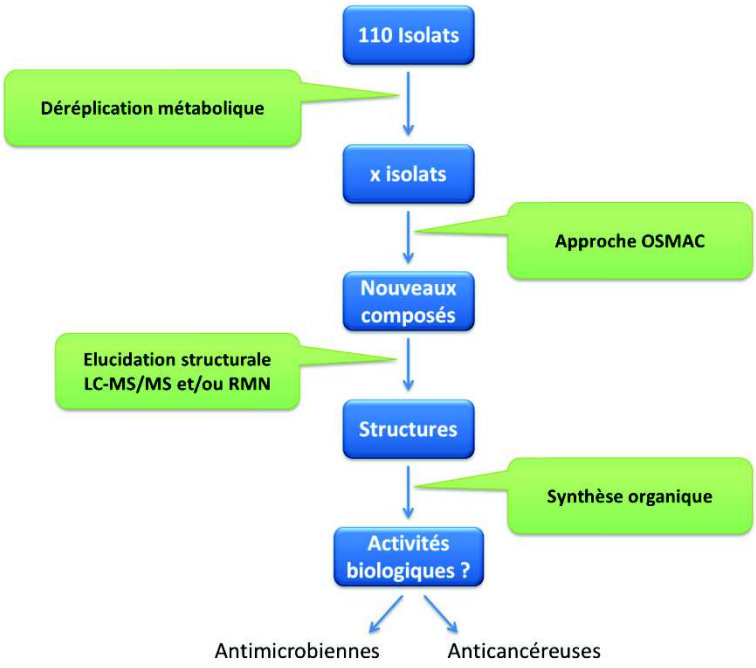


Figure 32 : Nouvelle stratégie proposée pour caractériser des molécules naturelles originales

Les 110 isolats sélectionnés suite à la déréplication et au criblage génétique pourraient être cultivés dans une condition de culture, PDA 0,2%. D'après les résultats obtenus par déréplication, ce milieu favoriserait la production de métabolites secondaires. Des analyses par HPLC-HRMS permettraient :

- d'identifier les isolats aux profils métaboliques similaires et donc de ne sélectionner qu'un représentant. En effet, au cours de ce projet, la déréplication a permis de mettre en évidence des profils métaboliques proches pour des isolats affiliés à *P. bialowiezense*. Il est donc possible que pour d'autres isolats d'un même groupe avec un profil génétique différent le profil métabolique soit similaire.

- de faire ressortir les extraits qui présentent des composés originaux et de ne sélectionner que les isolats producteurs de métabolites originaux.

L'automatisation des analyses de LC-MS-MS et, surtout, de l'interrogation des bases de données permettra d'atteindre un débit d'analyse plus important.

L'utilisation de nombreuses conditions de culture (différentes sources de carbone, co-culture, température, sels de mer *etc*…) appelée « approche OSMAC » (Bode et al. 2002) permet de stimuler

la production et la diversité de métabolites secondaires. Néanmoins, ces approches sont particulièrement chronophages (préparation de milieux, temps de croissance, etc…) et conduisent parfois à la production d'une trop faible biomasse, et donc une faible production de métabolites secondaires, pour des analyses métabolomiques. Pour limiter les pertes de temps, elle devrait être réalisée sur un nombre restreint d'isolats produisant des composés originaux.

En amont de cette approche OSMAC une étape de criblage écophysiologique à haut-débit par néphélométrie laser pourrait être envisagée. Elle permettrait de repérer les conditions de culture permettant d'obtenir une croissance fongique suffisante pour des analyses métabolomiques. Alors que les méthodes conventionnelles de culture des champignons génèrent des temps d'incubation de plusieurs semaines, l'utilisation de la néphélométrie laser permet de diminuer ces temps d'incubation à seulement 72h et ainsi de déterminer plus rapidement les paramètres de croissance des isolats étudiés. Une fois les conditions de culture établie, les isolats peuvent être cultivés dans de plus grands volumes pour étudier et optimiser la production de métabolites secondaires. Les extraits obtenus pourront également être analysés en LC-MS-MS pour mettre en évidence une meilleure production des métabolites originaux ciblés ou alors la présence de nouveaux métabolites.

Néanmoins, les métabolites originaux sont probablement minoritaires dans les extraits bruts et donc difficile à purifier en quantité suffisante pour des criblages d'activité biologique. La synthèse organique représenterait une alternative efficace pour accéder aux quantités nécessaires aux criblages d'activités biologiques. Cependant, les molécules naturelles, même les plus simples, peuvent engendrer des difficultés de synthèse et/ou de rendement car elles peuvent posséder plusieurs groupes fonctionnels réactionnels ou des carbones asymétriques. Malgré l'évolution constante de la chimie organique, aujourd'hui le principal défi des chimistes organicien reste la chimio-sélectivité des molécules naturelles, et leur synthèse en un minimum d'étape, avec un rendement maximal. Dans ce contexte, la synthèse organique devra s'appliquer de façon préférentielle à des métabolites de faible poids moléculaires afin de limiter les étapes de synthèse.

L'étude de la chimio-diversité des champignons de sub-surface a révélé un fort potentiel de synthèse de métabolites secondaires. Bien que les molécules caractérisées dans ce travail aient été

préalablement décrites, la nature des métabolites détectés par déréplication et inconnus des bases de données reste à éclaircir.

Les techniques à haut-débit et particulièrement les techniques « omiques » apparaissent comme des outils suffisamment puissants pour engendrer une rupture scientifique dans le domaine de la recherche de composés bioactifs. La compilation de la métagénomique/métatranscriptomique (pour révéler le potentiel métabolique d'un échantillon environnemental), de la culturomique (pour obtenir en culture une grande diversité de micro-organismes jusque-là incultivés), de « l'écophysiolomique » (pour révéler les caractéristiques de croissance et de physiologie des micro-organismes) et de la métabolomique (pour révéler toujours plus finement la composition en métabolites d'un extrait brut) représente un panel complet d'outils à développer, optimiser et utiliser pour analyser de façon exhaustive un écosystème, sa composante microbienne associée et son potentiel de synthèse de métabolites secondaires.

BIBLIOGRAPHIE

– A –

Abraham, E.P. (1945) The effect of mycophenolic acid on the growth of *Staphylococcus aureus* in heart broth. *Biochemical Journal*, **39**, 398.

Abraham, E.P. (1979) A glimpse of the early history of the cephalosporins. *Review of Infectious Diseases*, **1**, 99–105.

Adpressa, D.A. & Loesgen, S. (2016) Bioprospecting chemical diversity and bioactivity in a marine derived *Aspergillus terreus*. *Chemistry & Biodiversity*, **13**, 253–259.

Aharonowitz, Y., Cohen, G. & Martin, J.F. (1992) Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. *Annual Reviews in Microbiology*, **46**, 461–495.

Alani, F., Grove, J.A., Anderson, W.A. & Moo-Young, M. (2009) Mycophenolic acid production in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, **44**, 106–110.

Alexander, E., Stock, A., Breiner, H.-W., Behnke, A., Bunge, J., Yakimov, M.M., *et al.* (2009) Microbial eukaryotes in the hypersaline anoxic L'Atalante deep-sea basin. *Environmental Microbiology*, **11**, 360–381.

Alker, A.P., Smith, G.W. & Kim, K. (2001) Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia*, **460**, 105–111.

Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143–169.

Aminov, R.I. (2010) A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, **1**, 134.

Amnuaykanjanasin, A., Punya, J., Paungmoung, P., Rungrod, A., Tachaleat, A., Pongpattanakitshote, S., *et al.* (2005) Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. *FEMS Microbiology Letters*, **251**, 125–136.

Arndt, S., Jørgensen, B.B., LaRowe, D.E., Middelburg, J.J., Pancost, R.D. & Regnier, P. (2013) Quantifying the degradation of organic matter in marine sediments: A review and synthesis. *Earth-Science Reviews*, **123**, 53–86.

Arroyo-Manzanares, N., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A.M., Diana Di Mavungu, J. & De Saeger, S. (2016) Ergot alkaloids: Chemistry, biosynthesis, bioactivity, and methods of analysis. In *Fungal Metabolites* (ed. by Mérillon, J.-M. & Ramawat, K.G.). Springer International Publishing, Cham, pp. 1–43.

Ausubel, J.H., Crist, D.T. & Waggoner, P. (2010) First census of marine life: Highlights of a decade of discovery. *2010 Census of Marine Life*. Census of Marine Life, Washington, DC.

– B –

Bailey, A.M., Alberti, F., Kilaru, S., Collins, C.M., Mattos-Shipley, K. de, Hartley, A.J., *et al.* (2016) Identification and manipulation of the pleuromutilin gene cluster from *Clitopilus passeckerianus* for increased rapid antibiotic production. *Scientific Reports*, **6**, 25202.

Baker, P.W., Kennedy, J., Dobson, A.D.W. & Marchesi, J.R. (2008) Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of fungi associated with *Haliclona simulans* isolated from irish coastal waters. *Marine Biotechnology*, **11**, 540–547.

Barrios-González, J. (2012) Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, **47**, 175–185.

Barrios-González, J., Baños, J.G., Covarrubias, A.A. & Garay-Arroyo, A. (2008) Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**, 179–186.

Barrios-González, J., Castillo, T.E. & Mejía, A. (1993) Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation. *Biotechnology Advances*, **11**, 525–537.

Bartlett, D., H. (2002) Pressure effects on *in vivo* microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1595**, 367–381.

Bartlett, J.G., Gilbert, D.N. & Spellberg, B. (2013) Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, **56**, 1445–1450.

Bass, D., Howe, A., Brown, N., Barton, H., Demidova, M., Michelle, H., *et al.* (2007) Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **274**, 3069–3077.

Bentley, R. (2000) Mycophenolic acid: A one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chemical Reviews*, **100**, 3801–3826.

Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A.A. & Hertweck, C. (2007) Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nature Chemical Biology*, **3**, 213–217.

Berridge, M.J. (2012) Calcium signalling remodelling and disease. *Biochemical Society Transactions*, **40**, 297–309.

Bharate, S.B., Sawant, S.D., Singh, P.P. & Vishwakarma, R.A. (2013) Kinase inhibitors of marine origin. *Chemical Reviews*, **113**, 6761–6815.

Bigelis, R., He, H., Yang, H.Y., Chang, L.-P. & Greenstein, M. (2006) Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **33**, 815–826.

Binder, E.M. (2007) Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, Feed Safety, **133**, 149–166.

Birch, A.J., Holzapfel, C.W. & Rickards, R.W. (1966) The structure and some aspects of the biosynthesis of pleuromutilin. *Tetrahedron*, **22**, 359–387.

Birch, A.J., Massy-Westropp, R.A., Rickards, R.W. & Smith, H. (1958) 66. Studies in relation to biosynthesis. Part XIII. Griseofulvin. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 360–365.

Blin, K., Medema, M.H., Kazempour, D., Fischbach, M.A., Breitling, R., Takano, E., *et al.* (2013) antiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Research*, gkt449.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. (2014) Marine natural products. *Natural Product Reports*, **31**, 160.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. (2015a) Marine natural products. *Natural Product Reports*, **32**, 116–211.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. (2015b) Marine natural products. *Natural Product Reports*, **32**, 116–211.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. (2016) Marine natural products. *Natural Product Reports*, **33**, 382–431.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. & Prinsep, M.R. (2003) Marine natural products. *Natural Product Reports*, **20**, 1–48.

Boddy, C.N. (2014) Bioinformatics tools for genome mining of polyketide and non-ribosomal peptides. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **41**, 443–450.

Bode, H.B., Bethe, B., Höfs, R. & Zeeck, A. (2002) Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, **3**, 619–627.

Boettger, D. & Hertweck, C. (2013) Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids. *ChemBioChem*, **14**, 28–42.

Bohni, N., Hofstetter, V., Gindro, K., Buyck, B., Schumpp, O., Bertrand, S., *et al.* (2016) Production of fusaric acid by *Fusarium* spp. in pure culture and in solid medium co-cultures. *Molecules*, **21**, 370.

Boulet, C.A. & Poulton, G.A. (1983) Pentaketide metabolites from *Potebniamyces gallicola* n. sp. *Canadian journal of chemistry*, **61**, 2285–2286.

Brakhage, A.A. (2012) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 21–32.

Brauers, G., Edrada, R.A., Ebel, R., Proksch, P., Wray, V., Berg, A., *et al.* (2000) Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: novel inhibitors of protein kinases. *Journal of Natural Products*, **63**, 739–745.

Breen, J., Dacre, J.C., Raistrick, H. & Smith, G. (1955) Studies in the biochemistry of micro-organisms. 95. Rugulosin, a crystalline colouring matter of Penicillium rugulosum Thom. *The Biochemical Journal*, **60**, 618–626.

Bringmann, G., Lang, G., Steffens, S. & Schaumann, K. (2004) Petrosifungins A and B, novel cyclodepsipeptides from a sponge-derived strain of *Penicillium brevicompactum*. *Journal of Natural Products*, **67**, 311–315.

Brunati, M., Rojas, J.L., Sponga, F., Ciciliato, I., Losi, D., Göttlich, E., *et al.* (2009) Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics*, **2**, 43–50.

Bull, A.T., Ward, A.C. & Goodfellow, M. (2000) Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**, 573–606.

Burdige, D.J. (2007) Preservation of organic matter in marine sediments: controls, mechanisms, and an imbalance in sediment organic carbon budgets? *Chemical Reviews*, **107**, 467–485.

Burgaud, G., Arzur, D., Durand, L., Cambon-Bonavita, M.-A. & Barbier, G. (2010) Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. *FEMS Microbiology Ecology*, **73**, 121–133.

Burgaud, G., Le Calvez, T., Arzur, D., Vandenkoornhuyse, P. & Barbier, G. (2009) Diversity of culturable marine filamentous fungi from deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology*, **11**, 1588–1600.

– C –

Cacho, R.A., Chooi, Y.-H., Zhou, H. & Tang, Y. (2013) Complexity generation in fungal polyketide biosynthesis: a spirocycle-forming P450 in the concise pathway to the antifungal drug griseofulvin. *ACS chemical biology*, **8**, 2322–2330.

Cai, W.-J. & Sayles, F.L. (1996) Oxygen penetration depths and fluxes in marine sediments. *Marine Chemistry*, **52**, 123–131.

Campbell, C.D. & Vederas, J.C. (2010) Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. *Biopolymers*, **93**, 755–763.

Carlet, J. & Le Coz, P. (2015) Tous ensemble, sauvons les antibiotiques. *Ministère des affaires sociale, de la santé et des droits des femmes*.

Casanueva, A., Tuffin, M., Cary, C. & Cowan, D.A. (2010) Molecular adaptations to psychrophily: the impact of “omic” technologies. *Trends in Microbiology*, **18**, 374–381.

Champarnaud, E. & Hopley, C. (2011) Evaluation of the comparability of spectra generated using a tuning point protocol on twelve electrospray ionisation tandem-in-space mass spectrometers. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **25**, 1001–1007.

Chen, L., Fang, Y., Zhu, T., Gu, Q. & Zhu, W. (2008) Gentisyl alcohol derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. *Journal of Natural Products*, **71**, 66–70.

Chen, Z., Zheng, Z., Huang, H., Song, Y., Zhang, X., Ma, J., *et al.* (2012) Penicacids A–C, three new mycophenolic acid derivatives and immunosuppressive activities from the marine-derived fungus Penicillium sp. SOF07. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 3332–3335.

Christianson, D.W. (2008) Unearthing the roots of the terpenome. *Current opinion in chemical biology*, **12**, 141–150.

Ciobanu, M.-C., Burgaud, G., Dufresne, A., Breuker, A., Rédou, V., Maamar, S.B., *et al.* (2014) Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. *The ISME journal*, **8**, 1370–1380.

CLSI. (2014) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

Cox, R.J. (2007) Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **5**, 2010–2026.

Crawford, J.M. & Townsend, C.A. (2010) New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 879–889.

— D —

Damare, S., Raghukumar, C. & Raghukumar, S. (2006) Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **53**, 14–27.

Damare, S.R., Nagarajan, M. & Raghukumar, C. (2008) Spore germination of fungi belonging to *Aspergillus* species under deep-sea conditions. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **55**, 670–678.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., Gerday, C. & Gerday, C. (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, **7**, 385–389.

Debbab, A., Aly, A.H. & Proksch, P. (2012) Endophytes and associated marine derived fungi—ecological and chemical perspectives. *Fungal Diversity*, **57**, 45–83.

D'Hondt, S. (2004) Distributions of microbial activities in deep subseafloor sediments. *Science*, **306**, 2216–2221.

D'Hondt, S., Spivack, A.J., Pockalny, R., Ferdelman, T.G., Fischer, J.P., Kallmeyer, J., *et al.* (2009) Subseafloor sedimentary life in the south Pacific Gyre. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 11651–11656.

Dias, D.A., Urban, S. & Roessner, U. (2012) A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, **2**, 303–336.

Döhren, H. von. (2004) Biochemistry and general genetics of nonribosomal peptide synthetases in fungi. In *Molecular Biotechnolgy of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*, Advances in Biochemical Engineering (ed. by Brakhage, A.A.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 217–264.

Donadio, S., Maffioli, S., Monciardini, P., Sosio, M. & Jabes, D. (2010) Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *The Journal of Antibiotics*, **63**, 423–430.

Du, L., Feng, T., Zhao, B., Li, D., Cai, S., Zhu, T., *et al.* (2010) Alkaloids from a deep ocean sediment-derived fungus *Penicillium* sp. and their antitumor activities. *The Journal of Antibiotics*, **63**, 165–170.

— E —

Ebada, S.S. & Proksch, P. (2015) Marine-derived fungal metabolites. In *Springer Handbook of Marine Biotechnology* (ed. by Prof, S.-K.K.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 759–788.

Edgcomb, V., Orsi, W. & Biddle, J.F. (2014) Fungi in the marine subsurface. In *Microbial Life of the Deep Biosphere* (ed. by Kallmeyer, J. & Wagner, D.). Walter de Gruyter, Berlin/Boston, pp. 187–202.

Edgcomb, V., Orsi, W., Bunge, J., Jeon, S., Christen, R., Leslin, C., *et al.* (2011a) Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. I. Pyrosequencing vs Sanger insights into species richness. *The ISME Journal*, **5**, 1344–1356.

Edgcomb, V.P., Beaudoin, D., Gast, R., Biddle, J.F. & Teske, A. (2011b) Marine subsurface eukaryotes: the fungal majority. *Environmental Microbiology*, **13**, 172–183.

Eisfeld, K. (2009) Non-ribosomal peptide synthetases of fungi. In *Physiology and Genetics*, The Mycota (ed. by Anke, T. & Weber, D.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 305–330.

El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B.M., Cech, N.B., Pearce, C.J. & Oberlies, N.H. (2013) A high-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *Journal of natural products*, **76**.

Ellinger, B., Silber, J., Prashar, A., Landskron, J., Weber, J., Rehermann, S., *et al.* (2014) A phenotypic screening approach to identify anticancer compounds derived from marine fungi. *Assay and Drug Development Technologies*, **12**, 162–175.

– F –

Fang, J. & Zhang, L. (2011) Exploring the deep biosphere. *Science China Earth Sciences*, **54**, 157–165.

Farah, S.I., Abdelrahman, A.A., North, E.J. & Chauhan, H. (2016) Opportunities and challenges for natural products as novel antituberculosis agents. *ASSAY and Drug Development Technologies*, **14**, 29–38.

Faulkner, D.J. (1992) Marine natural products. *Natural Product Reports*, **9**, 323–364.

Faulkner, D.J. (2002) Marine natural products. *Natural Product Reports*, **19**, 1–49.

Feldmann, G., Mishra, A., Hong, S.-M., Bisht, S., Strock, C.J., Ball, D.W., *et al.* (2010) Inhibiting the Cyclin-Dependent Kinase CDK5 blocks pancreatic cancer formation and progression through the suppression of Ras-Ral signaling. *Cancer Research*, **70**, 4460–4469.

Fenical, W. & Jensen, P.R. (1993) Marine microorganisms: A new biomedical resource. In *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products* (ed. by Attaway, D.H. & Zaborsky, O.R.). Springer US, pp. 419–457.

Fenical, W. & Jensen, P.R. (2006) Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*, **2**, 666–673.

Finking, R. & Marahiel, M.A. (2004) Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology*, **58**, 453–488.

Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. (2009) Antibiotics for emerging pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, **325**, 1089–1093.

Fischer, J.P., Ferdelman, T.G., D'Hondt, S., Røy, H. & Wenzhöfer, F. (2009) Oxygen penetration deep into the sediment of the South Pacific gyre. *Biogeosciences*, **6**, 1467–1478.

Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology*, **10**, 226.

Fleming, A. (1945) Penicillin. World Scientific.

Franklin, T.J. & Cook, J.M. (1969) The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochemical Journal*, **113**, 515–524.

Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O. & Samson, R.A. (2004) Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in mycology*, **49**, 201–241.

Fry, J.C., Parkes, R.J., Cragg, B.A., Weightman, A.J. & Webster, G. (2008) Prokaryotic biodiversity and activity in the deep subseafloor biosphere: Diversity and activity in the deep subseafloor biosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, **66**, 181–196.

Fulthorpe, C.S., Hoyanagi, K., Crundwell, M.P., Dinarès-Turell, J., Ding, X., George, S.C., *et al.* (2010) Canterbury Basin sea level.

– G –

Gadanho, M. & Sampaio, J.P. (2005) Occurrence and diversity of yeasts in the Mid-Atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores archipelago. *Microbial Ecology*, **50**, 408–417.

Gao, S.-S., Li, X.-M., Zhang, Y., Li, C.-S., Cui, C.-M. & Wang, B.-G. (2011) Comazaphilones A−F, azaphilone derivatives from the marine sediment-derived fungus *Penicillium commune* QSD-17. *Journal of Natural Products*, **74**, 256–261.

Gaudêncio, S.P. & Pereira, F. (2015) Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. *Nat. Prod. Rep.*, **32**, 779–810.

Gensheimer, M. & Mushegian, A. (2004) Chalcone isomerase family and fold: No longer unique to plants. *Protein Science*, **13**, 540–544.

Geraci, J.E., Heilman, F.R., Nichols, D.R., Wellman, W.E., Ross, G.T. & Dorothy, R.O.S.E. (1956) Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin. *Proceedings of the staff meetings. Mayo Clinic*, **31**, 564–582.

Gerwick, W.H. & Moore, B.S. (2012) Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chemistry & Biology*, **19**, 85–98.

– H –

Haefner, B. (2003) Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug discovery today*, **8**, 536–544.

Hagens, W.I., Olinga, P., Meijer, D.K.F., Groothuis, G.M.M., Beljaars, L. & Poelstra, K. (2006) Gliotoxin non-selectively induces apoptosis in fibrotic and normal livers. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, **26**, 232–239.

Hamed, R.B., Gomez-Castellanos, J.R., Henry, L., Ducho, C., McDonough, M.A. & Schofield, C.J. (2013) The enzymes of β-lactam biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.*, **30**, 21–107.

Hansen, F.T., Sørensen, J.L., Giese, H., Sondergaard, T.E. & Frandsen, R.J.N. (2012) Quick guide to polyketide synthase and nonribosomal synthetase genes in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, **155**, 128–136.

Harris, J.P. & Mantle, P.G. (2001) Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, **58**, 709–716.

Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R. & Quinn, R.J. (2015) The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, **14**, 111–129.

Hashimoto, M., Nonaka, T. & Fujii, I. (2014) Fungal type III polyketide synthases. *Natural Product Reports*, **31**, 1306–1317.

Hölker, U. & Lenz, J. (2005) Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, **8**, 301–306.

Hollants, J., Leroux, O., Leliaert, F., Decleyre, H., Clerck, O.D. & Willems, A. (2011) Who is in there? Exploration of endophytic bacteria within the siphonous green seaweed *Bryopsis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *PLOS ONE*, **6**, e26458.

Hurne, A.M., Chai, C.L.L., Moerman, K. & Waring, P. (2002) Influx of calcium through a redox-sensitive plasma membrane channel in thymocytes causes early necrotic cell death induced by the epipolythiodioxopiperazine toxins. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 31631–31638.

— I —

Imhoff, J.F. (2016) Natural products from marine fungi—still an underrepresented resource. *Marine Drugs*, **14**, 19.

Inagaki, F., Hinrichs, K.-U., Kubo, Y., Bowles, M.W., Heuer, V.B., Hong, W.-L., *et al.* (2015) Exploring deep microbial life in coal-bearing sediment down to ~2.5 km below the ocean floor. *Science*, **349**, 420–424.

Itoh, T., Tokunaga, K., Matsuda, Y., Fujii, I., Abe, I., Ebizuka, Y., *et al.* (2010) Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases. *Nature Chemistry*, **2**, 858–864.

— J —

Jain, P., Karthikeyan, C., Moorthy, N.S.H.N., Waiker, D.K., Jain, A.K. & Trivedi, P. (2014) Human CDC2-like kinase 1 (CLK1): a novel target for Alzheimer's disease. *Current Drug Targets*, **15**, 539–550.

Jannasch, H.W. & Taylor, C.D. (1984) Deep-sea microbiology. *Annual Review of Microbiology*, **38**, 487–487.

Jaspars, M., De Pascale, D., Andersen, J.H., Reyes, F., Crawford, A.D. & Ianora, A. (2016) The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **96**, 151–158.

Johnson, T.W. & Sparrow, F.K. (1961) Fungi in oceans and estuaries., *Fungi in oceans and estuaries*.

Jones, E.B.G. (2011) Are there more marine fungi to be described? *Botanica Marina*, **54**.

Jones, E.B.G., Suetrong, S., Sakayaroj, J., Bahkali, A.H., Abdel-Wahab, M.A., Boekhout, T., *et al.* (2015) Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity*, **73**, 1–72.

Jørgensen, B.B. & Boetius, A. (2007) Feast and famine-microbial life in the deep-sea bed. *Nature reviews. Microbiology*, **5**, 770–81.

Joubert, A., Calmes, B., Berruyer, R., Pihet, M., Bouchara, J.-P., Simoneau, P., *et al.* (2010) Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *BioTechniques*, **48**, 399–404.

Julianti, E., Lee, J.-H., Liao, L., Park, W., Park, S., Oh, D.-C., *et al.* (2013) New Polyaromatic Metabolites from a Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. *Organic Letters*, **15**, 1286–1289.

– K –

Kansoh, A.L., Khattab, O.H., Abd-Elrazek, Z.M. & Motawea, H.M. (2010) Broad spectrum antimicrobial agent from a local isolate of marine fungus. *Journal of Applied Sciences Research*, **6**, 580–588.

Kato, S. & Yamagishi, A. (2011) Microbial biodiversity and biogeography on the deep seafloor. In *Changing diversity in changing environment* (ed. by Grillo, O. & Venora, G.). InTech, Rijeka, Croatia.

Kavanagh, F., Hervey, A. & Robbins, W.J. (1951) Antibiotic substances from Basidiomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **37**, 570–574.

Kawaide, H., Imai, R., Sassa, T. & Kamiya, Y. (1997) ent-Kaurene Synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487 cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 21706–21712.

Keller, N.P., Turner, G. & Bennett, J.W. (2005) Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 937–947.

Khaldi, N., Seifuddin, F.T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W.C., Wolfe, K.H., *et al.* (2010) SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology*, **47**, 736–741.

Khoa, L.V., Hatai, K., Yuasa, A. & Sawada, K. (2005) Morphology and molecular phylogeny of Fusarium solani isolated from kuruma prawn Penaeus japonicus with black gills. *Fish Pathology*, **40**, 103–109.

Kildgaard, S., Mansson, M., Dosen, I., Klitgaard, A., Frisvad, J.C., Larsen, T.O., *et al.* (2014) Accurate dereplication of bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi by UHPLC-DAD-QTOFMS and a MS/HRMS library. *Marine Drugs*, **12**, 3681–3705.

Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. (1979) *Marine Mycology: The Higher Fungi*. Elsevier.

Kulatunga, D.C.M., Dananjaya, S.H.S., Park, B.K., Kim, C.-H., Lee, J. & De Zoysa, M. (2016) First report of *Fusarium oxysporum* species complex infection in zebrafish culturing system. *Journal of Fish Diseases*.

– L –

Lai, X., Cao, L., Tan, H., Fang, S., Huang, Y. & Zhou, S. (2007) Fungal communities from methane hydrate-bearing deep-sea marine sediments in South China Sea. *The ISME Journal*, **1**, 756–762.

Lam, K.S. (2007) New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, **15**, 279–289.

Lang, G., Mayhudin, N.A., Mitova, M.I., Sun, L., Sar, S. van der, Blunt, J.W., *et al.* (2008) Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. *Journal of Natural Products*, **71**, 1595–1599.

Lapenna, S. & Giordano, A. (2009) Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, **8**, 547–566.

Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., *et al.* (2013) Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, **13**, 1057–1098.

Le Calvez, T., Burgaud, G., Mahe, S., Barbier, G. & Vandenkoornhuyse, P. (2009) Fungal diversity in deep-sea hydrothermal ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 6415–6421.

Li, C.-S., An, C.-Y., Li, X.-M., Gao, S.-S., Cui, C.-M., Sun, H.-F., *et al.* (2011a) Triazole and dihydroimidazole alkaloids from the marine sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. *Journal of Natural Products*, **74**, 1331–1334.

Li, C.-S., Li, X.-M., Gao, S.-S., Lu, Y.-H. & Wang, B.-G. (2013a) Cytotoxic anthranilic acid derivatives from deep sea sediment-derived fungus *Penicillium paneum* SD-44. *Marine Drugs*, **11**, 3068–3076.

Li, D., Chen, L., Zhu, T., Kurtán, T., Mándi, A., Zhao, Z., *et al.* (2011b) Chloctanspirones A and B, novel chlorinated polyketides with an unprecedented skeleton, from marine sediment derived fungus Penicillium terrestre. *Tetrahedron*, **67**, 7913–7918.

Li, Y.-X., Himaya, S.W.A., Dewapriya, P., Zhang, C. & Kim, S.-K. (2013b) Fumigaclavine C from a marine-derived fungus *Aspergillus fumigatus* induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Marine Drugs*, **11**, 5063–5086.

Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., *et al.* (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, **517**, 455–459.

Liu, X., Wang, L., Steffan, N., Yin, W.-B. & Li, S.-M. (2009) Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: FgaAT catalyses the acetylation of fumigaclavine B. *ChemBioChem*, **10**, 2325–2328.

Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., *et al.* (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, **16**, 161–168.

Lorenz, N., Haarmann, T., Pažoutová, S., Jung, M. & Tudzynski, P. (2009) The ergot alkaloid gene cluster: Functional analyses and evolutionary aspects. *Phytochemistry*, **70**, 1822–1832.

– M –

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., *et al.* (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **18**, 268–281.

Mahé, S., Rédou, V., Le Calvez, T., Vandenkoornhuyse, P. & Burgaud, G. (2014) Fungi in deep-sea environments and metagenomics.

Marahiel, M.A. & Essen, L. -O. (2009) Chapter 13 nonribosomal peptide synthetases. In *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 337–351.

Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H. & Santos, S. (2014) Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical Industries: tips for success. *Marine Drugs*, **12**, 1066–1101.

Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Taglialatela-Scafati, O. & Fusetani, N. (2013) Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs*, **11**, 2510–2573.

Mazmanian, S.K. (1999) *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, **285**, 760–763.

Michael, S.E. (1948) Studies in the biochemistry of micro-organisms. 79. Fuscin, a metabolic product of Oidiodendron fuscum Robak. Part 1. Preparation, properties and antibacterial activity. *Biochemical Journal*, **43**, 528–533.

Millward, M., Mainwaring, P., Mita, A., Federico, K., Lloyd, G.K., Reddinger, N., *et al.* (2011) Phase 1 study of the novel vascular disrupting agent plinabulin (NPI-2358) and docetaxel. *Investigational New Drugs*, **30**, 1065–1073.

Millward, M., Price, T., Townsend, A., Sweeney, C., Spencer, A., Sukumaran, S., *et al.* (2012) Phase 1 clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on in vitro assessments of the combination. *Investigational New Drugs*, **30**, 2303–2317.

Minic, Z., Serre, V. & Hervé, G. (2006) Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes Rendus Biologies*, **329**, 527–540.

Mitterbauer, R. & Specht, T. (2011) Polypeptide having diterpene synthase activity.

Monteith, G.R., Davis, F.M. & Roberts-Thomson, S.J. (2012) Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 31666–31673.

Mootz, H.D., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A. (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*, **3**, 490–504.

Muller-Karger, F.E., Varela, R., Thunell, R., Luerssen, R., Hu, C. & Walsh, J.J. (2005) The importance of continental margins in the global carbon cycle. *Geophysical Research Letters*, **32**, L01602.

Muñiz, C.C., Zelaya, T.E.C., Esquivel, G.R. & Fernández, F.J. (2007) Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **49**, 88–98.

Munos, B. (2009) Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nature Reviews Drug Discovery*, **8**, 959–968.

– N –

Nagahama, T., Hamamoto, M., Nakase, T., Takaki, Y. & Horikoshi, K. (2003) *Cryptococcus surugaensis* sp. nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep-sea floor of Suruga Bay. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 2095–2098.

Nagahama, T. & Nagano, Y. (2012) Cultured and uncultured fungal diversity in deep-sea environments. In *Biology of Marine Fungi* (ed. by Raghukumar, C.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 173–187.

Nagahama, T., Takahashi, E., Nagano, Y., Abdel-Wahab, M.A. & Miyazaki, M. (2011) Molecular evidence that deep-branching fungi are major fungal components in deep-sea methane cold-seep sediments. *Environmental Microbiology*, **13**, 2359–2370.

Nagano, Y., Konishi, M., Nagahama, T., Kubota, T., Abe, F. & Hatada, Y. (2016) Retrieval of deeply buried culturable fungi in marine subsurface sediments, Suruga-Bay, Japan. *Fungal Ecology*, **20**, 256–259.

Nagano, Y., Nagahama, T. & Abe, F. (2014) Cold-adapted yeasts in deep-sea environments. In *Cold-adapted Yeasts* (ed. by Buzzini, P. & Margesin, R.). Springer Berlin Heidelberg, pp. 149–171.

Nagano, Y., Nagahama, T., Hatada, Y., Nunoura, T., Takami, H., Miyazaki, J., *et al.* (2010) Fungal diversity in deep-sea sediments – the presence of novel fungal groups. *Fungal Ecology*, **3**, 316–325.

Nakagaki, K., Hata, K., Iwata, E. & Takeo, K. (2000) *Malassezia pachydermatis* isolated from a south american sea lion(*Otaria byronia*) with dermatitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, **62**, 901–903.

Newman, D.J. & Cragg, G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, **70**, 461–477.

Newman, D.J. & Cragg, G.M. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, **75**, 311–335.

Newman, D.J. & Cragg, G.M. (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, **79**, 629–661.

Newton, B.A. (1956) The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological reviews*, **20**, 14.

Nicholson, T.P., Rudd, B.A.M., Dawson, M., Lazarus, C.M., Simpson, T.J. & Cox, R.J. (2001) Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chemistry & Biology*, **8**, 157–178.

Nigam, P.S. nee'. (2009) Production of bioactive secondary metabolites. In *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (ed. by Nigam, P.S. nee' & Pandey, A.). Springer Netherlands, pp. 129–145.

Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., *et al.* (2014) The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Research*, **42**, D26–D31.

Noto, T., Sawada, M., Ando, K. & Koyama, K. (1969) Some biological properties of mycophenolic acid. *The Journal of Antibiotics*, **22**, 165–169.

– O –

Oda, T., Namikoshi, M., Akano, K., Kobayashi, H., Honma, Y. & Kasahara, T. (2005) Verrucarin A inhibition of MAP kinase activation in a PMA-stimulated promyelocytic leukemia cell line. *Marine Drugs*, **3**, 64–73.

Oger, P.M. & Jebbar, M. (2010) The many ways of coping with pressure. *Research in Microbiology*, **161**, 799–809.

Oh, D.-C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. & Fenical, W. (2007) Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *Journal of Natural Products*, **70**, 515–520.

Ohkawa, Y., Miki, K., Suzuki, T., Nishio, K., Sugita, T., Kinoshita, K., *et al.* (2010) Antiangiogenic metabolites from a marine-derived fungus, *Hypocrea vinosa*. *Journal of Natural Products*, **73**, 579–582.

Orcutt, B.N., Sylvan, J.B., Knab, N.J. & Edwards, K.J. (2011) Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **75**, 361–422.

Orsi, W., Biddle, J.F. & Edgcomb, V. (2013a) Deep sequencing of subseafloor eukaryotic rRNA reveals active fungi across marine subsurface provinces. *PLOS ONE*, **8**, e56335.

Orsi, W.D., Edgcomb, V.P., Christman, G.D. & Biddle, J.F. (2013b) Gene expression in the deep biosphere. *Nature*, **499**, 205–208.

Osterhage, C., Kaminsky, R., König, G.M. & Wright, A.D. (2000) Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. *The Journal of Organic Chemistry*, **65**, 6412–6417.

Oxford, A.E., Raistrick, H. & Simonart, P. (1939) Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochemical Journal*, **33**, 240–248.

– P –

Pachiadaki, M.G., Rédou, V., Beaudoin, D.J., Burgaud, G. & Edgcomb, V.P. (2016) Fungal and prokaryotic activities in the marine subsurface biosphere at Peru margin and Canterbury basin inferred from RNA-based analyses and microscopy. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 846.

Pang, K.-L., Overy, D.P., Jones, E.B.G., Calado, M. da L., Burgaud, G., Walker, A.K., *et al.* (2016) "Marine fungi" and "marine-derived fungi" in natural product chemistry research: Toward a new consensual definition. *Fungal Biology Reviews*.

Parkes, R.J., Cragg, B., Roussel, E., Webster, G., Weightman, A. & Sass, H. (2014) A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere:geosphere interactions. *Marine Geology*, 50th Anniversary Special Issue, **352**, 409–425.

Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S. & Hoyer, D. (2016) An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discovery Today*, **21**, 204–207.

Pawlowski, J., Christen, R., Lecroq, B., Bachar, D., Shahbazkia, H.R., Amaral-Zettler, L., *et al.* (2011) Eukaryotic richness in the abyss: Insights from Pyrotag sequencing. *PLOS ONE*, **6**, e18169.

Pérez-Vicente, L., Dita, M.A. & Martínez- de la Parte, E. (2014) Technical manual prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4 (TR4).

Petit, K.E., Mondeguer, F., Roquebert, M.F., Biard, J.F. & Pouchus, Y.F. (2004) Detection of griseofulvin in a marine strain of *Penicillium waksmanii* by ion trap mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, **58**, 59–65.

Piel, J. (2009) Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 338–362.

Poirel, L., Kieffer, N., Liassine, N., Thanh, D. & Nordmann, P. (2016) Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *The Lancet Infectious Diseases*, **16**, 281.

Pollock, C.G., Rohrbach, B. & Ramsay, E.C. (2000) Fungal dermatitis in captive pinnipeds. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **31**, 374–378.

Potts, B.C., Albitar, M.X., Anderson, K.C., Baritaki, S., Berkers, C., Bonavida, B., *et al.* (2011) Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials. *Current cancer drug targets*, **11**, 254–284.

Proksch, P., Edrada, R. & Ebel, R. (2002) Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 125–134.

Pruksakorn, P., Arai, M., Kotoku, N., Vilchèze, C., Baughn, A.D., Moodley, P., *et al.* (2010) Trichoderins, novel aminolipopeptides from a marine sponge-derived Trichoderma sp., are active against dormant mycobacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 3658–3663.

Pruksakorn, P., Arai, M., Liu, L., Moodley, P., Jacobs Jr., W.R. & Kobayashi, M. (2011) Action-mechanism of trichoderin A, an anti-dormant mycobacterial aminolipopeptide from marine sponge-derived *Trichoderma* sp. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **34**, 1287–1290.

– R –

Radić, N. & Bratkovič, T. (2012) Future antibiotic agents: turning to nature for inspiration. In *Antimicrobial Agents* (ed. by Bobbarala, V.). InTech, pp. 25–50.

Raghukumar, C. & Raghukumar, S. (1998) Barotolerance of fungi isolated from deep-sea sediments of the Indian Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, **15**, 153–163.

Raghukumar, C., Raghukumar, S., Sheelu, G., Gupta, S.M., Nagender Nath, B. & Rao, B.R. (2004) Buried in time: culturable fungi in a deep-sea sediment core from the Chagos Trench, Indian Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **51**, 1759–1768.

Ramirez-Llodra, E., Brandt, A., Danovaro, R., De Mol, B., Escobar, E., German, C.R., *et al.* (2010) Deep, diverse and definitely different: unique attributes of the world's largest ecosystem. *Biogeosciences*, **7**, 2851–2899.

Rateb, M.E. & Ebel, R. (2011) Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Natural Product Reports*, **28**, 290.

Rédou, V., Ciobanu, M.C., Pachiadaki, M.G., Edgcomb, V., Alain, K., Barbier, G., *et al.* (2014) In-depth analyses of deep subsurface sediments using 454-pyrosequencing reveals a reservoir of buried fungal communities at record-breaking depths. *FEMS Microbiology Ecology*, **90**, 908–921.

Rédou, V., Navarri, M., Meslet-Cladière, L., Barbier, G. & Burgaud, G. (2015) Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 3571–3583.

Rédou, V., Vallet, M., Meslet-Cladière, L., Kumar, A., Pang, K.-L., Pouchus, Y.-F., *et al.* (2016) Marine fungi. In *The Marine Microbiome* (ed. by Stal, L.J. & Cretoiu, M.S.). Springer International Publishing, pp. 99–153.

Rekah, Y., Shtienberg, D. & Katan, J. (2000) Disease development following infection of tomato and basil foliage by airborne conidia of the soilborne pathogens Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici and F. oxysporum f. sp. basilici. *Phytopathology*, **90**, 1322–1329.

Ridgwell, A. & Arndt, S. (2014) Why dissolved organics matter: DOC in ancient oceans and past climates change. In *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (ed. by Hansell, D.A. & Carlson, C.A.). Academic Press.

Rigbers, O. & Li, S.-M. (2008) Ergot Alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* overproduction and biochemical characterization of a 4-dimethylallyltryptophan n-methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 26859–26868.

Roberts, R.R., Hota, B., Ahmad, I., Scott, R.D., Foster, S.D., Abbasi, F., *et al.* (2009) Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: Implications for antibiotic stewardship. *Clinical Infectious Diseases*, **49**, 1175–1184.

Rossolini, G.M., Arena, F., Pecile, P. & Pollini, S. (2014) Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, **18**, 56–60.

Roth, F.J., Orpurt, P.A. & Ahearn, D.G. (1964) Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment. *Canadian Journal of Botany*, **42**, 375–383.

Rothschild, L.J. & Mancinelli, R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature*, **409**, 1092–1101.

Roy, H., Kallmeyer, J., Adhikari, R.R., Pockalny, R., Jorgensen, B.B. & D'Hondt, S. (2012) Aerobic microbial respiration in 86-million-year-old deep-sea red clay. *Science*, **336**, 922–925.

– S –

Sautour, M., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., Laurent, J., Barbezant, M., Sixt, N., *et al.* (2015) Contamination des circuits d'alimentation en eau par *Fusarium*. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, **25**, e95–e96.

Schatz, A., Bugle, E. & Waksman, S.A. (1944) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Experimental Biology and Medicine*, **55**, 66–69.

Schippers, A. (2015) Deep biosphere. In *Encyclopedia of Marine Geosciences* (ed. by Harff, J., Meschede, M., Petersen, S. & Thiede, J.). Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–19.

Schippers, A., Neretin, L.N., Kallmeyer, J., Ferdelman, T.G., Cragg, B.A., John Parkes, R., *et al.* (2005) Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature*, **433**, 861–864.

Schmitt, S., Weisz, J.B., Lindquist, N. & Hentschel, U. (2007) Vertical transmission of a phylogenetically complex microbial consortium in the viviparous sponge *Ircinia felix*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 2067–2078.

Schrenk, M.O., Huber, J.A. & Edwards, K.J. (2010) Microbial provinces in the subseafloor. *Annual Review of Marine Science*, **2**, 279–304.

Seibert, S.F., Krick, A., Eguereva, E., Kehraus, S. & König, G.M. (2007) Ascospiroketals A and B, unprecedented cycloethers from the marine-derived fungus *Ascochyta salicorniae*. *Organic Letters*, **9**, 239–242.

Shang, Z., Li, X., Meng, L., Li, C., Gao, S., Huang, C., *et al.* (2012) Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus Penicillium commune SD-118. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **30**, 305–314.

Shibata, S. (1973) Some recent studies on the metabolites of fungi and lichens. *Pure and Applied Chemistry*, **33**.

Simpson, T.J. & Holker, J.S.E. (1977) 13C-NMR studies on griseofulvin biosynthesis and acetate metabolism in Penicillium patulum. *Phytochemistry*, **16**, 229–233.

Singh, P., Raghukumar, C., Meena, R.M., Verma, P. & Shouche, Y. (2012) Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Fungal Ecology*, **5**, 543–553.

Singh, P., Raghukumar, C., Verma, P. & Shouche, Y. (2011) Fungal Community analysis in the deep-sea sediments of the central indian basin by culture-independent approach. *Microbial Ecology*, **61**, 507–517.

Singh, P., Raghukumar, C., Verma, P. & Shouche, Y. (2010) Phylogenetic diversity of culturable fungi from the deep-sea sediments of the Central Indian Basin and their growth characteristics. *Fungal Diversity*, **40**, 89–102.

Singh, S.B. & Barrett, J.F. (2006) Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*, **71**, 1006–1015.

Skropeta, D. & Wei, L. (2014) Recent advances in deep-sea natural products. *Natural Product Reports*, **31**, 999.

Slightom, J.L., Metzger, B.P., Luu, H.T. & Elhammer, A.P. (2009) Cloning and molecular characterization of the gene encoding the Aureobasidin A biosynthesis complex in *Aureobasidium pullulans* BP-1938. *Gene*, **431**, 67–79.

Spatafora, J.W., Volkmann-Kohlmeyer, B. & Kohlmeyer, J. (1998) Independent terrestrial origins of the Halosphaeriales (marine Ascomycota). *American Journal of Botany*, **85**, 1569–1580.

Spížek, J., Novotná, J., Řezanka, T. & Demain, A.L. (2010) Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **37**, 1241–1248.

Stansly, P.G. & Schlosser, M.E. (1947) Studies on polymyxin: Isolation and identification of *Bacillus polymyxa* and differentiation of polymyxin from certain known antibiotics. *Journal of Bacteriology*, **54**, 549–556.

Stock, A., Breiner, H.-W., Pachiadaki, M., Edgcomb, V., Filker, S., La Cono, V., *et al.* (2012) Microbial eukaryote life in the new hypersaline deep-sea basin Thetis. *Extremophiles*, **16**, 21–34.

Sumarah, M.W., Adams, G.W., Berghout, J., Slack, G.J., Wilson, A.M. & Miller, J.D. (2008) Spread and persistence of a rugulosin-producing endophyte in Picea glauca seedlings. *Mycological Research*, **112**, 731–736.

– T –

Takishita, K., Tsuchiya, M., Reimer, J.D. & Maruyama, T. (2006) Molecular evidence demonstrating the basidiomycetous fungus Cryptococcus curvatus is the dominant microbial eukaryote in sediment at the Kuroshima Knoll methane seep. *Extremophiles*, **10**, 165–169.

Takishita, K., Yubuki, N., Kakizoe, N., Inagaki, Y. & Maruyama, T. (2007) Diversity of microbial eukaryotes in sediment at a deep-sea methane cold seep: surveys of ribosomal DNA libraries from raw sediment samples and two enrichment cultures. *Extremophiles*, **11**, 563–576.

Tautenhahn, W.A., Cho, K., Uritboonthai, W., Zhu, Z., Patti, G.J. & Siuzdak, G. (2012) An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. *Nature Biotechnology*, **30**, 825–826.

Tenover, F.C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, **119**, S3–S10.

Teske, A. & Sørensen, K.B. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *The ISME journal*, **2**, 3–18.

Thistle, D. (2003) The deep-sea floor: an overview. *Ecosystems of the World*, 5–38.

Thornton, C.O.D. (2012) Primary production in the ocean. In *Advances in photosynthesis: fundamental aspects* (ed. by Mohammad Madhi, N.). InTech, Rijeka (Croacia).

Tsukagoshi, T., Tokiwano, T. & Oikawa, H. (2007) Studies on the later stage of the biosynthesis of pleuromutilin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**, 3116–3121.

Tunnicliffe, V., Juniper, S.K. & Sibuet, M. (2003) Reducing environments of the deep-sea floor. *Ecosystems of the World*, 81–110.

– U –

Ueno, Y., Sato, N., Ito, T., Ueno, I., Enomoto, M. & Tsunoda, H. (1980) Chronic toxicity and hepatocarcinogenicity of (+) rugulosin, an anthraquinoid mycotoxin from *Penicillium* species: preliminary surveys in mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, **5**, 295–302.

Undabarrena, A., Beltrametti, F., Claverías, F.P., González, M., Moore, E.R.B., Seeger, M., *et al.* (2016) Exploring the diversity and antimicrobial potential of marine actinobacteria from the comau fjord in northern Patagonia, Chile. *Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 1135.

Unsöld, I.A. & Li, S.-M. (2005) Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from Aspergillus fumigatus. *Microbiology (Reading, England)*, **151**, 1499–1505.

Unsöld, I.A. & Li, S.-M. (2006) Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: Gene expression, purification, and characterization of Fumigaclavine C synthase FGAPT1. *ChemBioChem*, **7**, 158–164.

– V –

Valliappan, K., Sun, W. & Li, Z. (2014) Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 7365–7377.

Von Nussbaum, F. & Süssmuth, R.D. (2015) Multiple attack on bacteria by the new antibiotic teixobactin. *Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 6684–6686.

– W –

Wallwey, C. & Li, S.-M. (2011) Ergot alkaloids: Structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.*, **28**, 496–510.

Wallwey, C., Matuschek, M. & Li, S.-M. (2010) Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: Conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH. *Archives of Microbiology*, **192**, 127–134.

Walsh, C.T. & Fischbach, M.A. (2010) Natural Products Version 2.0: Connecting genes to molecules. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 2469–2493.

Walsh, C.T. & Wright, G. (2005) Introduction: antibiotic resistance. *Chemical Reviews*, **105**, 391–394.

Wang, M.-H., Li, X.-M., Li, C.-S., Ji, N.-Y. & Wang, B.-G. (2013) Secondary metabolites from *Penicillium pinophilum* SD-272, a marine sediment-derived fungus. *Marine Drugs*, **11**, 2230–2238.

Wang, W., Zhu, T., Tao, H., Lu, Z., Fang, Y., Gu, Q., *et al.* (2007) Two new cytotoxic quinone type compounds from the halotolerant fungus *Aspergillus variecolor*. *The Journal of Antibiotics*, **60**, 603–607.

Wawrzyn, G.T., Bloch, S.E. & Schmidt-Dannert, C. (2012) Discovery and characterization of terpenoid biosynthetic pathways of fungi. In *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc, pp. 83–105.

Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H.U., Bruccoleri, R., *et al.* (2015) antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, **43**, W237–W243.

Weisz, J.B., Hentschel, U., Lindquist, N. & Martens, C.S. (2007) Linking abundance and diversity of sponge-associated microbial communities to metabolic differences in host sponges. *Marine Biology*, **152**, 475–483.

Wenzhöfer, F., Holby, O. & Kohls, O. (2001) Deep penetrating benthic oxygen profiles measured in situ by oxygen optodes. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **48**, 1741–1755.

Wiemann, P. & Keller, N.P. (2014) Strategies for mining fungal natural products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **41**, 301–313.

Wolfender, J.-L., Marti, G., Thomas, A. & Bertrand, S. (2015) Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, Editors' Choice IX, **1382**, 136–164.

Wolfender, J.-L., Rudaz, S., Hae Choi, Y. & Kyong Kim, H. (2013) Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. *Current Medicinal Chemistry*, **20**, 1056–1090.

Wright, G. (2015) Antibiotics: An irresistible newcomer. *Nature*, **517**, 442–444.

– X –

Xu, J., Song, Y., Guo, Y., Mei, Y. & Tan, R. (2014a) Fumigaclavines D–H, new ergot alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Planta Medica*, **80**, 1131–1137.

Xu, W., Gavia, D.J. & Tang, Y. (2014b) Biosynthesis of fungal indole alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **31**, 1474–1487.

Xu, W., Luo, Z.-H., Guo, S. & Pang, K.-L. (2016) Fungal community analysis in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean assessed by comparison of ITS, 18S and 28S ribosomal DNA regions. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **109**, 51–60.

– Y –

Yamazaki, H., Koyama, N., Ōmura, S. & Tomoda, H. (2010) New rugulosins, anti-MRSA antibiotics, produced by *Penicillium radicum* FKI-3765-2. *Organic Letters*, **12**, 1572–1575.

Yan, K., Madden, L., Choudhry, A.E., Voigt, C.S., Copeland, R.A. & Gontarek, R.R. (2006) Biochemical characterization of the interactions of the novel pleuromutilin derivative retapamulin with bacterial ribosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**, 3875–3881.

Yayanos, A.A. (1995) Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annual Review of Microbiology*, **49**, 777–805.

Yu, Z., Lang, G., Kajahn, I., Schmaljohann, R. & Imhoff, J.F. (2008) Scopularides A and B, cyclodepsipeptides from a marine sponge-derived fungus, *Scopulariopsis brevicaulis*. *Journal of Natural Products*, **71**, 1052–1054.

Yu, Z., Zhang, B., Sun, W., Zhang, F. & Li, Z. (2013) Phylogenetically diverse endozoic fungi in the South China Sea sponges and their potential in synthesizing bioactive natural products suggested by PKS gene and cytotoxic activity analysis. *Fungal Diversity*, **58**, 127–141.

– Z –

Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y. & Wang, X. (2012a) Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *The Analyst*, **137**, 293–300.

Zhang, H., Tang, Y., Ruan, C. & Bai, X. (2016) Bioactive secondary metabolites from the endophytic *Aspergillus* genus. *Records of Natural Products*, **10**, 1–16.

Zhang, L., An, R., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., *et al.* (2005) Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Current opinion in microbiology*, **8**, 276–281.

Zhang, W., Li, Z., Miao, X. & Zhang, F. (2009) The screening of antimicrobial bacteria with diverse novel ponribosomal Peptide synthetase (NRPS) genes from south China sea sponges. *Marine Biotechnology*, **11**, 346–355.

Zhang, X., Sun, Y., Bao, J., He, F., Xu, X. & Qi, S. (2012b) Phylogenetic survey and antimicrobial activity of culturable microorganisms associated with the South China Sea black coral *Antipathes dichotoma*. *FEMS Microbiology Letters*, **336**, 122–130.

Zhang, X., Tang, G., Xu, X., Nong, X. & Qi, S.-H. (2014) Insights into deep-sea sediment fungal communities from the East Indian Ocean using targeted environmental sequencing combined with traditional cultivation. *PLOS ONE*, **9**, e109118.

Zhang, X.-Y., Zhang, Y., Xu, X.-Y. & Qi, S.-H. (2013) Diverse deep-sea fungi from the South China Sea and their antimicrobial activity. *Current Microbiology*, **67**, 525–530.

Zhou, K., Zhang, X., Zhang, F. & Li, Z. (2011) Phylogenetically diverse cultivable fungal community and Polyketide Synthase (PKS), Non-ribosomal Peptide Synthase (NRPS) genes associated with the South China Sea sponges. *Microbial Ecology*, **62**, 644–654.

Ziegler, J. & Facchini, P.J. (2008) Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 735–769.

Ziemert, N., Podell, S., Penn, K., Badger, J.H., Allen, E. & Jensen, P.R. (2012) The Natural Product Domain Seeker NaPDoS: A phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. *PLOS ONE*, **7**, e34064.

Zinger, L., Gobet, A. & Pommier, T. (2012) Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity: Sequencing aquatic microbial diversity. *Molecular Ecology*, **21**, 1878–1896.

– Brevets –

Fenical, W., Jensen, P.R. & Cheng, X.C. Halimide, a cytotoxic marine natural product, and derivatives thereof. [en ligne]. 2000. https://www.google.com/patents/US6069146
[accessed on 22/07/2016].

Imhoff, J., Yu, Z., Lang, G., Wiese, J., Kalthoff, H. & Klose, S. Production and use of antitumoral cyclodepsipeptides. [en ligne]. 2009. https://www.google.com/patents/US8772445
[accessed on 12/09/2016].

– Liens Internet –

Adis International Ltd. (2016) Plinabulin. http://adisinsight.springer.com/drugs/800020886
[accessed on 18/10/2016].

AMR Review. (2014) Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. http://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
[accessed on 14/08/2016].

BeyondSpring Pharmaceuticals. (2016) Pipeline - BeyondSpring Pharmaceuticals http:// http://www.beyondspringpharma.com/en/pipeline/
[accessed on 18/10/2016].

CDC. (2013) Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf
[accessed on 14/08/16].

ECDC. (2016) Antimicrobial resistance interactive database (EARS-Net). http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx [accessed on 19/08/16].

ECDC & EMA. (2009) The bacterial challenge: time to react a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/11/WC500008770.pdf [accessed on 19/08/16].

International Ocean Discovery Program. (2016) Expedition Statistics. http://iodp.org/expeditions/expedition-statistics [accessed on 15/08/2016].

World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1 [accessed on 19/08/2016].

– Thèses –

Rédou, V. Communautés fongiques des sédiments marins de subsurface : diversité, origine et rôle écologique. Thèse en Microbiologie. Université de Bretagne Occidentale, 2014, 318 pages.

Yao, Q. Biosynthetic Studies of Fungal Diterpene Antibiotics. Master en Sciences Pharmacie. Oregon State University, 2007, 203 pages.

VALORISATION DES TRAVAUX

– Publications acceptées, soumise ou en préparation

Marion Navarri, Arnaud bondon, Sandrine Pottier, Stéphane Bach, Blandine Baratte, Sandrine Ruchaud, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud, Yannick Fleury. Bioactive metabolites from the deep subseafloor fungus *Oidiodendron griseum* UBOCC-A-114129*. En préparation*

Marion Navarri, Camille Jégou, Laurence Meslet-Cladière, Benjamin Brillet, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud, Yannick Fleury. 2016. Deep Subseafloor Fungi as an Untapped Reservoir of Amphipathic Antimicrobial Compounds. *Marine Drugs*. **14** (3): 50

Vanessa Rédou, **Marion Navarri**, Laurence Meslet-Cladière, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud. 2015. Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **81** (10): 3571-3583

– Communications

Par affiche

Marion Navarri, Camille Jégou, Laurence Meslet-Cladière, Benjamin Brillet, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud, Yannick Fleury. Deep sea fungi : a potential reservoir of new bioactive compounds. Groupement De Recherche MultiFonctionnalité des Peptides Antimicrobiens. Orléans, 26-27 Octobre 2015

Marion Navarri, Camille Jégou, Laurence Meslet-Cladière, Benjamin Brillet, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud, Yannick Fleury. Antimicrobial activities of deep-sea marine fungi. 1st International Conference of the Marine Fungal Natural Products Consotium. Nantes, 22-24 Juin 2015-*selectionné pour une flash communication (5min)*

Marion Navarri, Laurence Meslet-Cladière, Benjamin Brillet, Georges Barbier, Yannick Fleury, Gaëtan Burgaud. Deep sea fungi: an untapped resource of biotechnological potential. 4th international symposium on Antimicrobial Peptides. Lorient, 4-6 Juin 2014

MaCuMBA

www.macumbaproject.eu
www.facebook.com/MaCuMBAProject

Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving their Biotechnological Applications

Deep sea fungi: a potential reservoir of new bioactive compounds

NAVARRI M, JEGOU C , MESLET-CLADIÈRE L, BRILLET B, BARBIER G, BURGAUD G, FLEURY Y

Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA3882), Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Plouzané, France

Drug-resistant bacteria increase global mortality and so have become a major public health concern. [1]. Microorganisms from untapped ecosystems can be viewed as a chemical reservoir to fight back this threat. Marine fungi have been shown to produce many bioactive metabolites such as antibiotics [2]. Thus, deep-sea fungi appear as a treasure trove for novel biomolecules.

1. A collection of 183 deep-sea fungal strains was obtained from a deep-sea sediment core collected in the Canterbury basin(New-Zealand) [3]. All strains are preserved in the UBO Culture Collection [4]

2. An antimicrobial screening was performed using a plug diffusion method on 16 microbial targets as human/aquaculture pathogens
3. The production of bioactive metabolites was optimized for the most active strains. They were cultured on media with different concentrations of agar. Bioactive compounds were extracted from those cultures after 14 days according to the flow chart (Figure 1)

Figure 1 : Flow chart for extraction of bioactive compounds from culture media

PDB (Potato Dextrose Broth) ; PDB 0.2% (PDB + 0.2% of agar) ; PDA (PDB + 1.7% of agar); SPE: solid phase extraction; ACN: Acetonitrile; M/C/W: Methanol/Chloroform/Water : 4V/5V/1V

1. Antimicrobial screening

Here 109 fungal strains were screened for antimicrobial activities on different microbial targets (bacteria, and fungi). Active fungal strains and their spectrum of activity are summarized in Figure 2 and activities are shown in Figures 3 and 4

Figure 2 : Antimicrobial activity of deep sea fungi. The size of the circle is proportional to the diameter of the inhibition zone

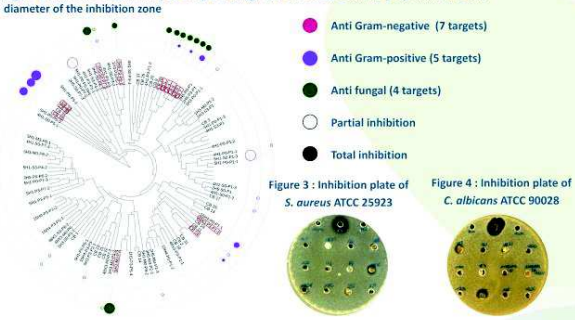


Figure 3 : Inhibition plate of *S. aureus* ATCC 25923

Figure 4 : Inhibition plate of *C. albicans* ATCC 90028

➢ 28 filamentous fungi revealed antimicrobial activities (32% of the entire collection)

2. Growth kinetics and antimicrobial activity

The most active strains (framed in red in the tree in Figure 2) were selected for optimization. Strains were cultivated in 2 different media : PDB 0.2% and PDA. The growth and the antimicrobial activities were followed during 21 days. An example is shown in figure 5 and 6

Figure 5 : Growth and activity kinetics of the *Penicillium bialowiezense* CB_10 strain.
Green circle represent the diameter (mm) of the inhibition zone

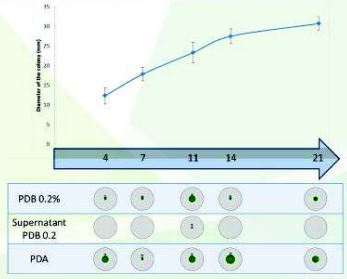
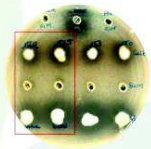


Figure 6 : Inhibition plate of *F. solani* CBS 181.29



Red frame: activity of strain CB_10

➢ The most bioactive samples were obtained from PDA medium

3. Extraction of bioactive compounds

After 14 days of cultivation, bioactive compounds were extracted and the activity of each fraction was assessed on the most sensitive microbial target (Table 1 and Figure 7)

Table 1 : Activity in the fraction after extraction

		SPE crude extract		crude extract of thalli	
Strain	Target	0/10	10/90	Aqueous	Organic
48X3-P3-P1-2	*E. faecalis*	4	3 (R)	0	2
5H3-M3-P2	*A. flavus*	0	0	0	0
3H5-P3-P6-1	*A. flavus*	ND	ND	0	0
2H5-S0-P7-2	*A. flavus*	0	0	0	0
CB4	*F. solani*	0	4 (R)	0	3 (R)
CB5	*C. albicans*	0	0	0	4
CB6	*F. solani*	0	0	0	0
CB7	*F. solani* *S. equinus*	0	5 (R)	0	3 (R)
CB8	*C. albicans*	0	0	3	4
CB10	*F. solani*	0	5 (R)	0	2 (R)
CB16	*E. faecalis*	0	0	0	3
CB24	*S. aureus*	0	0	0	0
CB33	*S. equinus*	0	3	0	0
CB36	*E. faecalis*	ND	ND	0	2

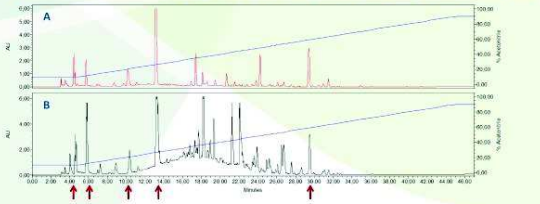
Figure 7: Inhibition plate of *E. faecalis* CIP A 186

➢ The activity seems due to an organic compound as organic fractions are active

4. RP-HPLC analysis

The active fractions were then analyzed with RP-HPLC. An example of metabolic profile is presented in Figure 8

Figure 8 : Metabolic profiles of strain CB_10 *P. bialowiezense*.
A: fraction 10-90 of supernatant; B: organic fraction of thalli ; Arrows: peak with the same retention time



➢ Metabolic profiles of the CB_10 strain showed a great diversity of compounds
➢ Surpernatant and biomass may contain the same main metabolites (red arrows) Figure 8
➢ These metabolic fingerprints are now investigated for original bioactive compounds

Antimicrobial screening revealed 28 deep-sea fungal strains (32% of the collection) with antimicrobial activities against at least one of the targeted microorganisms. Antimicrobial activity was mainly directed against Gram-positive bacteria and fungi. The most active strains were selected to optimize the production of bioactive compounds. The experiments performed on the same media containing different concentrations of agar showed that the presence of agar enhanced the production of antimicrobial compounds. The extraction of the culture and their analysis on RP-HPLC showed a great metabolic diversity. We are now developing a dereplication strategy to identify putative original bioactive compounds.

Contacts
marion.navarri@univ-brest.fr
Yannick.fleury@univ-brest.fr
gaetan.burgaud@univ-brest.fr

[1] Garcia Robles *et al*. (2015). New chemotherapeutic agents against common infections: clinical studies on new anti-infective agents. Frontiers in Anti-infective drug discovery, 4, 210-229
[2] Rateb EM and Ebel R (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep* 28:290-334
[3] Rédou V et *al*. (2015). Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2571-2582
[4] http://www.univ-brest.fr/souchotheque/

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 311975 (project Macumba). The author(s) alone shall bear the responsibility for any use which may be made of the information contained therein. The European Union cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

Designed by AquaTT

-This research was supported by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement No. 311975 (project Macumba)-

MaCuMBA

www.macumbaproject.eu
www.facebook.com/MaCuMBAProject

Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving their Biotechnological Applications

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF DEEP SEA FUNGI

NAVARRI M, JEGOU C , MESLET-CLADIÈRE L, BRILLET B, BARBIER G, BURGAUD G, FLEURY Y

Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA3882), Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Plouzané, France

According to the World Health Organization, antimicrobial resistance is an increasing serious threat jeopardizing global public health. Untapped microorganisms can be viewed as a chemical reservoir to counteract this threat. Marine fungi have been shown to produce many bioactive metabolites such as antibiotic molecules [1]. Thus, deep-sea fungi appear as a treasure trove for novel biomolecules..

1. A collection of 183 deep-sea fungal isolates was previously isolated from a deep-sea sediment core collected in the Canterbury basin, off the coast of New-Zealand [2]. All strains are preserved in the UBO Culture Collection [3].

2. An antimicrobial screening was performed using a plug diffusion method on 15 microbial targets.

Here 109 fungal strains isolated from deep-sea sediment were screened for antimicrobial activities on different microbial targets (bacteria, and fungi). Active fungal strains and their spectrum of activity are summarized in table 1.

Table 1 : Antimicrobial spectrum of deep sea fungi

Strain ID	Genus	Species	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*V. parahaemolyticus* 01/252	*E. faecalis* CIP A 186	*L. garvieae* ATCC 43921	*L. monocytogenes* SOR 100	*S. aureus* ATCC 25923	*S. equinus* NRRL B-4268	*A. flavus* CBS 100927 T	*F. solani* CBS 181.29	*C. albicans* ATCC 90028
1H3-P0-P1(1)	*Fusarium*	*oxysporum*	-	-	-	-	-	-	+ (R)	-	-	-	-
1H3-S0-P1(1)	*Aspergillus*	*terreus*	+ (R)	-	-	-	-	-	+ (R)	-	-	-	-
1H3-M3-P1(2)	*Paecilomyces*	sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+ (R)	+ (R)	+ (R)
2H5-S0-P1	*Fusarium*	*oxysporum*	-	-	-	-	-	-	+ (R)	-	-	-	-
4H1-P0-P1(1)	*Fusarium*	*oxysporum*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ (R)
5H1-S0-P1(3)	*Fusarium*	*oxysporum*	-	++++ (R)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48X3-P3-P1(2)	***Aspergillus***	***fumigatus***	-	-	-	++	-	-	+ (R)	-	-	-	-
2H5-M3-P2(3)	*Penicillium*	*chrysogenum*	-	-	-	-	-	-	+ (R)	-	-	-	-
5H3-M3-P2	***Sarocladium***	***sp.***	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-
4H1-P3-P3	*Fusarium*	*oxysporum*	-	-	-	-	-	-	+ (R)	-	+ (R)	-	-
5H1-P0-P5(1) bis	*Sistotrema*	*brinkmannii*	-	++++ (R)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3H5-P3-P6(1)	***Sarocladium***	***sp.***	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-
2H5-S0-P7-(2)	***Sarocladium***	***sp.***	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
5H1-M3-P8-(1)	*Acremonium*	sp.	-	+++ (R)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_4	***Penicillium***	***bialowiezense***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
CB_5	***Penicillium***	***bialowiezense***	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	++
CB_6	***Penicillium***	***bialowiezense***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
CB_7	***Penicillium***	***bialowiezense***	-	-	-	+ (R)	-	+	+	++	++ (R)	++	++
CB_8	***Penicillium***	***bialowiezense***	-	-	-	-	-	+ (R)	+	-	-	-	++
CB_9	*Penicillium*	*bialowiezense*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
CB_10	***Penicillium***	***bialowiezense***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
CB_11	*Penicillium*	*chrysogenum*	-	-	-	-	-	-	+ (R)	-	-	-	-
CB_16	***Penicillium***	***sp.***	-	-	-	++++	-	-	++	+++	-	-	-
CB_17	*Penicillium*	*chrysogenum*	-	-	-	-	-	-	+ (R)	-	-	-	-
CB_23	*Uncultured*	*Agaricomycetes*	-	-	+ (R)	-	-	-	-	-	-	-	-
CB_24	***Penicillium***	***chrysogenum***	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CB_33	***Eurotium***	***herbariorum***	-	-	-	-	-	-	-	++++	-	-	-
CB_36	***Oidiodendron***	***griseum***	-	-	-	++ (R)	+++	+++	++ (R)	+++	-	-	-

(R) : partial inhibition of microbial growth

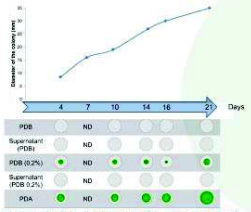
The number of (+) indicates the inhibition zone length (mm) around the fungal plugs

- 28 filamentous fungal strains revealed antimicrobial activities (32% of the established collection).
- The most active strains (highlighted in green) were selected for optimization.

Then, strains were cultivated in 3 different media : PDB, PDB 0.2% and PDA. The growth and the antimicrobial activities were followed during 21 days. An example is shown in figure 2.

- At day 21, activity seems to be more important, especially in media containing agar

Figure 2 : Growth and activity kinetics of the *Penicillium bialowiezense* CB_6 strain



Green circles represent the diameter of the inhibition zone

3. The most active strains were selected to optimize the production on different media with different concentrations of agar. Those cultures were extracted after 21 days following the flow chart described in figure 1.

Figure 1 : Flow chart for extraction of bioactive compounds from culture media

PDB (Potato Dextrose Broth) ; PDB 0.2% (PDB + 0.2% of agar) ; PDA (PDB + 1.7% of agar) ; M/C/W : Methanol/Chloroform/Water : 4V/5V/1V

After 21 days of cultivation, bioactive compounds were extracted and the activity of each fraction was assessed on the most sensitive microbial targets (Table 2).

- The activity seems due to an organic compound as active fractions are organic.
- The active fractions of all strains were then analyzed with RP-HPLC. An example of metabolic profile is presented in figure 3.

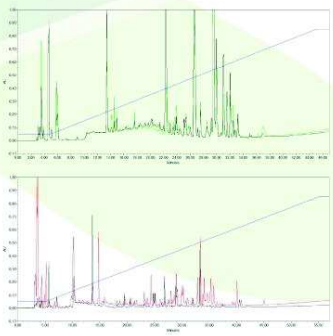
Table 2 : Activity in the fraction after extraction

Supernatant	Fractions	CB_4	CB_5	CB_6	CB_7	CB_10	CB_24
PDB	0-10%	-	-	-	-	-	-
	10-50%	+	+	+	+	+	
	50-90%	+	+	+	+	+	+
PDB 0.2%	0-10%	-	-	-			-
	10-50%	++	++	++	++	++	-
	50-90%	++	++	++	++	++	-

Pellet	Fractions	CB_4	CB_5	CB_6	CB_7	CB_10	CB_24
PDB 0%	Aqueous	-	-	-	-	-	-
	Organic	++	-	+	-	-	-
PDB 0.2%	Aqueous	-	-	-	-	-	-
	Organic	++	+	++	++	+	-

Colony	Fractions	CB_4	CB_5	CB_6	CB_7	CB_10	CB_24
PDA	Aqueous	ND	ND	-	ND	ND	+
	Organic	ND	ND	++	+++	+++	+++++

Figure 3 : RP-HPLC analysis of bioactive fractions resulting from supernatant (black : PDA 0.2%, green : PDB) and biomass (black : PDB 0.2%, red : PDA) extractions of the *Penicillium bialowiezense* CB_6 strain



- Metabolic profiles of the CB_6 strain showed a great diversity of compounds.
- Profiles from supernatant were similar contrary to the profile obtained from biomass
- These metabolic fingerprints are now investigated for original and bioactive compounds.

Antimicrobial screening revealed 28 deep-sea fungal strains (32% of the collection) exhibiting antimicrobial activities against at least one of the targeted microorganisms. Antimicrobial activity was mainly directed against Gram-positive bacteria and fungi. The most active strains were selected to optimize the production of bioactive compounds. The experiments performed on the same media containing different concentrations of agar showed that the presence of agar enhanced the production of antimicrobial compounds. The extraction of the culture and their analysis on RP-HPLC showed a great metabolic diversity. We are now developing a dereplication strategy to identify putative new bioactive compounds.

Contact
marion.navarri@univ-brest.fr / Yannick.fleury@univ-brest.fr / gaetan.burgaud@univ-brest.fr

[1] Rateb EM and Ebel R (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep* 28:290-334
[2] Rédou V et *al.* (2015). Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2571-2582
[3] http://www.univ-brest.fr/souchotheque/

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 311975. The sole responsibility for the content of this publication and the European Union cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

Designed by AquaTT

-This research was supported by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement No. 311975 (project Macumba)-

Deep-Sea Marine Fungi : An Untapped Resource of Biotechnological Potential

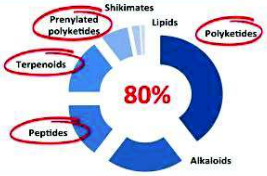
NAVARRI M, MESLET-CLADIÈRE L, BRILLET B, BARBIER G, FLEURY Y, & BURGAUD G

Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA3882), Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, Plouzané, France

INTRODUCTION

Between 2006 and mid-2010, 690 new chemical structures have been described from pelagic marine fungi [1]. If marine fungi from coastal waters have been intensively analyzed for their biotechnological applications, deep-sea fungi from deep-sea extreme environments appear as another untapped reservoir of biomolecules with great biotechnological potentials. Most of the bioactive compounds from marine fungi are polyketides, peptides or terpenoids (80% of the 690 chemical structures) biosynthesized by mega-synthases as PKS (*Polyketide Synthase*), NRPS (*Non Ribosomal Peptide Synthetase*), hybrids PKS-NRPS and TPS (*Terpen Synthase*)

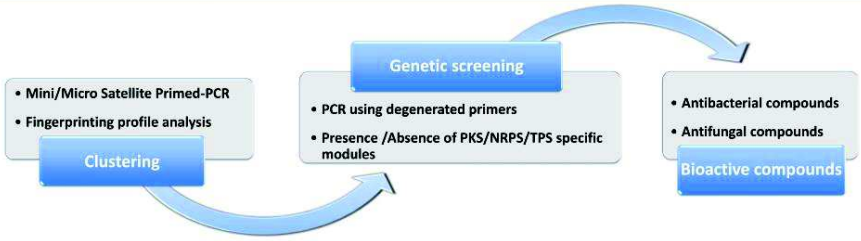
In this study, we have analyzed a collection of 184 deep-sea marine fungi from deep sediments as an untapped resource of biotechnological potential. To rationalize the search of bioactive compounds, we designed a pragmatic approach incorporating PKS/NRPS/TPS sequence analysis in the discovery process.



MATERIALS AND METHODS

184 fungal strains were previously isolated from a deep-sea sediment core collected in the Canterbury basin, off the coast of New Zealand [2]. All strains are preserved in the UBO Culture Collection.

The approach used is based on a 3-step workflow: (i) Dereplication, (ii) Molecular screening and (iii) Bioactivity assays



RESULTS

1. Genetic screening and Clustering

Bionumerics® was used to analyze MSP-PCR fingerprints, dendrograms were established based on DICE (etimate similarities) and UPGMA (clustering) methods in order to group fungal strains for the dereplication process:

- → 41 clusters of filamentous fungi
- → 12 clusters of yeasts

Using PKS/NRPS/TPS genetic screening, we assessed the presence of genes involved in secondary metabolite pathways:

- → 97.6% of fungal strains harbor at least one of these genes
- → 3.3% of fungal strains harbor all the targeted genes, all of them were filamentous fungi
- → Yeasts did not show any PKS/NRPS hybrids genes

Using such approach, filamentous fungal strains appear much more interesting compared to yeasts for biotechnological applications

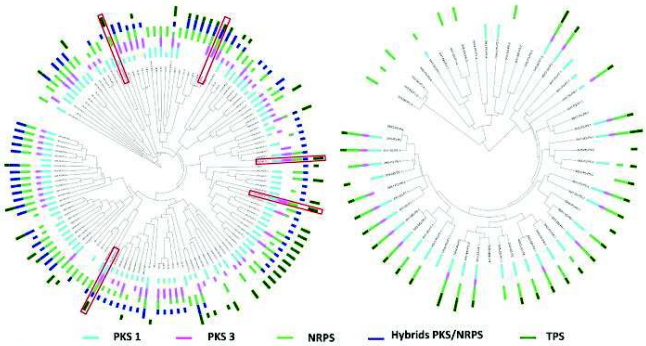


Figure 1 : Clustering of fungal strains and presence of PKS, NRPS, TPS genes (left, *filamentous fungi* and right, *yeasts*)

2. Bioactive compounds

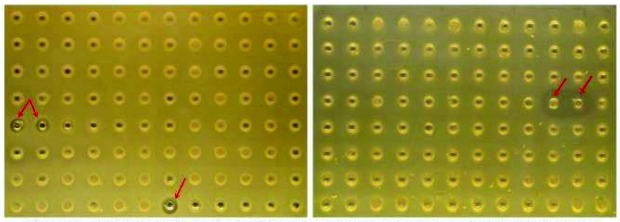


Figure 2 : Antimicrobial activities of fungal strain supernatants against *Staphylococcus aureus* (left) and *Escherichia coli* (right)

Tryptone Soy Agar medium was inoculated with the targeted bacterial strain. Supernatants (20µL) of 99 fungal strains were then dropped in each well and plate were incubated 24h at 37° C . Figure 2 shows inhibition zones (arrows) for *S.aureus* and *E. coli*. On 99 supernatants of fungal strains tested , 5 showed antibacterial activities (Table 1).

Those strains were one of the most interesting strains based on genetic screening analysis. Indeed, the 5 positive strains harboured more than 2 genes (Table 1) that could be involved in the biosynthesis of bioactive metabolites .

Table 1 : Spectra of activity (Presence (+) or Absence (-) of inhibition)

	Deep-sea fungal strain	CB_6	1H3-M0-P1-(1)	1H3-M3-P1-(2)	4H1-P0-P1-(2)	5H1-S3-P4-(3)
	Species	*Penicillium sp.*	*Fusarium sp*	*Paecilomyces sp*	*Paecilomyces sp.*	*Purpureocillium sp*
Targeted bacteria						
Bacillus megaterium ATCC 10778		+	+	-	+	+
Staphylococcus aureus ATCC 25923		+	-	-	-	-
Escherichia coli SBS 363		-	-	+	-	-
Salmonella enterica CIP 6086		-	-	-	-	-
Presence of PKS/NRPS/Hybrids/TPS		PKS 3 NRPS Hybrids TPS	PKS 3 Hybrids	All	PKS 1 PKS 3 NRPS TPS	PKS 1 NRPS TPS

CONCLUSION

Genetic analysis showed a great biotechnological potential of the deep-sea fungal collection established. Indeed, a first screening against few bacterial targets has already shown bioactivities against *S. aureus, E. coli* and *B. megaterium*. Those active fungal strains harboured genes involved in the biosynthesis of bioactive compounds. In the future, complementary analyses will be performed against fifteen targets such as other pathogenic bacteria, yeasts and filamentous fungi. Antimicrobials compounds will be then isolated and characterized. Optimization of their synthesis by deep-sea fungal strains will be processed using different culture conditions (temperature, salinity,...).

Contact
marion.navarri@univ-brest.fr / Yannick.fleury@univ-brest.fr / gaetan.burgaud@univ-brest.fr

[1] Rateb EM and Ebel R (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep* 28:290-334
[2] Ciobanu MC *et al.* (2014) Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. The ISME Journal 1-11

-This research was supported by the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreement No. 311975 (project Macumba)-

Orales

Deep-sea Fungi as an untapped reservoir of bioactive molecules

Marion NAVARRI, Camille Jégou, Laurence Meslet-Cladière, Benjamin Brillet, Georges Barbier, Gaëtan Burgaud, Yannick Fleury. Assemblée Générale finale du Projet MaCuMBA. Berlin, 27-30 Juin 2016

Résumé : The recent characterization of a plasmid-mediated colistin resistance has emphasized the critical concern to renew antibiotic arsenal. As natural and natural-derived drugs in pharmaceutical pipelines represent 71% of newly approved molecules (Newman & Cragg, 2012), marine habitats have received a special attention as untapped reservoirs of novel bioactive compounds (Blunt *et al.*, 2015b). As natural product chemolibraries from marine fungi are rapidly developing along with new reported structures (Rateb & Ebel, 2011), we can hypothesize that a close look at fungi from extreme environments, and especially deep subseafloor sediments, will support a dramatic increase of novel active biomolecules in a close future.

In the frame of the MaCuMBA European Project, almost 200 deep subseafloor fungal strains isolated from deep sediment samples collected in the Canterbury Basin (New Zealand, IODP Expedition 317) were screened for antimicrobial potential using both genetic and functional approaches. The genome mining using degenerated primers targeting PKS (Polyketide Synthase), NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase), hybrids (PKS-NRPS) and TPS (Terpene Synthase) was not discriminative enough since around 97% of deep-sea fungal strains harbor at least one of those genes (Rédou *et al.*, 2015). A functional screening using 16 microbial targets revealed the antimicrobial potential (mainly directed against Gram-positive target bacteria) of 33% of filamentous fungi cultivated on PDA (Navarri *et al*. 2016). The extraction and analyzes of antimicrobial compounds of the 14 most promising deep subseafloor fungal isolates demonstrated their amphipathic nature and the LC-MS analyses have illustrated their metabolic chemodiversity. The crude extract resulting from *Oidiodendron griseum* strain CB-36 (isolated at 765 meters below seafloor) exhibited an important antimicrobial activity interpreted by the presence of at least four antibacterial compounds. Dihydrosecofuscin was structurally elucidated using NMR and the three other compounds and their biological activities are under investigation.

Deep sea fungi: an untapped resource of biotechnological potential

Marion Navarri, Laurence Meslet-Cladière, Yannick Fleury, Gaëtan Burgaud, Georges Barbier. Assemblée Générale du Projet MaCuMBA. Cadiz, 22-25 Septembre 2014

Résumé : The marine environment, which covers 70% of the earth surface and contains the greatest diversity of life on Earth, remains a largely unexplored biome hosting a tremendous diversity of macro and microorganisms (*Bacteria*, *Archaea* and *Eukarya*). Between 2006 and mid-2010, 690 new structures have been described from marine fungi (Rateb & Ebel, 2010). If marine fungi from coastal waters have been intensively analyzed for their biotechnological applications, deep-sea fungi dwelling in deep-sea extreme ecosystems appear as another untapped reservoir of biomolecules with tremendous biotechnological potential.

In the frame of the MaCuMBA European Project (Marine Microorganisms: Cultivation Methods for Improving their Biotechnological Applications, FP7-KBBE n°311975), 200 deep-sea fungal strains have been isolated from deep sediment samples of the Canterbury Basin (New-Zealand). This collection of deep-sea fungal strains has been characterized (i) phylogenetically, using Mini/Micro-Satellite Primed-PCR and 18S, 28S rRNA and ITS sequencing and (ii) physiologically, using laser nephelometry to assess fungal growth at different temperatures and salinities.

As nearly 10% of genomes are devoted to secondary metabolism, genome mining to find natural product biosynthetic pathways can be seen as a new paradigm for natural product discovery. PCR targeting PKS (Polyketide Synthase), NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase), hybrids (PKS-NRPS) and TPS (Terpene Synthase) genes have been performed on the 200 fungal strains. 177 (around 97%) of deep-sea fungal strains harbor at least one of those genes revealing the biotechnological potential of this new collection. Finally, fungal strains are screened for their antimicrobial activities against 10 clinical pathogens (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter aerogenes* CIP 6086, *Klebsiella oxytoca* CIP 7932, *Salmonella enterica* CIP 8297, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia ruckeri* ATCC 29473, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* CIP A 186, *Listeria monocytogenes* SOR 100 and *Candida albicans* ATCC 2092). On 140 strains screened, 18% showing activities against *E. coli*, *S.aureus* and *E. faecalis*. The spectrum will be extended to filamentous fungi. Then interesting strains will be selected and their metabolites production will be studied. After that, interesting molecules will be isolated and identified.

ANNEXE

ANNEXE 1 : ANALYSE EN LC-HRMS DES EXTRAITS BRUTS

Les extraits bruts à 1mg/mL ont été analysés en LC/HRMS, (Liquid Chromatographie-Quadrupôle-Time Of Flight) fournit par Shimadzu. L'appareil était équipé en phase inverse avec une colonne C18 (Phenomenex, kinetex-2.6µm-100Å-100x2.10mm) à 40°C. Les échantillons ont été élués (10µL injectés) selon un gradient de 15% d'acétonitrile + 0.1% d'acide formique (ACN+AF) (85% d'eau + 0.1% d'acide formique) à 100% d'ACN+AF en 23min, avec un débit de 0.3mL/min. Les analyses ont été effectuées en ionisation positive (ESI+) et négative (ESI-). Les masses des produits ont été ciblées entre 100 et 1000 Da.

La méthode de traitement des données a été automatisée. Le script informatique a été élaboré pour :

- détecter les molécules dans un échantillon

- prédire leurs formules brutes selon les 7 règles d'or sur les molécules naturelles établies par Kind et Fiehn (2007)

- rechercher les molécules détectées dans les bases de données (Dictionnary of natural product, Dictionnary of marine natural product, lipidmaps, KNaPSaCK, KEGG, Universal Natural Products Database and AntiBAse

- évaluer leur degré de probabilité en fonction du spectre UV et des données phylogénétiques des souches productrices.

Métabolites secondaires de champignons de sédiments marins profonds: Criblages génétique et fonctionnel et Caractérisation structurale de molécules antimicrobiennes

La propagation des micro-organismes résistants aux antibiotiques menace le système mondial de santé publique. Pour lutter contre ce phénomène, le renouvellement des molécules utilisées en antibiothérapie est devenu une priorité mondiale. Les antibiotiques étant principalement d'origine microbienne, l'étude des micro-organismes et de leurs métabolites s'est donc renforcée et s'oriente vers des écosystèmes peu explorés comme les biotopes marins.

Nous avons exploré les activités antimicrobiennes d'une collection de 183 champignons isolés de sédiments marins profonds et collectés entre 4 et 1884 mètres sous le plancher océanique. Le potentiel de production de métabolites de cette collection a été révélé par un criblage génétique ciblant les PolyKetide synthase (PKS), les Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NPRS), les TerPene Synthase (TPS) et les hybrides PKS-NRPS. Après avoir regroupé les isolats en fonction de leur profil MSP PCR, 110 ont été sélectionnés pour un criblage fonctionnel, montrant une forte proportion de champignons filamenteux antimicrobiens (32%).

Après extraction et fractionnement, les composés bioactifs de 3 souches ont été caractérisés aux niveaux structural et fonctionnel. Ainsi, O*. griseum* UBOCC-A-114129 produit la fuscine, la dihydrofuscine, la secofuscine et la dihydrosecofuscine, *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097 produit l'acide mycophénolique et *Penicillium* sp. produit UBOCC-A-114109 la rugulosine.

Parallèlement, des analyses en LC-HRMS, réalisées sur des extraits fongiques, ont révélé un grand nombre de métabolites non décrits dans les bases de données. Les champignons des sédiments marins constituent donc un réservoir de structures originales à explorer.

Mots clés : champignons de sédiments marins profonds, métabolites secondaires, activités antimicrobiennes, PKS, NRPS.

Secondary metabolites from deep subseafloor fungi: genetic and functional screenings, and antimicrobial molecules characterization

The spreading of antimicrobial resistant microorganisms jeopardizes global health care system. To counteract this threat the renewal of antibiotic molecules is a global priority. Antibiotic compounds are mainly originated from microorganisms, so microorganisms and their secondary metabolites received an increasing interest. The search for new natural antimicrobial compounds from microorganisms gained untapped ecosystems as marine biosphere.

We investigated the antimicrobial properties of a fungal collection. The 183 fungal isolates were collected from deep subseafloor sediment and isolated between 4 and 1,884 meters below the seafloor. Secondary metabolites production potential was studied for all isolates in the collection by screening genes coding PolyKetide Synthase (PKS), Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS), TerPene Synthase (TPS) and hybrid PKS-NRPS. After isolates dereplication according to their MSP-PCR fingerprinting, an antimicrobial screening was performed for 110 isolates, highlighting a high proportion of filamentous fungi with antimicrobial properties (32%).

After extraction and bio-guided fractionation bioactive metabolites isolated from 3 strains, were characterized in a structural and functional manner: O*. griseum* UBOCC-A-114129 produced fuscin, dihydrofuscin, secofuscin and dihydrosecofuscine, *P. bialowiezense* UBOCC-A-114097 synthetized mycophenolic acid and *Penicillium* sp. UBOCC-A-114109 produced rugulosin.

In the meantime, LC-HRMS analysis, performed on fungal extracts, showed a great proportion of metabolites not detected in interrogated databases. So, deep subseafloor fungi, represent an untapped reservoir of original structures to explore.

Key words: Deep subseafloor fungi, secondary metabolite, antimicrobial activities, PKS, NRPS