



Obtention de composés azotés bioactifs d'origine naturelle : étude de biotransformation par des bactéries associées aux lichens

Alba Noël

► To cite this version:

Alba Noël. Obtention de composés azotés bioactifs d'origine naturelle : étude de biotransformation par des bactéries associées aux lichens. Sciences pharmaceutiques. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1S127 . tel-01809512

HAL Id: tel-01809512

<https://theses.hal.science/tel-01809512>

Submitted on 6 Jun 2018

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.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Chimie

Ecole doctorale 3M
Alba NOËL

Préparée à l'unité de recherche UMR-CNRS 6226-CORINT
Chimie Organique et Interfaces
(UFR Sciences et Propriété de la Matière)

**Obtention de
composés azotés
bioactifs d'origine
naturelle. Etude de
biotransformation par
des bactéries
associées aux lichens.**

Thèse rapportée par :

Valérie COLLOT

Professeure - Université de Caen / *rapporteur*

Didier BUISSON

Directeur de recherche - MNHN / *rapporteur*

**et soutenue à Rennes
le 1^{er} décembre 2017**

devant le jury composé de :

Valérie COLLOT

Professeure – Université de Caen / *rapporteur*

Didier BUISSON

Directeur de recherche – MNHN / *rapporteur*

Catherine ROULLIER

Maître de conférences – Université de Nantes /
examinatrice

Lucia MUGGIA

Assistant professor – Université de Trieste /
examinatrice

Pierre WAFFO-TEGUO

Professeur – Université de Bordeaux / *examineur*

Sophie TOMASI

Professeure – Université Rennes 1 / *directrice de thèse*

Jean-Pierre HURVOIS

Professeur – Université Rennes 1 / *co-directeur de
thèse*

Remerciements

Avant de tirer le rideau sur ces trois belles années rennaises il est important pour moi de remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ces travaux.

Pour commencer je remercie grandement Pr. Valérie Collot et Dr Didier Buisson pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Ainsi que tous les membres du jury qui me font l'honneur de lire et de juger ce travail : Pr Pierre Waffo-Teguo, Dr Catherine Roullier, Dr Lucia Muggia, Pr Sophie Tomasi et Pr Jean-Pierre Hurvois.

J'adresse également tous mes remerciements au Pr Joël Boustie pour m'avoir proposé ce sujet de thèse pluri-disciplinaire au sein de son laboratoire et pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et pour vos conseils avisés et votre soutien dans mes démarches pour la suite.

Je souhaite ensuite exprimer toute ma gratitude envers ma directrice de thèse Sophie Tomasi, qui m'a aiguillée pendant ces trois ans. Je te remercie sincèrement d'avoir accepté que je travaille sur ce sujet avec toi, de m'avoir permis d'explorer toutes ces facettes de la pharmacognosie et de la biotechnologie et de m'avoir laissée prendre mes initiatives dans ces travaux. Je te remercie également pour m'avoir formée à l'enseignement et à la recherche par le biais des nombreux congrès nationaux et internationaux, par le biais des enseignements de pharmacognosie que tu m'as laissée faire ainsi que par tes propositions d'encadrement de stagiaires. Tout cela m'a permis de voir réellement « l'autre côté » de la fac et des enseignants et m'a conforté dans mes choix d'orientation. Enfin, sur un plan plus personnel, merci de ta gentillesse, de ta disponibilité et de ton soutien lors des moments plus compliqués de stress et de doutes.

Ma gratitude va également à mon co-directeur de thèse, Jean-Pierre Hurvois, qui a également permis la réalisation de cette thèse. Je te remercie pour la formation rigoureuse en synthèse que tu m'as apportée, d'autant plus que ça n'était pas évident pour une « non-chimiste »... Merci de m'avoir transmis une partie de ce savoir-faire que je n'avais regardé que de loin jusqu'ici et qui me permet maintenant de voir la chimie organique d'un autre œil. Enfin, merci d'avoir égayé ces sessions chimie avec tes histoires folkloriques de vélo, voyages et autres déboires technologiques...

Ces travaux n'auraient pas été envisageables sans Aurélie Sauvager, Isabelle Rouaud, Maryline Piron et Solenn Ferron et leurs doigts de fées. Je n'ai pas de mots suffisants pour vous dire combien votre aide m'a été précieuse au cours de ces trois années, de la formation sur les divers appareils à la vie au laboratoire. Aurélie, merci pour ton aide sur les appareils analytiques et les nombreuses fois où tu as sauvé mes analyses ainsi que pour tout ce que tu fais pour la vie au labo. Isabelle, merci pour tous les échantillons (plus d'une centaine !!!) que tu as testé pour cette thèse et pour ton soutien infailible dans les manip de bio. Solenn, merci pour toutes ces analyses RMN parfois faites en urgence et ton aide sur la CPC. Maryline, merci pour ton efficacité, ton arrivée dans l'équipe a été une bouffée d'air frais !

Ce travail n'aurait également pas été le même sans l'intervention de mes stagiaires au cours de ces trois ans. Merci à Corine Diaite pour ton travail remarquable sur l'optimisation des méthodes de synthèse. Gwendoline Van Soen pour ton travail de titan sur le plan d'expérience, merci pour ton efficacité et tout ce que tu as pu nous apporter en bactériologie. Alexandre Garnier, merci pour ton travail méticuleux sur les essais de bioconversion. Enfin, merci à Mélanie Clément pour ton travail sur les effets de l'acide usnique sur les bactéries.

Je n'oublie bien évidemment pas tous les autres membres du 4^{ème} étage. Merci à Françoise pour m'avoir formée et conseillée pour les enseignements, ainsi que pour les identifications de champignon et ton sourire toujours au rendez-vous. Merci à vous trois Anne-Cécile, Béatrice et Marylène pour vos précieux conseils professionnels ou personnels ainsi que pour votre bonne humeur et votre soutien. Merci aussi à Maryse grâce à qui j'ai pu me déplacer sereinement en congrès et formations tout au long de cette thèse et ceci malgré les méandres administratifs (et informatiques !!) auxquels on a pu se confronter ! Et merci à vous toutes de faire de cette équipe un lieu chaleureux, plein de bonne humeur et merci pour tous les conseils cuisine, jardinage, etc.

Merci à tous ceux avec qui j'ai pu partager le bureau pendant ces trois ans car sans eux rien n'aurait été pareil. Heureusement que je n'étais pas seule pour affronter les diverses péripéties d'une thèse... Et surtout un grand merci à :

- Le, pour ta gentillesse, ton sourire et tes gentilles attentions.
- Nathalie, pour m'avoir montré le chemin dans la jungle du labo au début de ma thèse, et surtout au milieu des bactéries, mais aussi pour ton aide et ton soutien, merci d'avoir répondu à mes 50 000 questions !
- Mathilde, lors de ton séjour ici tu as contribué à égayer mes journées et à les rendre plus musicales, et tant pis si maintenant plus personne ne le supporte mais je continue de chanter « Juste une dernière danse » et autre Goldman...
- Alice pour m'avoir supporté tout ce temps, pour la vie du bureau (et du labo), la piscine, les verres pour arroser une victoire et ceux pour remonter le moral, les oreilles pour m'écouter me plaindre, les conseils avisés, le soutien infailible et surtout lors de la rédaction !

Ainsi que tous ceux qui ont partagé ce bureau à un moment ou un autre pendant ces trois ans : Pierre, Grichka, Alexandre, Damien...

Merci également à toutes les personnes de chimie pour votre accueil lors de mes essais de chimiste en herbe, pour votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur : Gilles Argouarch, Marielle Blot, Christelle Bouvry, Bruna Casanova, Jean-Charles Corbel, Jean-François Cupif, Michèle David, Vianney Durel, Nicolas Gouault, Benjamin Guieu, Mickaël Jean, Claudia Lalli, Myriam Le Roch, Jacques Renault, Olivier Tasseau, Cédric Tresse, Philippe Uriac et Pierre Van de Weghe.

Merci à tous les autres membres de l'équipe ex-PNSCM, Marie-Laurence Abasq-Paofai, Patricia Courtel, David Delmail, Morgane Lambert et Erell Le Deun.

Je souhaite également remercier les structures avec lesquelles j'ai pu travailler au cours de ces trois ans pour réaliser cette thèse :

- Le CRMPO à Rennes et plus particulièrement Philippe Jéhan pour ses analyses pointues et ses conseils avisés en spectrométrie de masse
- La plateforme PRISM à Rennes, où la plupart de mes analyses RMN ont été effectuées, merci plus particulièrement à Arnaud Bondon pour ses conseils.
- L'équipe NUMECAN (microbiologie) de Rennes et plus particulièrement Catherine LeLann et Nolwenn Oliviero pour m'avoir permis d'utiliser leurs autoclaves.
- La plateforme P2M2 de l'INRA au Rheu et plus particulièrement Sylvain Guyot et Hélène Sotin pour les analyses LC/MS/MS et leur accueil, ainsi que Sophie Guilois pour ses précieux conseils en CPC.
- Le laboratoire BioCIS de l'université de Chatenay-Malabry et plus particulièrement Alexandre Maciuk et Pedro Vásquez qui m'ont chaleureusement accueillie pour la réalisation d'analyses LC/MS/MS haute résolution, un grand merci pour votre aide et vos conseils.

Je remercie également Eric Hitti, de l'équipe LTSI, pour son aide précieuse dans l'élaboration des plans d'expérience et les analyses statistiques.

Je souhaite remercier également les laboratoires dans lesquels j'ai fait mon chemin et qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici, à commencer par l'équipe de pharmacognosie de l'Université de Nantes, Jean-François Biard, Olivier Grovel, Karina Petit et Catherine Roullier qui m'ont transmis leur intérêt pour cette matière et qui m'ont laissés faire mes premiers pas dans leur labo. Merci également à Ronald Quinn et Tanja Grkovic du laboratoire Eskitis à Brisbane pour cette magnifique opportunité qu'ils m'ont offert lorsqu'ils m'ont accepté en stage, merci pour cette expérience inoubliable tant personnelle que professionnelle. Enfin, merci à Marc Litaudon et Nina Corlay pour ce formidable stage de Master 2 qui m'a tant apporté !

Enfin, je souhaite vous remercier vous tous qui m'avez accompagnée pendant ces trois années, la DT and girls, les filles de la fac, Mélisande, et j'en oublie sûrement. Merci d'avoir été présents pendant tout ce temps et de m'avoir écoutée me plaindre de cette thèse, de m'avoir soutenue et remotivée quand il fallait !

Je remercie également ma famille, ma mère, mon frère, ma sœur pour leur soutien et pour avoir supporté mes états d'âme surtout lors de la rédaction... Et merci à Margaux pour sa lumière, son rire et j'espère maintenant pouvoir être plus disponible pour toi !

Je remercie également François avec qui je partage ma vie et donc les aléas de la thèse... Merci pour ton soutien inébranlable tout au long de cette aventure, pour ta présence quotidienne et ton amour. Je ne serais probablement pas arrivée jusqu'ici sans toi (et c'est surtout grâce à ta relecture de dernière minute !!). Toutes ces années ne sont qu'un début, le meilleur reste encore à venir.

REMERCIEMENTS	II
LISTE DES FIGURES :	XI
LISTE DES TABLEAUX :	XXI
LISTE DES ANNEXES :	XXIV
INTRODUCTION GENERALE	2
ACTE I : OBTENTION DE COMPOSES AZOTES A PARTIR DE BACTERIES ASSOCIEES AUX LICHENS	4
SCENE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	5
A. LES BACTERIES ASSOCIEES AUX LICHENS	6
1. Le point de départ : les lichens	6
a. La distribution des rôles entre les principaux partenaires symbiotiques	6
b. Le décor : le thalle lichénique	8
c. La reproduction	9
2. Les personnages principaux : les micro-organismes isolés	11
a. Qui sont-elles ?	11
b. Mise en scène bactéries-lichens	13
c. Identification par approches dépendantes ou indépendantes de la culture	15
d. Relation bactéries-lichens	15
B. CARACTERISATION DU PERSONNAGE : ACTINOBACTERIES	18
1. Description taxonomique, morphologique et écologique	18
2. Production de métabolites d'intérêt	19
a. Aperçu de la diversité chimique des Actinobactéries	19
b. Métabolites cytotoxiques	22
3. Rôle en biotechnologie	36
4. Particularité des Actinobactéries associées aux lichens	37
5. Focus sur le genre <i>Nocardia</i>	40
a. Description taxonomique, morphologique et écologique	40
b. Composés isolés à partir de culture de <i>Nocardia</i>	40
C. CONCLUSION	43
SCENE 2 : OPTIMISATION DE CULTURE DE SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DE LICHEN	44
A. INTRIGUE ET EXPOSITION DE L'ETUDE	45
B. CARACTERISATION DU PERSONNAGE PRINCIPAL, <i>NOCARDIA</i> SP.	47
C. SELECTION DU MILIEU DE CULTURE ET DE LA DUREE DE CULTURE	49
1. Essais préliminaires	49
2. Comparaison des profils chimiques	51
3. Confirmation des résultats à grande échelle	52
D. OPTIMISATION DE LA CULTURE DE DP94 EN BIOREACTEUR PAR PLAN D'EXPERIENCE	55
1. Culture en bioréacteur de DP94	55
2. Réalisation du plan d'expérience	57
a. En erlenmeyer	57
b. En bioréacteur	58

E. CONCLUSION	62
SCENE 3 : ETUDE DE LA COMMUNICATION ENTRE BACTERIES DE TYPE <i>NOCARDIA</i> SP. PAR L'ISOLEMENT DES COMPOSES PRODUITS	63
A. ETUDE DE L'EXTRAIT DE RESINE	64
1. Fraction 6	64
2. Fraction 7	65
3. Fraction 8	65
4. Fraction 9	66
5. Fraction 14	66
6. Fraction 17	68
7. Fraction 18	68
8. Fraction 19	69
9. Fraction 21	69
B. ETUDE DE L'EXTRAIT SURNAGEANT	70
1. Isolement des composés 13 et 14	70
2. Elucidation structurale des composés 13 et 14	71
3. Synthèse des composés 13 et 14	73
C. AUTRES COMPOSES ISOLÉS	75
1. A partir de la culture en erlenmeyer à grande échelle dans le milieu TY	75
2. A partir d'une culture du plan d'expérience	76
D. ACTIVITES DES PRODUITS ISOLÉS	77
1. Evaluation de l'activité biologique des composés nouveaux	77
2. Evaluation de l'activité biologique des composés connus	77
E. VARIATION DE LA COMMUNICATION SUIVANT LES CONDITIONS DE CULTURE	80
F. CONCLUSION	83
SCENE 4 : CIBLAGE DES COMPOSES BIOACTIFS	84
A. ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR RESEAUX MOLECULAIRES	85
B. ANALYSE PAR PLS-DA	89
C. CONCLUSION	93
SCENE 5 : FRACTIONNEMENT BIOGUIDE PAR CHROMATOGRAPHIE PAR PARTAGE CENTRIFUGE	94
A. CHROMATOGRAPHIE PAR PARTAGE CENTRIFUGE (CPC)	95
SCENE 6 : MATERIELS ET METHODES	98
A. PROCEDURES GENERALES	99
1. Solvants et réactifs	99
2. Méthodes séparatives	99
a. Chromatographie de type Flash	99
b. HPLC-semi préparative	100
3. Méthodes analytiques	100
a. HPLC-UV/MS	100
b. HPLC-MS/MS	101
c. HRMS (High Resolution Mass Spectrometry)	101
d. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	102
e. Pouvoir rotatoire	102
f. Tests biologiques	102
B. OPTIMISATION DE CULTURE DE SOUCHES BACTERIENNES	103
1. Souche bactérienne	103
2. Milieux de culture	103
3. Préparation des pré-cultures et ensemencement	103

4. Suivi des cultures	104
5. Extraction des milieux	104
C. ISOLEMENT DE COMPOSES ISSUS DE CULTURE BACTERIENNE	105
1. Séparation et purification des composés	105
2. Synthèse des dicétopipérazines	105
a. Synthèse de la cyclo (L-Tyr-L-Tpn)	105
b. Synthèse des dicétopipérazines bromées (13 et 14)	108
D. CIBLAGE DES COMPOSES ACTIFS	112
1. Obtention des données pour réseaux moléculaires	112
2. Traitement des données par MZmine et analyse statistique	112
E. FRACTIONNEMENT BIOGUIDE PAR CPC	112
1. Obtention de l'extrait	112
2. Bioguidage	112
3. Fractionnement par CPC	113
4. Fractionnement de la fraction CPC eau	113
F. DESCRIPTION DES COMPOSES ISOLES A PARTIR DES CULTURES DE LA SOUCHE DP94	114
1. Indole-3-carboxaldéhyde (1)	114
2. Cyclo (L-Val-L-Pro) (4)	115
3. Cyclo (L-Tyr-D-Pro) (7)	116
4. Cyclo (L-Ala-L-Phe) (8)	117
5. Cyclo (L-Tyr-L-Tpn) (9)	118
6. 1-(5-Deoxy-β-D-erythro-pent-4-enofuranosyl) (10)	119
7. Adénosine (11)	120
8. Cyclo (L-OMet-L-Pro) (12)	121
9. Cyclo (L-Br-Tyr-D-Pro) (13)	122
10. Cyclo (L-Br-Tyr-L-Pro) (14)	123
11. Cyclo (L-Leu-L-Pro) (20)	124
12. Cyclo (L-Tyr-L-Pro) (21)	125
13. Adénine (22)	126
14. Uracile (24)	127

ACTE II : ETUDE DE LA RELATION LICHEN-BACTERIE **128**

SCENE 1 : ETAT DE L'ART	129
A. LA BACTERIE AU SEIN D'UN ECOSYSTEME COMPLEXE	130
1. Les types d'interactions	130
a. Les interactions conflictuelles	130
b. Les interactions bénéfiques	133
2. Les échanges entre les personnages	135
a. Echange de nutriments	135
b. Transfert d'informations génétiques	136
c. Communication chimique	138
B. UN MODE DE DIALOGUE PARTICULIER : LA BIOTRANSFORMATION BACTERIENNE	142
1. Qu'est-ce que la biotransformation ?	142
2. Les différents types de biotransformation	142
a. Les réactions enzymatiques mises en jeu	142
b. Biotransformation des métabolites primaires	145

c. Biotransformation des métabolites secondaires	147
C. LES PERSONNAGES MIS EN SCENE	151
1. Biotransformation chez les α -protéobactéries	151
a. Présentation générale	151
b. Biotransformation chez les genres <i>Chelativorans</i> et <i>Mycoplana</i>	153
2. Biotransformation chez les Firmicutes	154
a. Présentation générale	154
b. Utilisation du genre <i>Bacillus</i> en biotransformation	156
3. Biotransformation chez des Actinobactéries	157
a. Présentation générale	157
b. Biotransformation chez le genre <i>Nocardia</i>	158
D. CONCLUSION	163
SCENE 2 : ETUDE DE LA COMMUNICATION ENTRE BACTERIES ET LICHENS PAR LE BIAIS DE LA BIOTRANSFORMATION DE COMPOSES LICHENIQUES	164
A. INTRIGUE ET EXPOSITION DE L'ETUDE	165
B. EFFET DE L'ACIDE USNIQUE SUR LA CROISSANCE BACTERIENNE ET LE METABOLISME	166
1. Personnages mis en scène	166
a. Souche DP94	166
b. Souche MOLA 1416	166
c. Souche MOLA1488	167
2. Effets de l'acide usnique	168
a. Effets sur la croissance bactérienne	168
b. Effet de l'acide usnique sur le métabolisme bactérien	171
C. LES SOUCHES BACTERIENNES ASSOCIEES AUX LICHENS UTILISENT-ELLES LES COMPOSES LICHENIQUES A LEURS FINS ?	176
1. Personnages mis en scène	176
a. α -Protéobactérie : MOLA1416	176
b. Firmicutes : <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	176
c. Actinobactérie : DP94	177
2. Essais de stabilité et sélection des composés candidats à la biotransformation	177
a. Composés lichéniques	177
b. Composés synthétiques	179
3. Résultats des essais de biotransformation	180
a. Biotransformation de l'acide (+)-usnique	181
b. Biotransformation du MOC	187
D. CONCLUSION	194
SCENE 3 : MATERIELS ET METHODES	195
A. SOUCHES ETUDIEES	196
1. DP94	196
2. MOLA1416	196
3. MOLA1488	196
4. <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	196
B. MILIEUX DE CULTURE UTILISES	197
C. PREPARATION DES PRE-CULTURES	197
D. MISE EN CULTURE DES ECHANTILLONS	197
1. Effets de l'acide usnique sur la croissance et le métabolisme	197
2. Etude de stabilité	198
3. Etude de bioconversion	198

E. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	199
1. Suivi des cultures	199
a. Mesure de la densité optique à 620 nm	199
b. Test au MTT	199
2. Extraction des échantillons	199
F. ANALYSE DES ECHANTILLONS	200

ACTE III : OBTENTION DE COMPOSES AZOTES BIOACTIFS PAR SYNTHESE **201**

SCENE 1 : INTRODUCTION **202**

A. LES ALCALOÏDES	203
B. STRUCTURES SELECTIONNEES POUR L'ETUDE	206
C. ETAT DE L'ART	208
1. Synthèse de la rac-bgugaine et de son énantiomère lévogyre	208
2. Synthèse de la rac-coniine	211
3. Synthèse de la rac-tylophorine	215
D. PLAN DE SYNTHESE	220

SCENE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION **223**

A. SYNTHESE DU <i>N,N</i> -DIBENZYLAMINOACETONITRILE 76	224
B. SYNTHESE DES DERIVES HALOGENES	225
1. Synthèse des iodures d'alkyles 78a-b par réaction d'Appel	225
2. Synthèse des iodures d'alkyles 78c et 78d par substitution nucléophile par le NaI	226
3. Synthèse du dérivé phénanthrène bromé 78e	226
a. Plan de synthèse à partir de l'ester cinnamique 80	226
b. Synthèse aldolique du composé 82	227
c. Synthèse du phénanthrène 84	230
d. Synthèse du dérivé bromé 78e	233
C. SYNTHESE DES α -AMINONITRILES 86A-E	234
D. SYNTHESE DU PRECURSEUR AZOTE DE LA RAC-BGUGAINE	235
E. SYNTHESE DU PRECURSEUR AZOTE DE LA RAC-CONIINE	236
F. ESSAI DE CYCLISATION EN PYRROLIDINE	237

CONCLUSION **237**

SCENE 3 : MATERIELS ET METHODES **238**

A. METHODES D'ANALYSE.	239
B. PROTOCOLES OPERATOIRES ET ANALYSE SPECTRALE DES COMPOSES OBTENUS.	239
1. Synthèse de l' α -aminonitrile 76 .	239
2. Synthèse des alcools 77a,b .	240
3. Synthèse des iodures d'alkyles 78a,b .	241
4. Synthèse des précurseurs de la tylophorine 81 , R^*,R^* - 82 , R^*,R^* - 83 , 80 , 84 , 85 et 78e	243
5. Protocole général de synthèse des α -amino nitriles 86a-f , protocole A.	248
6. Protocole général de synthèse des amines 88a-c protocole B.	253

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **260**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **261**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **265**

REFERENCES :	266
---------------------	------------

ANNEXES	281
----------------	------------

Liste des Figures :

Figure 1 : Schéma représentant les interactions entre les principaux partenaires de la symbiose lichénique (http://labopathe.free.fr/symbioses.html)	7
Figure 2 : Photographies des différents types de thalles lichéniques : a) <i>Caloplaca marina</i> , thalle crustacé ; b) <i>Normandina pulchella</i> , thalle squamuleux ; c) <i>Xanthoparmelia conspersa</i> , thalle foliacé ; d) <i>Evernia prunastri</i> , thalle fruticuleux ; e) <i>Collema auriforme</i> , thalle gélatineux ; f) <i>Chrysothrix candelaris</i> , thalle lépreux ; g) <i>Cladonia fimbriata</i> , thalle composite	8
Figure 3 : Schéma de la structure des thalles hétéromères ; c : cortex supérieur, g : gonidies, m : médulle, ch : cortex inférieur ou cordon axial (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]	9
Figure 4 : Schéma de la structure des thalles homéomères ; g : gonidies <i>Nostoc</i> , m : mucilage, h : hyphes (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13].....	9
Figure 5 : Schéma d'isidies	10
Figure 6 : Schéma de soralie	10
Figure 7 : Schéma de pycnide : A : coupe verticale de pycnide de <i>Parmelia physodes</i> (x 700), c : cortex du thalle ; m : médulle ; cph : filaments conidiophores tapissant la cavité de la pycnide, cn : conidies libérées par l'ostiole ; B : coupe verticale d'une conidie (x 120) (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]	10
Figure 8 : Schéma d'une apothécie de <i>Leptogium hildebrandii</i> , A : coupe verticale avec le thalle, hy : hymenium, r : rebord de l'apothécie, rh : rhizines, th : thalle ; B : agrandissement de l'encadré, rth : bord thallin, c : cortex, g : gonidies, rp : rebord propre, e : extrémité des paraphyses épaissies formant l'épithécium, a : asques, p : bases des paraphyses, hyp : hypothécium (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]	11
Figure 9 : Schéma d'un périthèce de <i>Thelopsis isiaca</i> , rth : enveloppe thalline, g : gonidies, c : cortex, pth : pyrénium, o : ostiole, hy : hyménium, a : asques contenant les spores, p : paraphyse (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]	11
Figure 10 : Schéma des différents types de membranes bactériennes (Banque d'images 123RF).....	12
Figure 11 : Schéma d'une bactérie (© LadyofHats, Wikipédia, DP)	12
Figure 12 : Classification des différents types bactériens en fonction de leur morphologie (Site Antibio-responsable.fr, classification des bactéries)	13
Figure 13 : (A–F), images CLSM, (A-B) bactéries révélées en rose par FISH . (A), Surface interne des podétions de <i>Cladonia arbuscula</i> , (B), hyphes de la surface externe de <i>Cladonia arbuscula</i> ; (C) nombreuses bactéries (en jaune) dans l'hypothallosphère du lichen crustacé <i>Lecidoma demissum</i> ; (D-E) Thalle de <i>Cladonia arbuscula</i> , Actinobactéries en rose au milieu de nombreuses autres bactéries en rouge, β -protéobactéries en jaune ; (F), <i>Cetraria islandica</i> , présence de nombreuses α -protéobactéries en jaune sur la surface externe du thalle et absence de bactéries au niveau de la	

couche algale (vert). a) Actinobactéries, b) bactéries, f) hyphes fongiques, m) matrice du sol, p) couche algale [21].....	14
Figure 14 : Structures de composés impliqués dans la régulation de la croissance produits par les bactéries associées aux lichens	16
Figure 15 : Schéma synthétique des différentes interactions au sein du réseau symbiotique lichénique [28].....	17
Figure 16 : Phylogénie des Bacteria basée sur 550 séquences du gène de l'ARNr 16S. La largeur des triangles est proportionnelle à la diversité du groupe correspondant. La barre d'échelle représente 10% de différence entre les groupes. [22]	18
Figure 17 : Morphologie des Actinobacteria observée au microscope électronique : a) Cocci de <i>Micrococcus luteus</i> ; b) Coccobacilles irréguliers de <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> ; c) Hyphes se fragmentant en coccobacilles de <i>Nocardia levis</i> ; d) Hyphes permanents de <i>Streptomyces griseus</i> ...	19
Figure 18 : Exemples de composés bioactifs isolés à partir de culture d'Actinobactéries : a) Macrotetrolides, b) Ivermectine, c) Polyoxine D, d) Kasugamycine, e) Validamycine A.	21
Figure 19 : Structures des avermectines [91]	37
Figure 20 : Structures de composés isolés d'Actinobactéries associées aux lichens : 1 : Acide actinoplanique B, 2 : Uncialamycine, 3 : JBIR-88, 4 : JBIR-89, 5 : Cladoniamide G, 6 : Coumabiocine A, 7 : Coumabiocine B	38
Figure 21 : Structures des composés isolés à partir de la souche MOLA1488	39
Figure 22 : Structures des composés isolés à partir de la souche MOLA1416	39
Figure 23 : Exemples de structures de composés cytotoxiques ou antitumoraux isolés à partir de culture de <i>Nocardia</i> [107].	43
Figure 24 : Schéma général de la partie 2 du chapitre 2 : Optimisation de culture d'une souche bactérienne associée à un lichen.....	46
Figure 25 : Site de récolte de <i>Collema auriforme</i>	47
Figure 26 : Photographies de DP94, a) observation microscopique après coloration de Gram, b) et c) observation des colonies sur milieu ISP2	48
Figure 27 : Courbe de croissance bactérienne	49
Figure 28 : Comparaison des profils chimiques obtenus à 220 nm pour chaque milieu en fonction de la durée de culture. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.	51
Figure 29 : Comparaison des profils chimiques à 220 nm obtenus pour chaque durée de culture en fonction du milieu. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100%	

H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.	52
Figure 30 : Schéma d'extraction des extraits bactériens	53
Figure 31 : Comparaison des profils chimiques des extraits de résine à 220 nm : a) et des extraits surnageants : b) des cultures en grande quantité en milieu TY (rouge) ou LB (bleu), les encarts noirs mettent en évidence les principales différences entre les profils. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.	54
Figure 32 : Suivi des paramètres de culture de DP94 dans le milieu TY, vitesse d'agitation (bleu) en rotation par minute (rpm), température (rouge) en °C, pourcentage d'oxygène dissous, OD (jaune) du milieu en % et pH (gris) en unités de pH, en fonction du temps. Les relevés de mesures sont réalisés toutes les minutes.	55
Figure 33 : Suivi de la culture bactérienne de DP94 en bioréacteur par mesure régulière de la densité optique à 620 nm (DO) représentée en log (DO) en fonction du temps	56
Figure 34 : Représentation graphique de la PLSDA	61
Figure 35 : Cercle des corrélations	61
Figure 36 : Isolement des composés 1 et 2 à partir de la fraction 6.....	64
Figure 37 : Isolement des composés 4 et 5 à partir de la fraction 7.....	65
Figure 38 : Isolement des composés 6 et 7 à partir de la fraction 9.....	66
Figure 39 : Isolement des composés 8 et 9 à partir de la fraction 14.....	67
Figure 40 : Isolement du composé 2 à partir de la fraction 17	68
Figure 41 : Isolement du composé 10 à partir de la fraction 18	69
Figure 42 : Isolement du composé 11 à partir de la fraction 19	69
Figure 43 : Composé 12	69
Figure 44 : Isolement des composés 13 et 14 à partir de l'extrait surnageant.....	70
Figure 45 : Profil chimique et procédé d'isolement des composés 13 et 14 . Tous les échantillons ont été analysés à 220 nm sur une colonne Prevail C ₁₈ avec un gradient de H ₂ O (A)/acetonitrile (B) (10 min 100% de A, 30 min de 0% de B à 100% de B, 10 min 100% de B).	71
Figure 46 : Corrélations HMBC et COSY du composé 14	73
Figure 47 : Isolement des composés 20 et 21 à partir de l'extrait de résine de la culture réalisée en erlenmeyer	75

Figure 48 : Isolement du composé 22 à partir de l'extrait de résine de l'expérience 1 du plan d'expérience	76
Figure 49 : Structures de la psicofuranine et son équivalent déshydraté l'angustmycine A	78
Figure 50 : Chromatogramme de l'extrait de résine à 220 nm. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.	80
Figure 51 : Chromatogrammes des extraits obtenus dans le milieu ISP2 lors de la sélection du milieu de culture à 220 nm. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.	81
Figure 52 : Chromatogrammes des extraits obtenus dans le milieu MB lors de la sélection du milieu de culture à 220 nm. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.	81
Figure 53 : Chromatogrammes des extraits obtenus dans le milieu LB lors de la sélection du milieu de culture à 220 nm. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm	82
Figure 54 : Clusters de composés probablement actifs obtenus par GNPS et visualisés par Cytoscape en mode positif.....	86
Figure 55 : Clusters de composés probablement actifs obtenus par GNPS et visualisés par Cytoscape en mode négatif	87
Figure 56 : Représentation graphique de la PLSDA	90
Figure 57 : Cercle des corrélations	90
Figure 58 : Représentation graphique de la PLSDA	91
Figure 59 : Cercle des corrélations	91
Figure 60 : Variables avec l'effet le plus important sur la séparation des échantillons suivant l'axe des X	92
Figure 61 : Variables avec l'effet le plus important sur la séparation des échantillons suivant l'axe des Y	92
Figure 62 : Structure du composé 24	97

Figure 63 : Gradient d'élution classique utilisé pour la séparation des fractions sur phase normale (SiO ₂) avec comme éluant du cyclohexane, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du méthanol	99
Figure 64 : Gradient d'élution classique utilisé pour la séparation des fractions sur phase inverse (silice greffée en C ₁₈) avec comme éluant de l'eau et de l'acétonitrile	100
Figure 65 : Gradient d'élution analytique classique	101
Figure 66 : Gradient d'élution utilisé pour le fractionnement de la fraction CPC eau	113
Figure 67 : Interactions entre <i>Agromyces ramosus</i> ATCC 25173 et <i>Azotobacter vinelandii</i> . A) Extension des hyphes de <i>A. ramosus</i> vers <i>A. vinelandii</i> à 29 h, B) Cellules de <i>A. vinelandii</i> recouverts par le mycelium de <i>A. ramosus</i> à 53 h, C) Mycelium fragmenté de <i>A. ramosus</i> à 161 h, il ne reste que quelques cellules de <i>A. vinelandii</i> [162].....	131
Figure 68 : A) <i>Micavibrio</i> sp (en jaune) attachée à sa proie : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (en violet) (https://blogs.scientificamerican.com/lab-rat/living-antibiotics-bacteria-that-suck-the-life-out-of-their-prey/), B) <i>Bdellovibrio</i> sp. envahissant une bactérie proie (https://hbsciu.com/2015/01/01/this-family-preyed-together-didnt-stay-together-4/).	132
Figure 69 : A) Cellules de TMX7x fixées sur la membrane d'une <i>Actinomyces odontolyticus</i> , image obtenue par microscopie électronique en transmission [166] ; B) Cellule d'insecte infectée par <i>Wolbachia</i> (http://babec.org/wolbachia-pcr/)	133
Figure 70 : A) Nodules de rhizobium sur des racines de Fabacées (http://www.reed.edu/biology/Nitrogen/Nfix1(legumes).html), B) représentation schématique d'un nodule de rhizobium sur les racines de Fabacées (https://www.slideshare.net/snehaljikamade/rhizobium-65788703).	134
Figure 71 : Schéma représentant les endomycorhizes et les ectomycorhizes (https://fr.wikipedia.org/wiki/Mycorhize).....	135
Figure 72 : A) Représentation schématique d'haustorium (http://biologywriteup.blogspot.fr/2012/03/haustorium.html), B) Filament mycélien de <i>Hyaloperonospora parasitica</i> , un des agents responsables du mildiou parasitant <i>Arabidopsis thaliana</i> et ses haustorium (tâches sombres) (https://fr.wikipedia.org/wiki/Haustorium).....	136
Figure 73 : Schéma du transfert de gènes par transformation (http://pages.infinet.net/p1nchtr3/mecanismes.htm)	137
Figure 74 : Schéma de transfert de gènes par conjugaison (http://www.jpboiseret.eu/biologie/index.php/microbiologie/80-transformation-conjugaison-et-transduction)	137
Figure 75 : Schéma de transfert de gènes par transduction (http://pages.infinet.net/p1nchtr3/mecanismes.htm)	138

Figure 76 : Diversité structurale des facteurs Nod, constitués de 4 à 5 unités N-acetyl-glucosamine liées en β -1,4, les sites de substitution sont indiqués par I-VI et la nature des substituants est indiquée dans l'encadré.	139
Figure 77 : Structures de composés ayant un rôle autoinducteur dans le quorum-sensing, AHL : N-acylhomosérine lactone, 3-oxo-AHL : 3-(oxoacyl)homosérine lactone, 3-hydroxy-AHL : 3-(hydroxyacyl)homosérine lactone, avec R : chaîne hydrocarbonée avec 1 à 15 carbones et une ou plusieurs insaturations ; Facteur A : 2-isocapryloyl-3-hydroxy-méthyl- γ -butyrolactone ; AI-2 : forme ester furanosyl de l'acide borique ; PQS : « Pseudomonas Quinolone Signal », 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone ; DSF : « Diffusible Factor », acide méthyl-dodécénoïque ; PAME : Ester méthylique de l'acide hydroxypalmitique ; AIP1 à AIP4 : « AutoInducer Peptide » de <i>Staphylococcus aureus</i> . [22]	140
Figure 78 : Représentation schématique de la régulation « interkingdom » entre <i>P. aeruginosa</i> et <i>C. albicans</i> . [181]	141
Figure 79 : Biotransformation de la progestérone en 11- α -hydroxyprogestérone par <i>Rhizopus nigricans</i> [182]	142
Figure 80 : Réactions enzymatiques impliquées dans la production des produits sucrés (glucose, fructose,...) et du bioéthanol. A) Hydrolyse enzymatique du sucrose issu de l'amidon en glucose et fructose, B) Isomérisation enzymatique du glucose en fructose, C) Fermentation alcoolique du glucose conduisant à la production d'éthanol.	145
Figure 81 : Biotransformation du glucose et du fructose en sorbitol et acide gluconique par la bactérie <i>Zymomonas mobilis</i>	146
Figure 82 : Biotransformation d'acides gras essentiels par des souches bactériennes isolées à partir de compost.....	146
Figure 83 : Conversion de l'EPA et de la DHA par la bactérie <i>Clavibacter sp</i>	147
Figure 84 : A) Voie de biosynthèse du glutamate par la glutamate déshydrogénase de <i>Corynebacterium glutamicum</i> , GDH : Glutamate déshydrogénase, GS : Glutamine Synthétase, GOGAT : Glutamine amide α -cétooglutarate aminotransférase [188]. B) Transformation de l'acide aspartique par l'aspartate ammonium-lyase.....	147
Figure 85 : Stéroïdes obtenus par biotransformation	148
Figure 86 : Biotransformation de l'hyoscyamine en scopolamine par une souche d' <i>E.coli</i> recombinante	149
Figure 87 : Biotransformation de l'acétate de cinnamyle en cinnamaldéhyde lors du procédé de traitement de l'écorce de cannelle.....	149
Figure 88 : Obtention de la (-)-éphédrine par biotransformation du benzaldéhyde par une souche de levure	150
Figure 89 : Biotransformation de sucres par <i>Glucunobacter oxydans</i> : D-glucose en D-gluconate et D-sorbitol en L-sorbose	152

Figure 90 : Polymères produits par <i>G. oxydans</i> : A) Cellulose, B) Lévanes, C) Dextranes	152
Figure 91 : Dégradation de l'EDTA en éthylène diamine par les oxydases EmoA, EmoB et IdaA de <i>Chelativorans</i> spp	153
Figure 92 : Dégradation de la biotine par <i>Mycoplana</i> sp.	153
Figure 93 : Désacétylation de la N-acétylputrescine par l'acétylpolyamine amidohydrolase de <i>Mycoplana</i> sp.	153
Figure 94 : Equation de la fermentation lactique	154
Figure 95 : Production de butanol par fermentation de <i>Clostridium acetobutylicum</i> [205]	155
Figure 96 : Déglycosylation des isoflavones du soja par <i>Bacillus subtilis</i> [208].....	156
Figure 97 : Dégradation de l'AHL par la lactonase de <i>B. weihenstephanensis</i>	156
Figure 98 : Biotransformation de la genistéine par <i>Streptomyces</i> sp MBT76.....	157
Figure 99 : Hydroxylation de la N-acétyltétrahydroquinoline par <i>Streptomyces</i> sp.	157
Figure 100 : Hydroxylation de divers composés par <i>S. avermitilis</i>	158
Figure 101 : Isolement de la souche MOLA1416 à partir du lichen <i>Lichina pygmaea</i>	167
Figure 102 : Composés isolés à partir de culture de la souche MOLA1416	167
Figure 103 : Isolement de la souche MOLA1488 à partir du lichen <i>Lichina confinis</i>	167
Figure 104 : Composés isolés à partir de culture de la souche MOLA1488	168
Figure 105 : Schéma récapitulatif de l'étude de l'effet de l'acide usnique sur les bactéries associées aux lichens.....	169
Figure 106 : A) Comparaison des courbes de croissance des échantillons de MOLA1416 en fonction du temps, B) Pourcentage de viabilité de la souche MOLA1416 en présence d'acide usnique (AU) mesuré par test au MTT	169
Figure 107 : A) Comparaison des courbes de croissance des échantillons de DP94 en fonction du temps, B) Pourcentage de viabilité de la souche DP94 en présence d'acide usnique (AU) mesuré par test au MTT	170
Figure 108 : A) Comparaison des courbes de croissance des échantillons de DP94 en fonction du temps, B) Pourcentage de viabilité de la souche DP94 en présence d'acide usnique (AU) mesuré par test au MTT	170
Figure 109 : Courbe de croissance bactérienne	171
Figure 110 : Comparaison des profils chimiques de MOLA1416 , A) au début de la phase stationnaire, B) à la fin de la phase stationnaire. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution	

H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.....172

Figure 111 : Comparaison des profils chimiques de **DP94**, A) au début de la phase stationnaire, B) à la fin de la phase stationnaire. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.....172

Figure 112 : Comparaison des profils chimiques de **MOLA1488**, au début de la phase stationnaire. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm173

Figure 113 : Spectre de masse en mode positif du pic de Tr=13,3 min de **MOLA 1488** en présence d'acide usnique.....174

Figure 114 : Comparaison des profils chimiques de **MOLA1488**, à la fin de la phase stationnaire. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm175

Figure 115 : Isolement de *Bacillus weihenstephanensis* à partir du lichen *Peltigera hymenina*176

Figure 116 : Squelettes des composés lichéniques les plus retrouvés et structures des composés sélectionnés.....178

Figure 117 : Chromatogrammes des essais de stabilité de l'acide usnique, de l'acide stictique, de l'acide variolique et du MOC dans les conditions opératoires à J0 et J9 en comparaison avec des témoins. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm.....179

Figure 118 : Composés synthétiques envisagés pour l'étude de biotransformation180

Figure 119 : Chromatogrammes des essais de stabilité du précurseur de la tylophorine dans les conditions opératoires à J0 et J9 en comparaison avec le témoin. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm180

Figure 120 : Schéma récapitulatif de l'essai de biotransformation181

Figure 121 : Biotransformation de l'acide usnique.....181

Figure 122 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à 0,5 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche MOLA1416 et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm.....	182
Figure 123 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à 0,5 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche DP94 et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm	183
Figure 124 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à 0,01 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche <i>B. weihenstephanensis</i> et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm	185
Figure 125 : Biotransformation du MOC.....	187
Figure 126 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,01 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche MOLA1416 et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm	188
Figure 127 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,1 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche DP94 et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm.....	189
Figure 128 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,5 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche <i>B. weihenstephanensis</i> et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C ₁₈ 5 µm, gradient d'élution H ₂ O/ACN : 100% H ₂ O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H ₂ O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm.....	191
Figure 129 : Gradient d'élution analytique classique	200
Figure 130 : Quelques structures représentatives des alcaloïdes	203
Figure 131 : Exemples d'alcaloïdes pyrrolidiniques et tropaniques	204

Figure 132 : Exemples d'alcaloïdes pipéridiniques	204
Figure 133 : Schéma de l'obtention du noyau indolizidine et exemples de composés [44]	205
Figure 134 : Structures des trois alcaloïdes représentatifs des noyaux pyrrolidine, pipéridine et indolizidine sélectionnés pour la suite des travaux	206
Figure 135 : Synthèse du dérivé bromé 78e à partir de l'ester cinnamique 80	226
Figure 136 : Voltampérogramme cyclique de la solution seule (–). Voltampérogramme cyclique de l'ester cinnamique 80 (–).	231
Figure 137 : Voltampérogramme cyclique du phénanthrène 84 (–).	232
Figure 138 : Voltampérogrammes cycliques, a) phénanthrène 84 de 0 à 2,5 V, b) ester cinnamique 80 de 0 à 2,1 V.	233
Figure 139. Diagramme ORTEP du composé 86d	252

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Exemples de composés antibactériens issus de cultures d'Actinobactéries.....	19
Tableau 2 : Composés antitumoraux obtenus à partir d'Actinobactéries utilisés en chimiothérapie ..	22
Tableau 3 : Composés cytotoxiques isolés à partir de souches d'Actinobactéries associées	24
Tableau 4 : Composés produits par des souches de Nocardia non décrits dans la review de Luo et al.	41
Tableau 5 : Résultats des essais de milieu de culture et de durée de culture : poids des extraits et activité sur cellules B16 et HaCaT. a : ISP2 = International Streptomyces Project 2, TY = Tryptone Yeast, MB = Marine Broth, LB = Lysogeny Broth ; b : Concentration minimale inhibitrice de 50% de la population cellulaire	50
Tableau 6 : Quantité d'extrait, rendements et activité cytotoxique des extraits obtenus par culture à grande échelle	53
Tableau 7 : Quantité d'extrait, rendement et activité cytotoxique des extraits obtenus par culture en bioréacteur	56
Tableau 8 : Présentation des 3 facteurs sélectionnés et des valeurs de leurs 3 niveaux pour l'étude en erlenmeyer	57
Tableau 9 : Conditions expérimentales en erlenmeyer avec le plan d'expérience en matrice orthogonale L9 (3 ³) selon Taguchi	57
Tableau 10 : Résultats du plan d'expérience en erlenmeyer : quantité d'extraits, rendement et activité cytotoxique des extraits obtenus	58
Tableau 11 : Résultats de l'analyse de variance	58
Tableau 12 : Présentation des 4 facteurs sélectionnés et des valeurs de leurs 3 niveaux pour l'étude en bioréacteur	59
Tableau 13 : Conditions expérimentales en bioréacteur avec le plan d'expérience en matrice orthogonale L9 (3 ⁴) selon Taguchi	59
Tableau 14 : Résultats du plan d'expérience en bioréacteur : quantité d'extraits, rendement et activité cytotoxique des extraits obtenus	59
Tableau 15 : Résultats de l'analyse de variance	60
Tableau 16 : Quantité d'extrait, rendements et activité cytotoxique des extraits obtenus par culture en bioréacteur	64
Tableau 17 : Données spectroscopiques RMN- ¹ H et RMN- ¹³ C des composés 13 et 14	72
Tableau 18 : Activité cytotoxique des composés 13 , 14 , 19a et 19b	77

Tableau 19 : Résultats des tests de cytotoxicité des composés isolés 1-12 et 20-22 sur cellules HaCaT et B16	79
Tableau 20 : Quantité d'extrait, rendements et activité cytotoxique des extraits obtenus par culture à grande échelle dans le milieu TY	85
Tableau 21 : Récapitulatif des fractions obtenues et leur activité cytotoxique	85
Tableau 22 : Répartition des fractions dans les différents groupes suivant leur activité cytotoxique..	86
Tableau 23 : Ions en mode positif constituant les clusters de composés potentiellement actifs.....	87
Tableau 24 : Ions en mode négatif constituant les clusters de composés potentiellement actifs	87
Tableau 25 : Fractions obtenues à partir de l'extrait de résine de l'expérience 3 du plan d'expérience	89
Tableau 26 : Ions influençant la séparation des échantillons sur l'axe des X (mode positif).....	92
Tableau 27 : Ions influençant la séparation des échantillons sur l'axe des Y (mode positif).....	92
Tableau 28 : Quantité d'extrait, rendement et activités des extraits issus de la répétition de l'expérience 3 du plan d'expérience.	95
Tableau 29 : Mode ascendant. Volume de phase stationnaire éjecté (en mL) durant l'équilibrage de la CPC en fonction de la vitesse de rotation et du débit. Volume total de colonne : 57 mL.	95
Tableau 30 : Mode descendant. Volume de phase stationnaire éjecté (en mL) durant l'équilibrage de la CPC en fonction de la vitesse de rotation et du débit. Volume total de colonne : 57 mL.....	96
Tableau 31 : Fractions collectées en CPC, quantités et activités cytotoxiques sur lignées cellulaires B16 et HaCaT	96
Tableau 32 : Fractions collectées suite au fractionnement de la fraction CPC eau par HPLC semi-préparative, quantités et activités cytotoxiques sur lignées cellulaires B16 et HaCaT.	97
Tableau 33 : Différentes enzymes et leur réaction, ^a : réaction réversible, ^b : réaction réversible en retirant l'eau du milieu.	143
Tableau 34 : Biotransformation de composés phénoliques par des souches de Nocardia	159
Tableau 35 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de MOLA1416 en présence d'acide usnique, ND : non détecté	183
Tableau 36 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de DP94 en présence d'acide usnique, ND : Non détecté	184
Tableau 37 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de B. weihenstephanensis en présence d'acide usnique, ND : Non détecté.....	185

Tableau 38 : Récapitulatif des composés détectés lors de l'essai de biotransformation de l'acide usnique.....	186
Tableau 39 : Analyse par spectrométrie de masse en mode négatif des principaux composés détectés	186
Tableau 40 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de MOLA1416 en présence de MOC, ND : non détecté	188
Tableau 41 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de DP94 en présence de MOC, ND : non détecté	190
Tableau 42 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de <i>B. weihenstephanensis</i> en présence de MOC, ND : non détecté	191
Tableau 43 : Récapitulatif des composés détectés lors de l'essai de biotransformation du MOC	192
Tableau 44 : Analyse par spectrométrie de masse en mode négatif des principaux composés détectés	193
Tableau 45 : Constitution des échantillons de culture pour l'étude de l'effet de l'acide usnique	198
Tableau 46 : Réaction d'aldolisation entre l'ester 81 et le vératraldéhyde	228
Tableau 47. Paramètres cristallographiques du composé 86d	252

Liste des annexes :

ANNEXE 1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 1 (Indole-3-carboxaldéhyde) dans le CD_3OD ...	282
ANNEXE 2 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 4 (cyclo (L-Val-L-Pro)) dans le CD_3OD	283
ANNEXE 3 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 7 (cyclo (L-Tyr-D-Pro)) dans le CD_3OD	284
ANNEXE 4 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 9 (cyclo (L-Tyr-L-Tpn)) dans le CD_3OD	285
ANNEXE 5 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 10 (1-(5-Deoxy- β -D-erythro-pent-4-enofuranosyl)) dans le CD_3OD	286
ANNEXE 6 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 11 (Adénosine) dans le D_2O	287
ANNEXE 7 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 12 (Cyclo (L-OMet-L-Pro)) dans le CD_3OD	288
ANNEXE 8 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 20 (Cyclo (L-Leu-L-Pro)) dans le CDCl_3	289
ANNEXE 9 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 21 (Cyclo (L-Tyr-L-Pro)) dans le CD_3OD	290
ANNEXE 10 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 22 (Adénine) dans le CD_3OD	291
ANNEXE 11 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé 23 (Uracile) dans le $\text{DMSO}-d_6$	292
ANNEXE 12 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion de l'acide usnique à 0,01 mg/mL et 0,1 mg/mL par la souche MOLA1416	293
ANNEXE 13 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion de l'acide usnique à 0,01 mg/mL et 0,1 mg/mL par la souche DP94	294
ANNEXE 14 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion de l'acide usnique à 0,1 mg/mL et 0,5 mg/mL par la souche <i>B. weihenstephanensis</i>	295
ANNEXE 15 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion du MOC à 0,1 mg/mL et 0,5 mg/mL par la souche MOLA1416	296
ANNEXE 16 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion du MOC à 0,01 mg/mL et 0,5 mg/mL par la souche DP94	297
ANNEXE 17 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion du MOC à 0,01 mg/mL et 0,1 mg/mL par la souche <i>B. weihenstephanensis</i>	298

Introduction

Introduction générale

Depuis plus d'une quinzaine d'années la recherche sur le cancer s'intensifie et de nouvelles thérapeutiques ont vu le jour permettant de grandes avancées dans le traitement de cette pathologie. Cependant, le nombre de victimes du cancer reste fortement élevé avec près de 8,8 millions de morts en 2015 [1] et une prévision de 70% de nouveaux cas détectés dans les deux prochaines décades [1].

Dans ce contexte, de nombreux laboratoires axent leurs recherches sur le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux. Une partie des thématiques de notre laboratoire s'oriente vers la recherche de composés cytotoxiques innovants en concentrant ses investigations vers des produits d'origine naturelle. En effet, selon Newman et Cragg, 77% des médicaments anti-cancéreux mis sur le marché entre les années 1940 et 2014 (hormis les composés de haut poids moléculaires comme les vaccins et produits biologiques) sont directement obtenus à partir de sources naturelles ou en sont inspirés [2].

Plus particulièrement, les sources biologiques étudiées lors de ce travail sont des lichens. Ces organismes sont issus de la symbiose entre un photobiot (algue verte ou cyanobactérie) et un mycobiot (champignon) ce qui leur confère des propriétés de production de métabolites originaux [3,4]. Ce sont également des organismes constituant une niche écologique très importante au sein de laquelle de nombreux micro-organismes associés vont être retrouvés. Ces espèces microbiennes très peu étudiées peuvent mener à la découverte de nouvelles espèces ayant un intérêt potentiel dans l'identification de nouveaux composés avec des propriétés pharmacologiques intéressantes. Un grand nombre de bactéries ont déjà été isolées à partir de lichens par le biais d'une approche indépendante de la culture (résumée par Suzuki et al, [5]) ou par une approche dépendante de la culture [6,7].

Ainsi, les précédents travaux de Delphine Parrot réalisés sur trois lichens marins/maritimes (*Roccella fuciformis*, *Lichina confinis* et *L. pygmaea*) et une espèce de lichen terrestre (*Collema auriforme*) ont permis d'isoler 247 souches bactériennes représentant 95 espèces différentes associées à ces lichens [6]. Les trois principaux phyla bactériens représentés par ces espèces sont les Alphaproteobactéries, les Actinobactéries et les Firmicutes.

L'intérêt biotechnologique des Actinobactéries n'est aujourd'hui plus à démontrer. En effet de nombreuses souches issues de ce phylum sont à l'origine de la production de molécules bioactives représentant ainsi 45% des produits actifs connus d'origine microbienne [8]. Ces bactéries sont également fréquemment utilisées pour leurs capacités biosynthétiques pouvant être améliorées par génie métabolique [9]. C'est pourquoi nous avons en premier lieu porté notre intérêt sur une souche à activité cytotoxique issue du phylum des Actinobactéries, identifiée comme *Nocardia sp.*, isolée à partir d'un lichen terrestre, *Collema auriforme*.

Les lichens du genre *Collema* sont des cyanolichens ce qui signifie que le photobiot de l'association est une cyanobactérie. Dans le cas de *Collema auriforme* c'est une cyanobactérie du genre *Nostoc*, connue pour sa capacité à fixer l'azote atmosphérique, qui est impliquée dans la symbiose, apportant ainsi une importante quantité d'azote pour les autres partenaires symbiotiques. Les bactéries épithallines se trouvent donc libres d'exploiter cet azote disponible pour la synthèse de composés azotés à des fins de signalisation entre bactéries ou avec les autres organismes symbiotiques ou encore pour la production de composés visant une régulation de la population (antibiotiques, cytotoxiques).

Nous avons donc focalisé nos recherches sur ce type de composés puisque, lorsque l'on regarde de plus près les structures des composés bioactifs d'origine naturelle, nous retrouvons couramment des

structures azotées, représentées notamment par les alcaloïdes. Ces molécules possèdent des activités dans divers domaines par exemple dans celui des antibiotiques avec les β -lactamines, dans les anti-parasitaires avec les amino-quinoléines, dans les médicaments agissant sur le système nerveux central avec les morphiniques ou les benzodiazépines et bien évidemment dans le domaine des médicaments anti-cancéreux avec par exemple les alcaloïdes de la pervenche (vinblastine, vincristine, etc...). Le sujet de cette étude a donc été l'obtention de nouveaux composés azotés bioactifs et pour y répondre nous avons orienté nos travaux selon deux axes : l'obtention de ce type de composés par la voie de l'isolement de produits naturels, et par la voie de la synthèse.

Dans le but de découvrir de nouveaux composés d'intérêt pharmaceutique, les objectifs de ce travail seront divisés en trois chapitres qui seront successivement développés dans ce manuscrit :

Tout d'abord le **premier chapitre** présentera le travail d'isolement et de profilage chimique réalisé à partir d'une souche bactérienne isolée d'un lichen. Après une **partie 1** décrivant les lichens et leurs bactéries associées, les travaux effectués sur la souche sélectionnée seront divisés en 4 parties. La **partie 2** présentera les travaux d'optimisation des conditions de culture de la souche, et ceci notamment par l'utilisation d'un plan d'expérience. Par la suite, la **partie 3** décrira une étude complète du profil chimique de la bactérie et l'isolement des composés produits. Un ciblage des composés responsables de l'activité a été effectué par l'utilisation des réseaux moléculaires et par analyse chimiométrique, ce qui constituera la **partie 4**. Enfin la **partie 5** présentera une manière différente d'accéder à des composés actifs par un fractionnement bioguidé par chromatographie par partage centrifuge.

Le **deuxième chapitre** décrira un travail portant sur l'étude de la relation lichen-bactérie réalisé par le biais d'études de biotransformation et de l'effet de composés lichéniques sur le métabolisme et la croissance bactérienne. En effet plusieurs travaux ont été réalisés sur les micro-organismes associés aux lichens mais la nature de cette relation n'est pas encore expliquée [10,11]. Une **première partie** présentera les différents types de relations existants entre les organismes, les modes de communications développés par ces organismes notamment par la voie chimique et des travaux de biotransformation effectuée à partir de souches bactériennes. La **partie 2** développera les études portant sur l'effet de l'acide usnique sur des bactéries associées à des lichens et sur les essais de biotransformation de composés lichéniques par ces bactéries.

Le **troisième chapitre** présentera les méthodes de synthèse étudiées pour obtenir des composés azotés bioactifs d'origine naturelle. Après un survol des différentes méthodes de synthèse décrites dans la littérature présenté dans la **partie 1**, les résultats des travaux de synthèse seront détaillés dans la **partie 2**.

ACTE I : Obtention de composés azotés à partir de bactéries associées aux lichens

Scène 1 : Introduction bibliographique

A. Les bactéries associées aux lichens

1. Le point de départ : les lichens

Tout commence avec cet organisme surprenant qu'est le lichen, symbiose de deux partenaires définis possédant chacun un rôle dans la vie de l'organisme. Cette association apporte de nombreuses propriétés à l'organisme, à commencer par une résistance exceptionnelle à des conditions climatiques extrêmes (sécheresse, vents violents, froid...) ainsi qu'une longévité impressionnante. Les lichens vivent facilement plusieurs décennies et peuvent même atteindre plusieurs siècles... On peut retrouver des lichens sur à peu près tous types de substrat : les lichens épiphytes qui colonisent les arbres et autres plantes, les lichens saxicoles qui recouvrent la surface de roches, murs, tuiles ; les lichens crypto-endolithes vivant sous les roches ; les lichens corticoles qui se développent sur les écorces ; les lichens terricoles et humicoles que l'on retrouve sur les pelouses ; etc...

a. La distribution des rôles entre les principaux partenaires symbiotiques

Le premier partenaire, sur lequel s'appuie la classification des lichens, est appelé mycobiotte ou mycosymbiotte. Le second appelé photobiotte ou photosymbiotte peut être une algue verte et/ou une cyanobactérie.

Le mycobiotte, comme son nom l'indique, est un champignon qui représente près de 80% de la biomasse du lichen. Dans 99% des cas, il appartient à la branche des Ascomycètes et plus particulièrement au subphylum des *Pezizomycotina* et près de 50% des ascomycètes sont lichénisés. Les autres lichens sont issus de l'association d'un Basidiomycète ou plus rarement d'un Deutéromycète avec un photobiotte [12].

Il possède des capacités protectrices envers l'organisme photosynthétique, en formant une couche d'hyphes dense qui limite l'exposition des cellules algales aux conditions climatiques. Il est aussi responsable de la formation de poils et/ou rhizines qui ont généralement un rôle de fixation au support mais qui peuvent également protéger l'organisme. Ce n'est pas son seul atout, ce champignon est capable d'apporter une certaine humidité aux cellules algales ainsi que des sels minéraux nécessaires à leur survie. Enfin, il est également l'organisme capable de reproduction sexuée et asexuée au sein du lichen [12].

Le photobiotte, quant à lui, est capable de photosynthèse. Il apporte donc certains nutriments issus de cette réaction, notamment le carbone. Ce partenaire a été moins étudié et il est difficilement identifié (seulement 2% de photobiotes identifiés jusqu'au rang de l'espèce) car ses caractères morphologiques sont fortement modifiés au sein de la symbiose avec le mycobiotte. Son identification nécessite alors de le cultiver de façon indépendante. On sait cependant que la majeure partie des associations lichéniques (85%) sont faites avec des chlorophytes (algues vertes). Les principales classes ainsi retrouvées dans les lichens sont les Charophycées, les Chlorophycées, les Ulvophycées et les Trebouxiophycées. Les genres les mieux représentés au sein de la symbiose lichénique sont les genres *Trebouxia* avec une vingtaine d'espèces recouvrant environ 50% des lichens et le genre *Trentepohlia*. Au sein du genre *Verrucaria*, certains lichens sont issus d'une association d'un ascomycète avec une Xanthophycée (algue rouge), la seule algue non verte retrouvée au sein de la symbiose lichénique [12,13].

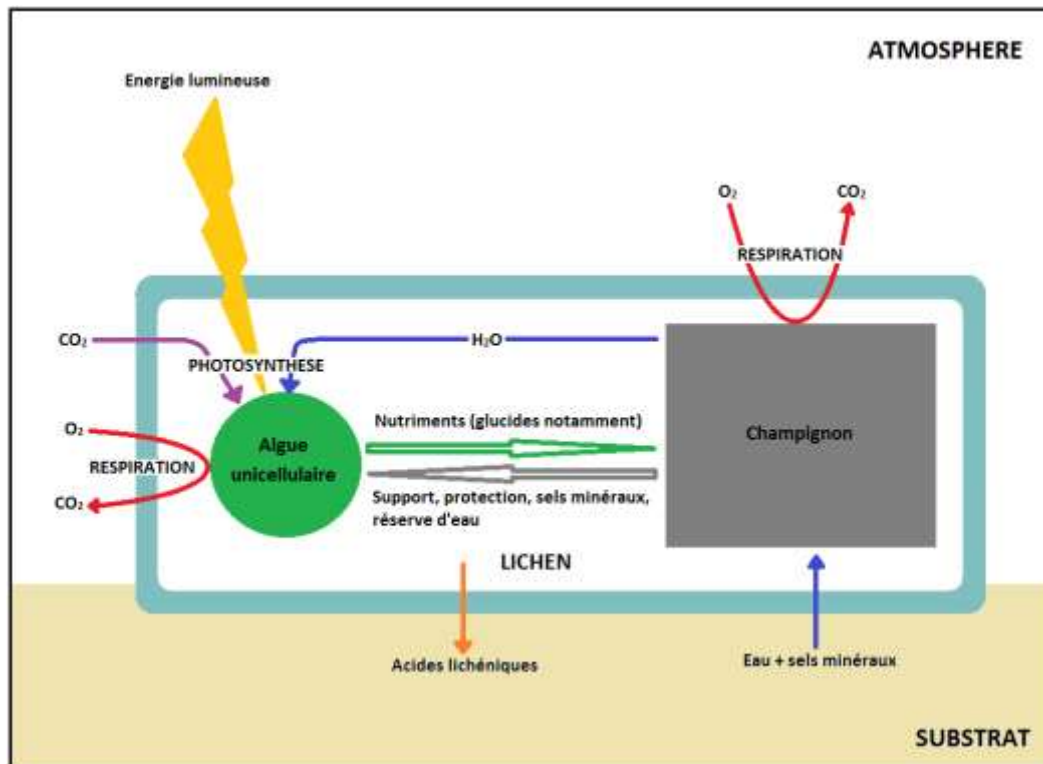


Figure 1: Schéma représentant les interactions entre les principaux partenaires de la symbiose lichénique (<http://labopathe.free.fr/symbioses.html>)

Le photobiotte peut également être une cyanobactérie (10% des cas). Les ordres les plus représentés sont alors les Chroococcales, les Stigonémales, les Pleurocapsales et majoritairement les Nostocales avec le genre *Nostoc*. Ce type de partenaire apporte alors un intérêt nouveau du fait de sa capacité nitrophile, il peut fixer l'azote atmosphérique et le rendre ainsi disponible sous forme organique pour les autres partenaires [13].

On retrouve également certaines situations tripartites (5% des espèces lichéniques) où le mycobiotte est alors associé à une algue et une cyanobactérie. Les cyanobactéries sont alors hébergées dans une structure particulière appelée céphalodie qui peut être à l'intérieur ou à l'extérieur du thalle.

Enfin, depuis déjà la moitié du 20^{ème} siècle un troisième partenaire est décrit dans cette association. Il s'agit de l'ensemble des bactéries vivant au sein du thalle, appelé bactériobiotte ou communauté bactérienne associée [14]. Ils seront décrits plus loin dans ce manuscrit (2. p.11). D'autres organismes ont pu être identifiés au sein de la symbiose lichénique, les levures de type Cyphobasidiales ont par exemple été décrites également comme le troisième partenaire de l'association par Toby Spribille *et al.* [15]. Finalement, on se retrouve bien ici en présence d'un organisme multi-partite qui est défini comme un **réseau symbiotique** par Martin Grube (communication personnelle).

b. Le décor : le thalle lichénique

La singularité de l'association lichénique donne naissance à une structure totalement nouvelle et différente de celles des différents partenaires symbiotiques. Les lichens se présentent sous forme de thalle par conséquent ils sont dépourvus de tiges, feuilles et racines et ils ne sont pas vascularisés.

À l'échelle macroscopique les thalles lichéniques peuvent avoir de nombreux aspects différents ce qui témoigne de la grande diversité de ces organismes. Les formes les plus couramment retrouvées sont [13]:

- Les thalles **crustacés** qui pénètrent profondément dans le substrat au point de parfois en être indissociables (Figure 2-a)).
- Les thalles **squamuleux** ressemblent à de petites écailles imbriquées les unes dans les autres (Figure 2-b)).
- Les thalles **foliacés** sont en forme de feuille ou de lame, ils sont facilement détachables de leur substrat (Figure 2-c)).
- Les thalles **fruticuleux** forment des tiges plus ou moins ramifiées, dressées ou pendantes et reliées au substrat par une attache (Figure 2-d)).
- Les thalles **gélatineux**, généralement représentés par les lichens à cyanobactérie, sont gélatineux lorsqu'ils sont humidifiés et noirs et cassants lorsqu'ils sont secs (Figure 2-e)).
- Les thalles **lépreux** ressemblent à de la poudre facilement détachable du substrat (Figure 2-f)).
- Les thalles **composites** sont divisés en deux parties : le thalle primaire qui adhère généralement au substrat peut être crustacé, squamuleux ou foliacé et le thalle secondaire qui se développe par-dessus peut être fruticuleux et dressé (Figure 2-g)).

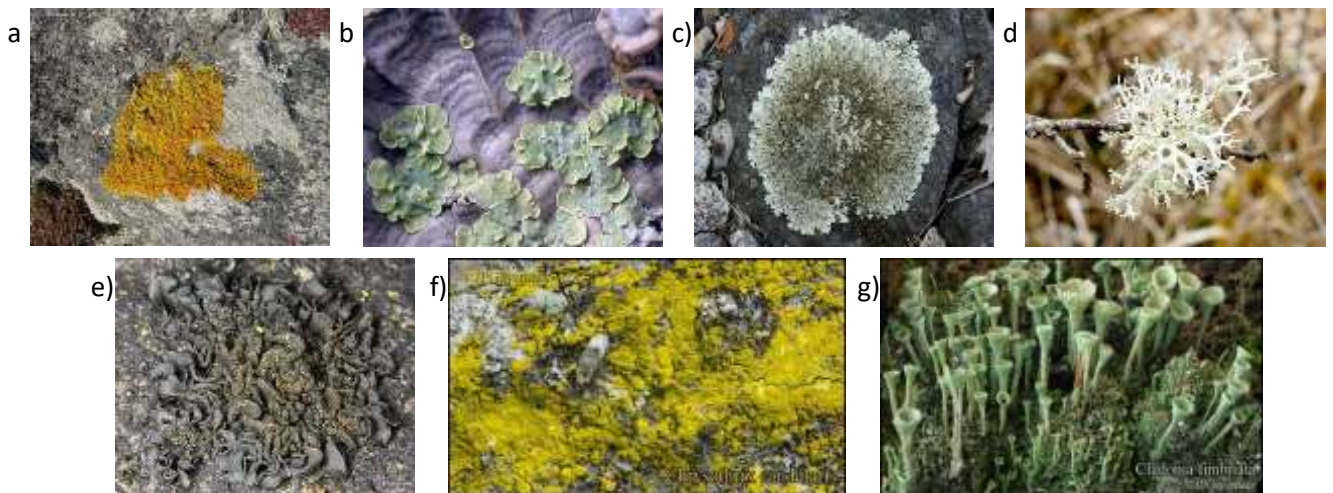


Figure 2 : Photographies des différents types de thalles lichéniques : a) *Caloplaca marina*, thalle crustacé ; b) *Normandina pulchella*, thalle squamuleux ; c) *Xanthoparmelia conspersa*, thalle foliacé ; d) *Evernia prunastri*, thalle fruticuleux ; e) *Collema auriforme*, thalle gélatineux ; f) *Chrysothrix candelaris*, thalle lépreux ; g) *Cladonia fimbriata*, thalle composite

À l'échelle microscopique les différents partenaires sont agencés d'une façon particulière de manière à exploiter au mieux leurs ressources et pour optimiser les échanges. Deux structures sont classiquement décrites [13] :

- Les thalles **homéomères** où les deux partenaires sont répartis uniformément au sein de la structure (Figure 3). C'est le cas par exemple des lichens du genre *Collema*.
- Les thalles **hétéromères** où les partenaires vont se rassembler par couches et former ainsi des structures stratifiées ou radiées. La couche la plus extérieure, cortex supérieur, est constituée d'hyphes très serrés constituant ainsi une barrière protectrice pour la seconde couche, la couche algale, où les cellules algales (gonidies) sont mêlées à des hyphes plus relâchés. La couche suivante, la médulle, est constituée d'hyphes encore plus lâches et enfin, le cortex inférieur (ou cordon axial dans le cas des structures radiées), est composé d'hyphes resserrés (Figure 4). Cette catégorie représente de nombreux lichens. Nous pouvons par exemple citer les genres *Lobaria* ou *Usnea*.

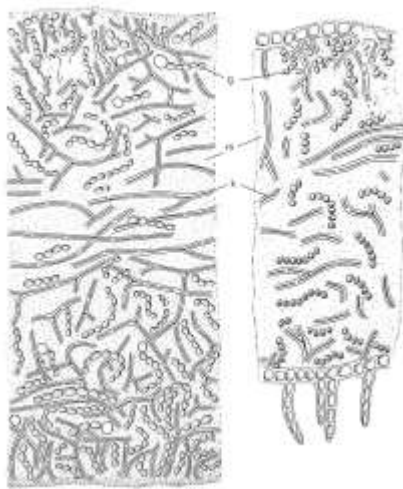


Figure 3: Schéma de la structure des thalles homéomères ; g : gonidies Nostoc, m : mucilage, h : hyphes (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]

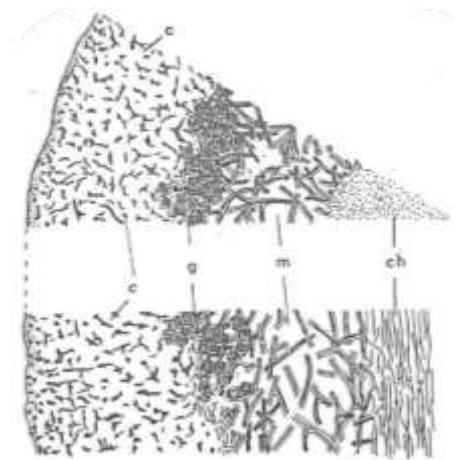


Figure 4: Schéma de la structure des thalles hétéromères ; c : cortex supérieur, g : gonidies, m : médulle, ch : cortex inférieur ou cordon axial (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]

De nombreuses autres structures sont présentes sur les thalles lichéniques ayant diverses fonctions dont les organes de reproduction.

c. La reproduction

Les lichens sont des organismes cryptogames, ce qui signifie que leurs organes reproducteurs sont « cachés ». En réalité, il existe plusieurs modes de reproduction chez les lichens : la multiplication végétative, la reproduction sexuée et asexuée.

La multiplication végétative se produit à n'importe quel endroit du thalle par fragmentation ou par la formation d'isidies ou de soralies. Les isidies sont de petits bouts de cortex qui se détachent du thalle. Ils contiennent des cellules algales ainsi que des morceaux de thalle fongique et sont enveloppés d'une membrane protectrice constituée de thalles fongiques enchevêtrés (Figure 5). Les soralies sont des structures granuleuses du thalle qui s'ouvrent et libèrent un enchevêtrement de cellules algales et fongiques (non protégées par une membrane) appelées sorédies. [16]

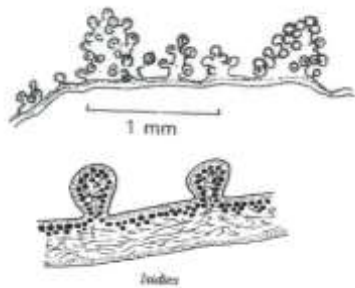


Figure 5 : Schéma d'isidies

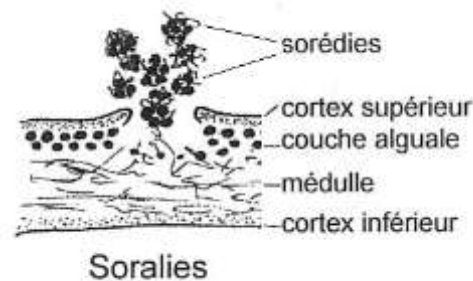


Figure 6 : Schéma de soralie

La reproduction asexuée est réalisée par le mycobiote. Ainsi, des structures appelées pycnides (Figure 7) sont formées au niveau des hyphes et libèrent des conidies ou pycnidiospores produites par mitose. [13,16]

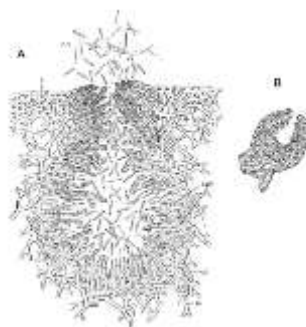


Figure 7 : Schéma de pycnide : A : coupe verticale de pycnide de *Parmelia physodes* (x 700), c : cortex du thalle ; m : médulle ; cph : filaments conidiophores tapissant la cavité de la pycnide, cn : conidies libérées par l'ostiole ; B : coupe verticale d'une conidie (x 120) (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]

La reproduction sexuée est également assurée par les hyphes fongiques. Les structures responsables de cette mission sont appelées des ascocarpes. On distingue deux types. D'une part, les apothécies (Figure 8), en forme de coupole dont l'intérieur est recouvert par un tissu fertile appelé hyménium. Ce tissu est constitué par des asques contenant les spores et des paraphyses stériles. D'autre part, les périthèces (Figure 9), en forme de dôme ouvert au sommet par un pore ou ostiole. Ces derniers contiennent un tissu fertile appelé nucleus qui est constitué par des asques et paraphyses. Les spores ainsi libérés sont uniquement des cellules fongiques qui perpétueront l'organisme lichénique après avoir trouvé leur associé algal. [13]

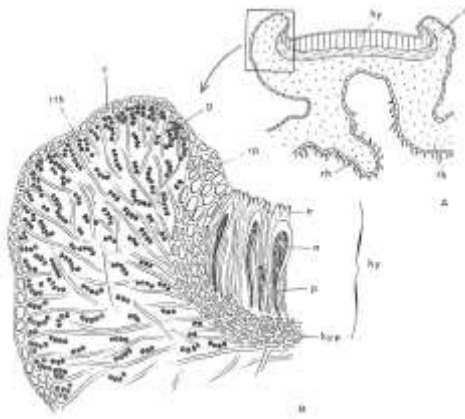


Figure 8 : Schéma d'une apothécie de *Leptogium hildebrandii*, A : coupe verticale avec le thalle, hy : hyménium, r : rebord de l'apothécie, rh : rhizines, th : thalle ; B : agrandissement de l'encadré, rth : bord thallin, c : cortex, g : gonidies, rp : rebord propre, e : extrémité des paraphyses épaissies formant l'épithécium, a : asques, p : bases des paraphyses, hyp : hypothécium (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]

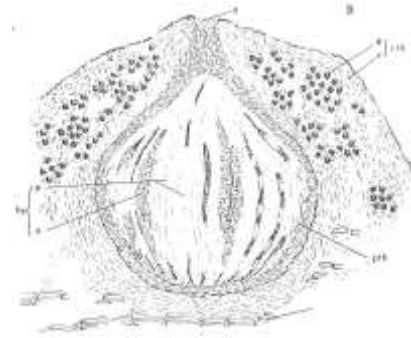


Figure 9 : Schéma d'un périthèce de *Thelopsis isiaca*, rth : enveloppe thalline, g : gonidies, c : cortex, pth : pyrénum, o : ostiole, hy : hyménium, a : asques contenant les spores, p : paraphyse (d'après Ozenda et Clauzade, « Les lichens : Etude biologique et flore illustrée ») [13]

2. Les personnages principaux : les micro-organismes isolés

Comme dit précédemment, les champignons et les algues ne sont pas les seuls habitants de cette terre d'accueil qu'est le lichen. Les associations tripartites ont d'abord été mises en évidence dans les années 1920, révélant la possibilité de trouver en association au sein du lichen le champignon, l'algue et la cyanobactérie. Puis au fur et à mesure des années, différents genres bactériens ont été identifiés à partir des lichens [17,18] ainsi que divers champignons et levures. Ce qui a ainsi démontré l'existence d'un microbiome spécifique du thalle lichénique. Le bénéfice des associations entre organismes procaryotes et eucaryotes a déjà été prouvé notamment au sein de la symbiose rhizobium-fabacées [19], mais dans le cadre de la symbiose lichénique les conditions de cette cohabitation ne sont pas réellement expliquées ce qui a motivé les travaux sur les bactéries associées aux lichens.

a. Qui sont-elles ?

Les bactéries appartiennent au règne des procaryotes ce qui signifie que ce sont des organismes unicellulaires (le plus souvent) dépourvus de noyaux par opposition aux eucaryotes. Les premières bactéries ont été observées par Antoine van Leeuwenhoek en 1675 avec le microscope qu'il avait inventé. Il les appelle alors des animalcules [20,21]. Ces organismes sont plus ou moins étudiés au cours des années qui ont suivi. On établit alors l'hypothèse qu'ils sont produits lors de la putréfaction de la matière organique par génération spontanée. Plusieurs scientifiques vont s'opposer à cette théorie. Nous pouvons citer par exemple Lazzaro Spallanzani qui réalise des expériences entre des milieux laissés à l'air et des milieux chauffés, isolés de manière étanche dans lesquels la prolifération

est limitée [22]. Mais les grandes avancées en matière de bactériologie sont réellement réalisées par Louis Pasteur au cours du XIX^e siècle. Il étudie alors les milieux de culture bactériens et décrit les réactions de fermentation lactique en excluant ainsi définitivement la théorie de la génération spontanée. Les travaux sur le rôle des bactéries dans la propagation de certaines maladies ont été initiés par Robert Koch et ses études sur la maladie du charbon (1876). Ils ont été appuyés par les travaux que Pasteur réalise en parallèle sur la vaccination [22].

Ehrenberg fut le premier à introduire le terme « bactérie » en donnant sa classification en 1838 dans son grand ouvrage « Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen » [21]. Le terme « protiste » est ensuite utilisé par Haeckel pour désigner ce qui n'appartient ni au règne animal, ni au règne végétal [23]. Ce n'est qu'en 1925 que le terme « procaryote » fut utilisé avec les travaux d'Edouard Chatton dans son article « *Pansporella perplexa : Réflexions sur la biologie et la phylogénie des Protozoaires* ». Il différencie alors les protistes eucaryotes (organismes à cellule avec noyau) et les protistes procaryotes (organismes à cellule sans noyau) [20].

Aujourd'hui le règne des eucaryotes regroupe les animaux, les végétaux, les champignons et les protistes. Le règne des procaryotes, quant à lui, rassemble les bactéries et les archées.

De façon générale, une bactérie est donc une cellule sans noyau, dont le matériel génétique est regroupé dans un ADN chromosomique circulaire présent dans le cytoplasme. De façon récurrente on trouve également de l'ADN extra-chromosomique dans des petites structures isolées appelées plasmides. L'ensemble de la bactérie est recouvert d'une membrane complexe dont la composition varie en fonction de l'espèce. Elle peut être également dotée d'organes de mobilité comme des cils ou des flagelles (Figure 10) [24].

On peut différencier différents types de bactéries par leurs caractéristiques morphologiques. Par exemple il existe des bactéries dites à Gram positif ou Gram négatif qui réagiront de façon différente à la coloration de Gram. Cette technique consiste en l'utilisation d'un colorant qui ne pénètre que dans un seul type de membrane bactérienne. Ainsi, on différencie les bactéries à Gram positif dont la membrane est uniquement constituée de nombreuses couches de peptidoglycanes, et les bactéries à Gram négatif qui possèdent une unique couche de peptidoglycanes recouverte d'une membrane externe constituée de lipopolysaccharide, empêchant la pénétration du colorant (Figure 11) [25].

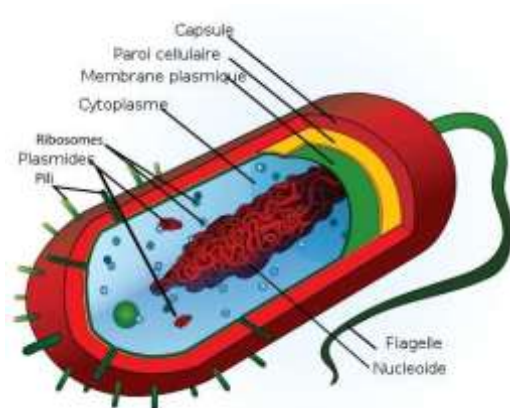


Figure 10 : Schéma d'une bactérie (© LadyofHats, Wikipédia, DP)

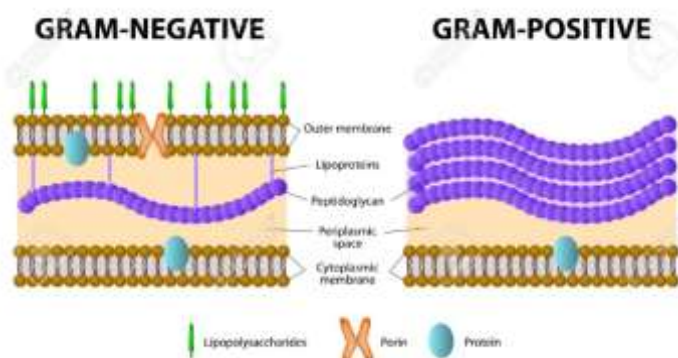


Figure 11 : Schéma des différents types de membranes bactériennes (Banque d'images 123RF)

Elles peuvent également être classifiées en fonction de leur morphologie : cocci, bacilles, coccobacilles, etc... (Figure 12)

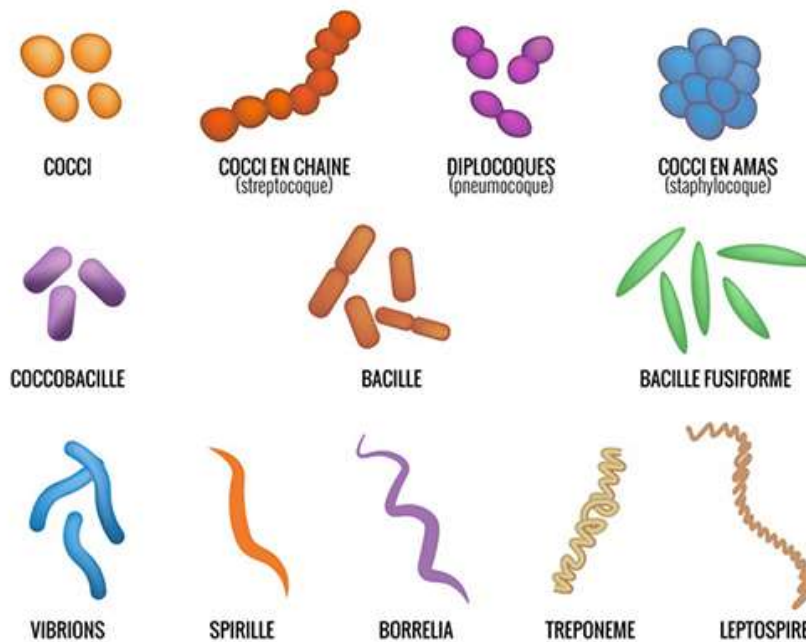


Figure 12 : Classification des différents types bactériens en fonction de leur morphologie (Site Antibio-responsable.fr, classification des bactéries)

b. Mise en scène bactéries-lichens

La proportion de bactéries constituant le microbiome lichénique a été évaluée à l'aide de différentes techniques *in situ* ou par isolement. Cardinale *et al.* ont réalisé une estimation du nombre de nos protagonistes au sein du thalle lichénique de *Cladonia arbuscula* par FISH/CLSM (Hybridation *in situ* en fluorescence couplée à de la microscopie confocale). Ce procédé a montré la présence de 6.10^7 bactéries/gramme de lichen [26]. Les études qui ont suivi, décrites par Grube *et al.*, ont évalué de la même manière de 10^4 à 10^6 bactéries/mm³ de lichen au sein de *Cladonia arbuscula*, *Lecanora polytropa* et *Umbilicaria cylindrica* [14]. L'estimation du nombre d'unités formant colonie (UFC) réalisée par isolement des souches bactériennes sur ces trois lichens a confirmé l'ordre de grandeur de ces valeurs avec entre 10^4 et 10^7 UFC/gramme de lichen [14]. Plus récemment, une étude méta-protéomique, réalisée sur *Lobaria pulmonaria* a attribué 27% des protéines totales extraites au partenaire bactérien [27]. Par conséquent, ces études démontrent dans un premier temps que la présence de bactéries dans le thalle lichénique n'est pas anodine, et dans un deuxième temps elles caractérisent les principaux phyla bactériens rencontrés et leurs proportions. De cette manière, il a été établi que les Protéobactéries avec une plus forte représentation des Alphaprotéobactéries (60%), les Actinobactéries et les Firmicutes (moins de 10%) sont le plus impliquées dans la relation lichen-bactérie [26,27].

La répartition des partenaires bactériens au sein du lichen dépend du type de thalle auquel on s'intéresse. Ainsi, Cardinale *et al.* ont pu mettre en évidence par microscopie confocale à laser une localisation préférentielle des bactéries à l'intérieur du thalle cylindrique de *Cladonia arbuscula* [26]. Sur le thalle « leaf-like » de *Lobaria pulmonaria* ce sont principalement des α -protéobactéries qui vont

être observées par images obtenues par FISH. Celles-ci sont dispersées sur les deux faces du thalle lichénique alors que les β -protéobactéries, moins bien représentées, sont retrouvées en amas distincts [28]. De la même manière, avec le lichen *Umbilicaria cylindrica*, les bactéries associées sont retrouvées en amas sur la surface inférieure du thalle et sur le lichen crustacé *Lecanora polytropa* elles forment des amas denses dans la partie basale du thalle [17] (Figure 13). L'observation en microscopie électronique à balayage du lichen fossilisé du Dévonien supérieur *Chlorolichenomycites salopensis* et du lichen existant *Peltigera leucophlebia*, montre la présence de bactérie sur les hyphes de la médulle du lichen fossilisé ainsi qu'à la surface du thalle inférieur du lichen existant [29].

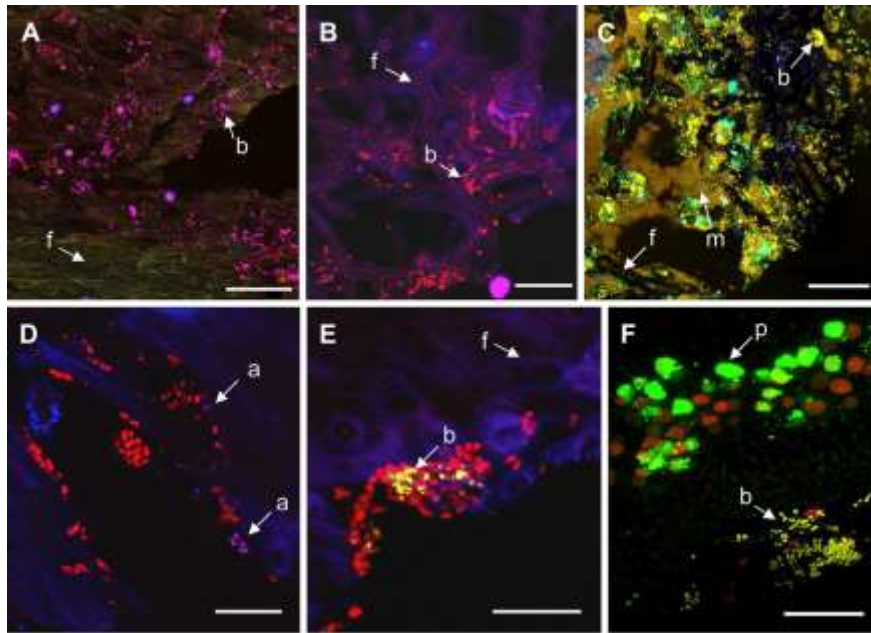


Figure 13 : (A–F), images CLSM, (A–B) bactéries révélées en rose par FISH . (A), Surface interne des podétions de *Cladonia arbuscula*, (B), hyphes de la surface externe de *Cladonia arbuscula* ; (C) nombreuses bactéries (en jaune) dans l'hypothallosphère du lichen crustacé *Lecidoma demissum* ; (D–E) Thalle de *Cladonia arbuscula*, Actinobactéries en rose au milieu de nombreuses autres bactéries en rouge, β -protéobactéries en jaune ; (F), *Cetraria islandica*, présence de nombreuses α -protéobactéries en jaune sur la surface externe du thalle et absence de bactéries au niveau de la couche algale (vert). a) Actinobactéries, b) bactéries, f) hyphes fongiques, m) matrice du sol, p) couche algale [21].

La composition en micro-organismes epi- ou endo-lichéniques varie en fonction de nombreux facteurs extrinsèques et intrinsèques. La distribution des α -proteobactéries au sein du thalle de *Lobaria pulmonaria* varie, par exemple, en fonction de l'emplacement du lichen récolté [30]. La composition en bactéries évolue également au cours du temps comme le montre Cardinale *et al.* Ainsi le nombre de bactéries associées augmente avec l'âge du thalle lichénique, diminue avec l'exposition au soleil et varie en fonction du substrat [31].

Pour étudier la population microbienne associée aux lichens deux types de techniques ont été développés.

c. Identification par approches dépendantes ou indépendantes de la culture

Initialement, les micro-organismes endophytes ou épiphytes sont isolés par des approches dépendantes de la culture. Cela signifie que ces micro-organismes sont extraits de l'organisme hôte par l'utilisation de diverses solutions (eau stérile, eau de mer stérile, solution de NaCl 0,85 % / peptone issus de caséine 1% stérile). Ces solutions sont ensuite mises en culture à différentes dilutions et les différentes colonies qui se développent sont repiquées jusqu'à l'obtention d'une souche bactérienne pure. D'autres méthodes, plus directes, consistent à déposer un morceau de thalle lichénique préalablement rincé directement sur un milieu de culture. Ainsi des bactéries fixatrices d'azote nommées *Azotobacter* ont été isolées par utilisation de milieux dépourvus d'azote. D'autres genres bactériens tels que *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Pseudomonas* et *Actinobacteria*, ont pu être isolés à partir de lichens [32]. L'identification des souches était ensuite réalisée par des méthodes phénotypiques mais depuis une dizaine d'années les méthodes d'identification par comparaison des ITS 16S-23S et de l'ARNr 16S [6,32] sont de plus en plus utilisées. En parallèle, l'utilisation de milieux spécifiques s'est développée dans le but de sélectionner les souches bactériennes comme par exemple les Actinobactéries par addition d'acide nalidixique [6] (résumé par Suzuki et al. [5]).

Dans notre situation, les thalles lichéniques sont soit rincés avec une des solutions précédemment citées dans le but de récolter les bactéries épilichéniques, soit rincés puis broyés et dissous dans cette même solution pour isoler les bactéries endolichéniques [6]. Puis ces solutions sont mises en culture à plusieurs dilutions dans des milieux contenant de l'acide nalidixique dans le but d'orienter l'isolement vers des Actinobactéries.

Depuis les avancées des techniques de séquençage, de nouvelles méthodes indépendantes de la culture se sont développées. Ainsi, grâce à l'utilisation de SSCP (Polymorphisme de Conformation des Simples Brins), DGGE (Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant), ARNr 16S, pyro-séquençage ou encore FISH (Hybridation In Situ en Fluorescence) et CLSM (Microscopie Confocale à Balayage Laser) la caractérisation des souches bactériennes associées aux lichens a beaucoup évolué. En effet, ces techniques permettent d'accéder aux souches non cultivables et ainsi non isolables par les techniques dépendantes de la culture.

d. Relation bactéries-lichens

La nature de la relation entre le thalle lichénique et le bactériobiote associé n'est pas réellement connue. Quelques pistes sont cependant envisageables, avec dans un premier temps un apport en azote de la part du partenaire bactérien. En effet la capacité de fixation de l'azote inorganique (notamment du diazote) est due à l'action d'une enzyme, la nitrogenase qui est encodée par le gène *nifH*. Cette enzyme est dispersée de façon sporadique au sein du domaine des Bactéries. On retrouve par exemple les genres *Azotobacter*, *Azomonas* et *Klebsiella* parmi les γ -protéobactéries, *Azospirillum* et *Gluconacetobacter* parmi les α -protéobactéries, *Thiobacillus* et *Alcaligenes* parmi les β -protéobactéries, *Bacillus* et *Clostridium* parmi les Firmicutes [22]. Au sein des Actinobactéries les seules bactéries diazotrophes étaient initialement limitées au genre *Frankia*. Cependant, comme le décrivent Gtari et al. dans leur review, le gène *nifH* et la capacité de fixation de l'azote ont été observés dans de nombreux autres genres (*Agromyces*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* et *Micromonospora*) [33]. Nombre de ces bactéries sont retrouvées dans le réseau symbiotique lichénique et peuvent ainsi avoir un rôle d'apport en azote pour les autres partenaires principaux (mycobiote et algue verte) qui ne peuvent utiliser que l'azote organique (azote ammoniacal). Cette propriété bactérienne a été étudiée

par les travaux de Liba *et al.* sur l'isolement de bactéries diazotrophes à partir de lichens non-associés à des cyanobactéries. Celles-ci appartiennent au phylum des γ -protéobactéries et produisent d'importantes quantités d'acides aminés qui sont ainsi disponibles pour les autres partenaires [34]. Elles permettent également un apport en minéraux comme le fer ou une meilleure dissolution des phosphates les rendant ainsi disponibles pour les autres partenaires [28,34].

La dégradation du thalle lichénique est aussi liée au bactériobiote. La potentialité d'une activité glucanolytique, cellulolytique et protéolytique a été évoquée par Grube *et al.* [17] tandis que la réutilisation des ressources en azote a été étudiée par Ellis *et al.* [35]. Une étude méta-protéomique réalisée par Eymann *et al.* confirme qu'une grande partie du protéome du microbiote est constitué d'enzymes hydrolytiques indiquant ainsi un rôle dans la dégradation du thalle lichénique [27].

La production d'hormones connues pour moduler la croissance des plantes telles que l'acide indole-3-acétique (IAA), l'éthylène ou encore des dicétopipérazines (impliquées dans le quorum sensing) par les bactéries montre un rôle de régulation de la symbiose par nos partenaires microbiens (Figure 14).

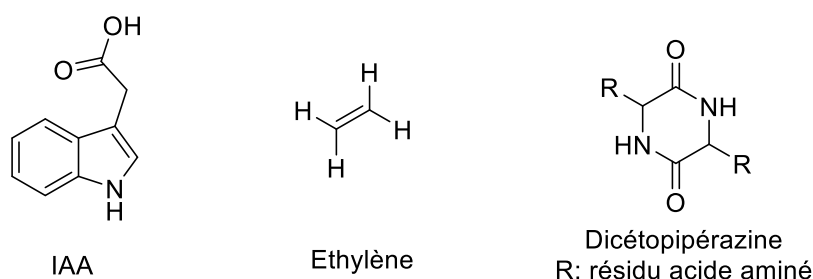


Figure 14 : Structures de composés impliqués dans la régulation de la croissance produits par les bactéries associées aux lichens

Enfin, le bactériobiote aurait un rôle dans la protection du thalle lichénique contre les stress biotique et abiotique. L'étude de Cernava *et al.* sur le caractère antagoniste de ces micro-organismes a montré une activité de la majorité des souches contre des pathogènes de plantes ou de champignons [36]. Elles sont également capables de développer des résistances face à certains composés antibiotiques grâce à la formation de pompes à efflux détectées par métabolomique par Grube *et al.* [28]. Cette méthode a également permis de mettre en évidence des systèmes de résistance aux stress abiotiques tels que la mise en place de pompes à efflux pour les métaux lourds.

L'étude par métabolomique a également détecté plusieurs autres activités bactériennes telles que la production de vitamines, la détoxification de métabolites ainsi que la production de nombreux métabolites secondaires (polyketides, terpénoides, antibiotiques...) [28]. Cette hypothèse est renforcée par la présence de nombreuses souches d'Actinobactéries au sein du réseau symbiotique et dont les capacités de production de métabolites d'intérêt tels que des composés antibiotiques sont largement reconnues. Ces propriétés seront notamment décrites plus loin dans ce manuscrit (B. Les Actinobactéries).

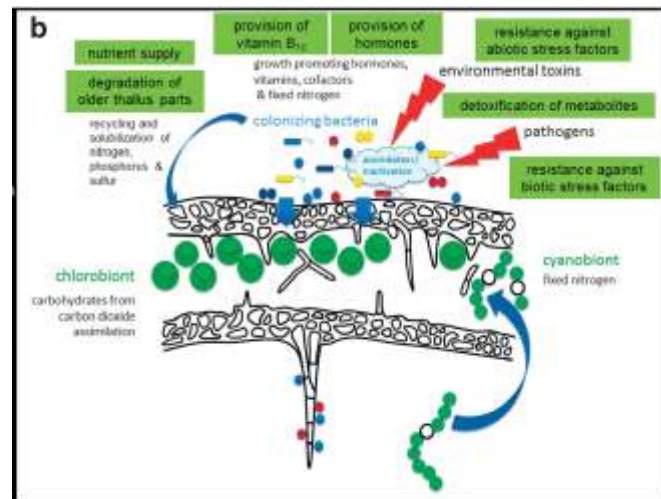


Figure 15 : Schéma synthétique des différentes interactions au sein du réseau symbiotique lichénique [28]

B. Caractérisation du personnage : Actinobactéries

1. Description taxonomique, morphologique et écologique

Les bactéries sont initialement divisées en 25 phyla comme décrits dans le « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology » [37]. Ces groupements de bactéries sont définis en fonction des 7000 espèces bactériennes caractérisées phénotypiquement (Figure 16). Par la suite, l'utilisation de la méthode de séquençage de l'ARNr 16S a permis de proposer de nouveaux phyla [22].

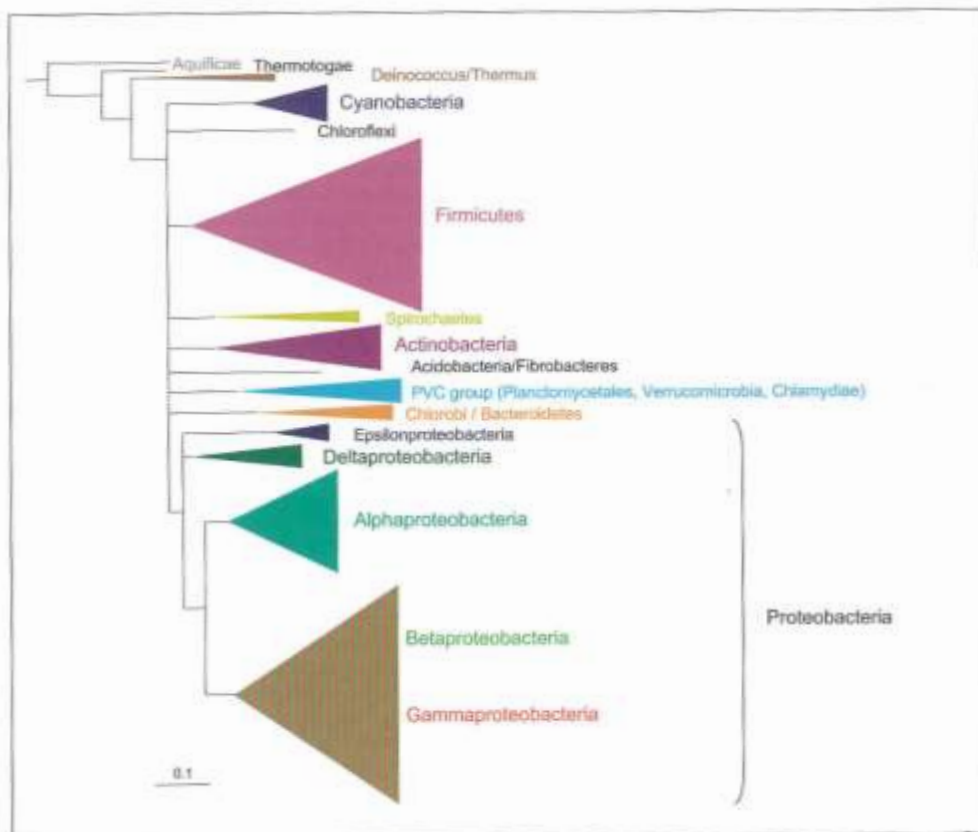


Figure 16 : Phylogénie des Bacteria basée sur 550 séquences du gène de l'ARNr 16S. La largeur des triangles est proportionnelle à la diversité du groupe correspondant. La barre d'échelle représente 10% de différence entre les groupes. [22]

Le phylum des Actinobacteria concerne les bactéries à Gram positif qui possèdent un fort taux de G+C%. Elles ont une morphologie variable allant d'organismes unicellulaires irréguliers (*Micrococcus* et *Arthrobacter*) (Figure 17a et 17b) à des formes mycéliennes à hyphes ramifiés. Ces derniers peuvent soit être fragmentés (*Nocardia*) (Figure 17c), soit rester entiers et très différenciés (*Streptomyces*) (Figure 17d). Elles peuvent également produire des structures de dissémination appelées spores ou conidiophores, ceux-ci sont très utiles pour la taxonomie au sein des Actinobacteria [22,38,39].

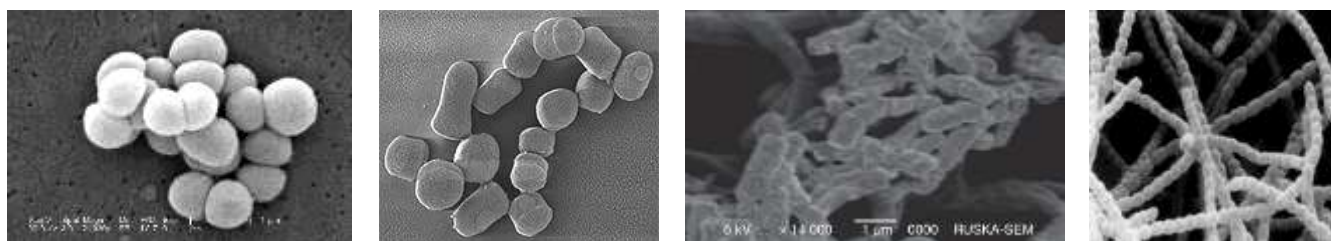


Figure 17: Morphologie des Actinobacteria observée au microscope électronique : a) Cocci de *Micrococcus luteus* ; b) Coccobacilles irréguliers de *Arthrobacter chlorophenolicus* ; c) Hyphes se fragmentant en coccobacilles de *Nocardia levis* ; d) Hyphes permanents de *Streptomyces griseus*

Ces bactéries sont couramment retrouvées dans les sols où elles sont très compétitives du fait de leurs structures de dissémination (hyphes et spores). Elles y jouent un rôle important dans la dégradation des matières organiques et la formation de l'humus [39]. Elles sont mésophiles, préfèrent les milieux humides et elles préfèrent des valeurs de pH autour de la neutralité mais sont capables de résister à des facteurs plus extrêmes [38].

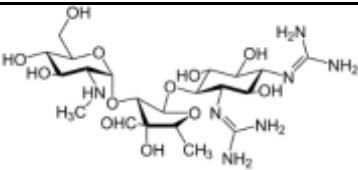
Le phylum des Actinobacteria ne regroupe qu'une seule classe, les Actinobacteria, elle-même divisée en 5 sous-classes (*Acidimicrobiales*, *Rubrobacteriales*, *Coriobacteriales*, *Sphaerobacteriales* et *Actinobacteriales*). Les 4 premières sous-classes ne sont constituées que d'un seul ordre et le plus souvent d'une seule famille, alors que les *Actinobacteriales* sont divisés en deux ordres avec de nombreux sous-ordres et de nombreuses familles [22]. Ainsi le phylum est représenté par 6 ordres et 14 sous-ordres [38].

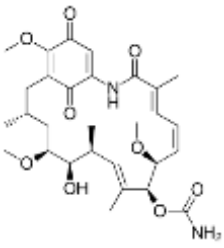
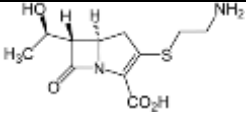
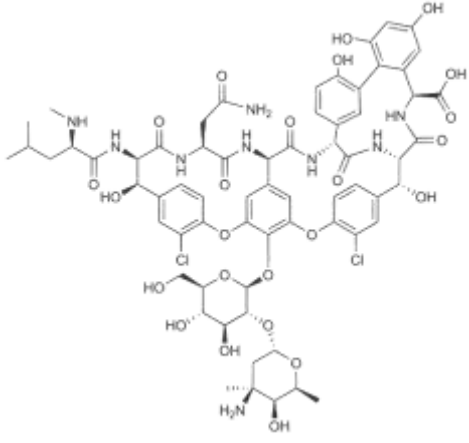
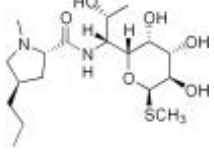
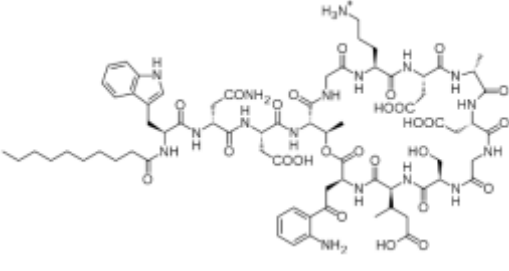
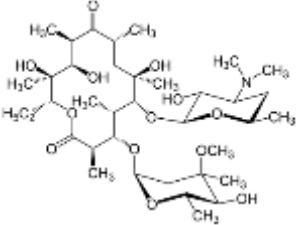
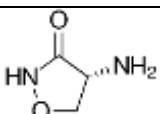
2. Production de métabolites d'intérêt

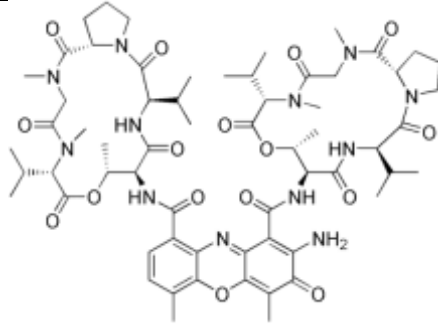
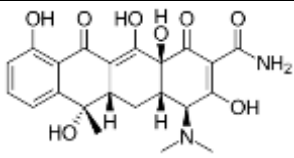
a. Aperçu de la diversité chimique des Actinobactéries

Les Actinobactéries sont connues depuis longtemps comme étant une source de produits bioactifs et en particulier de composés antibiotiques. Entre les années 50 et 70, près de 60% des nouveaux antibiotiques étaient issus d'Actinobactéries, et en grande majorité du genre *Streptomyces*. Aujourd'hui ce nombre est diminué du fait notamment de l'intérêt grandissant pour les champignons filamenteux avec l'étude des espèces endophytiques [40]. Quelques exemples de composés bioactifs produits par des Actinobactéries parmi les plus connus sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Exemples de composés antibactériens issus de cultures d'Actinobactéries

Classe d'antibiotique	Exemple	Structure	Bactérie productrice
Aminoglycoside	Streptomycine		<i>Streptomyces griseus</i> [41]

Ansamycine	Geldanamycine		<i>Streptomyces hygroscopicus</i> [42]
Carbapenem	Thienamycine		<i>Streptomyces cattleya</i> [43]
Glycopeptide	Vancomycine		<i>Amycolatopsis orientalis</i> [44]
Lincosamide	Lincomycine		<i>Streptomyces lincolnensis</i> [45]
Lipopeptide	Daptomycine		<i>Streptomyces roseosporus</i> [44]
Macrolide	Erythromycine		<i>Saccharopolyspora erythraea</i> [44]
Oxazolidinone	Cycloserine		<i>Streptomyces sp.</i> [44]

Polypeptide	Dactinomycine		<i>Streptomyces parvullus</i> [44]
Tetracycline	Tetracycline		<i>Streptomyces aureofaciens</i> [44]

L'ensemble de ces structures montre bien la grande diversité structurale obtenue par production bactérienne. Différentes voies biosynthétiques sont impliquées dans l'obtention de ce types de molécules. Les composés polyketides (macrolides, tetracycline,...), aminoglycosides et peptides sont obtenus respectivement par une voie impliquant des enzymes de type PKS (polyketides-synthases), des glycosyltransferases (GT) ou des synthétases peptidiques non ribosomales (NRPS) [22].

De nombreux autres métabolites spécifiques produits par des Actinobacteria sont bioactifs. Certains d'entre eux ont par exemple des activités insecticides telles que les macrotetrolides [46] (Figure 18a). L'ivermectine, dérivé de l'avermectine, composé produit par *Streptomyces avermitilis* (Figure 18b) est toujours utilisé comme anti-helminthique [47] ce qui a d'ailleurs amené Omura et Campbell à recevoir le prix Nobel de médecine 2015 conjointement avec Youyou Tu pour ses travaux sur l'artémisinine. On retrouve également des composés isolés à partir d'Actinobactéries parmi les antifongiques avec par exemple les polyoxines (Figure 18c) produites par *Streptomyces cacaoi* var *asoensis* [48], la kasugamycine (Figure 18d), macrolide produit par *Streptomyces kasugaensis* [49] ou encore la validamycine A (Figure 18e) obtenue à partir de *Streptomyces hygroscopicus* [50]. Seule l'ivermectine est aujourd'hui utilisée pour la médecine humaine les autres composés cités sont commercialisés au Canada et/ou aux USA en tant que pesticides.

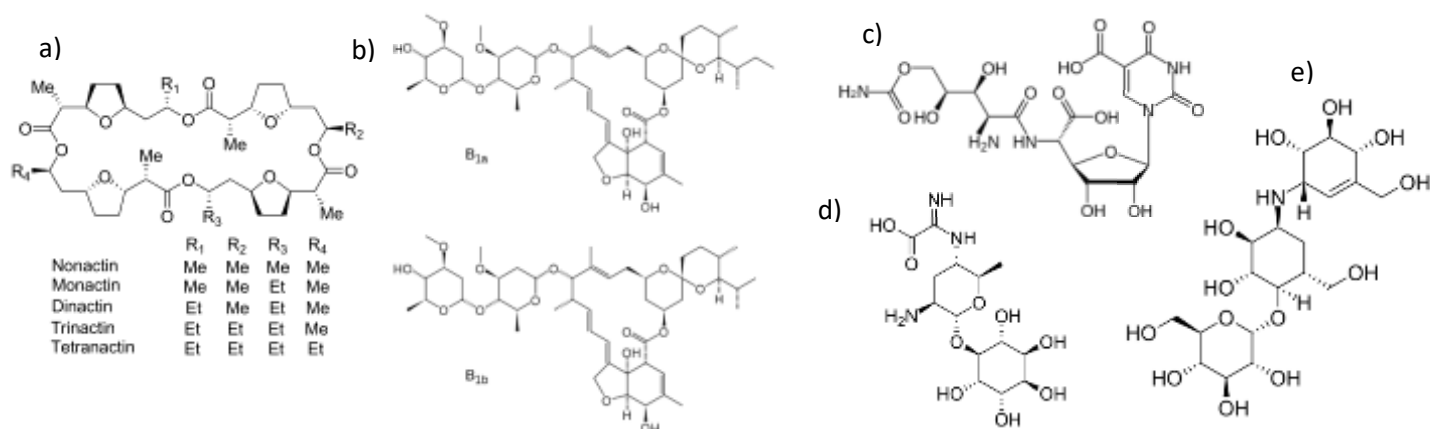
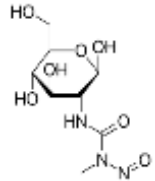
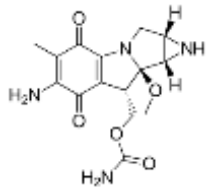
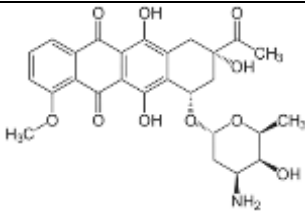
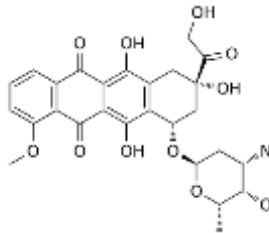
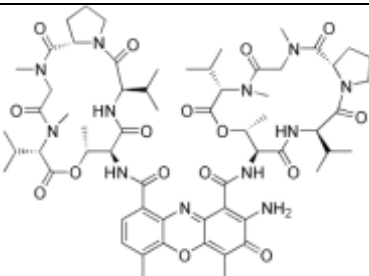


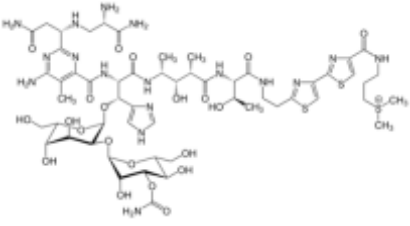
Figure 18 : Exemples de composés bioactifs isolés à partir de culture d'Actinobactéries : a) Macrotetrolides, b) Ivermectine, c) Polyoxine D, d) Kasugamycine, e) Validamycine A.

b. Métabolites cytotoxiques

Ces bactéries présentent également un intérêt majeur dans l'obtention de composés cytotoxiques. Plusieurs traitements anti-cancéreux utilisés aujourd'hui sont initialement obtenus à partir d'Actinobactéries et plus précisément de *Streptomyces*, ils sont répertoriés dans le tableau 2.

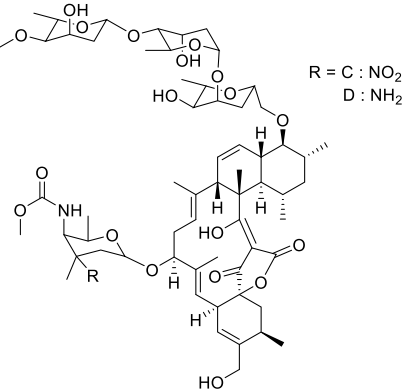
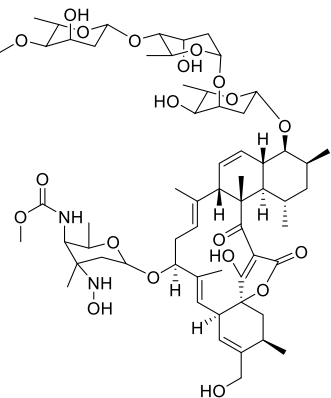
Tableau 2 : Composés antitumoraux obtenus à partir d'Actinobactéries utilisés en chimiothérapie

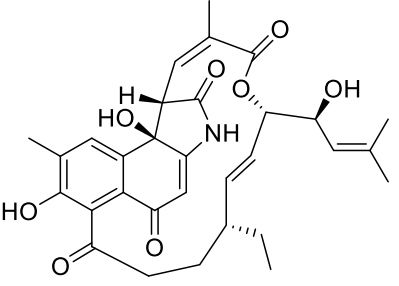
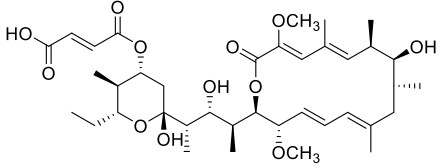
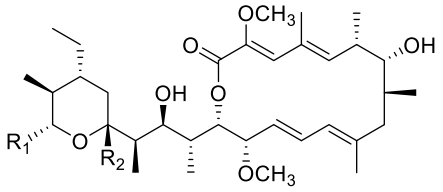
Type d'anticancer	Famille	Composé	Structure	Organisme source
Agent alkylant	Nitroso-urée	Streptozocine		<i>Streptomyces achromogenes</i> [51]
	Antibiotiques aziridines	Mitomycine C		<i>Streptomyces caespitosus</i> [52]
Agents intercalants	Anthracyclines	Daunorubicine		<i>Streptomyces peucetius</i> [53]
		Doxorubicine		<i>Streptomyces peucetius</i> [53]
	Actinomycines	Dactinomycine ou Actinomycine D		<i>Streptomyces parvullus</i> [54]

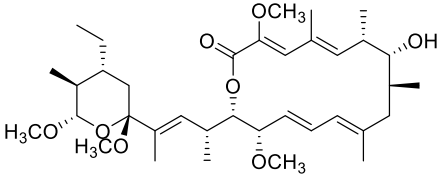
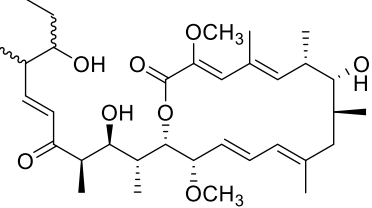
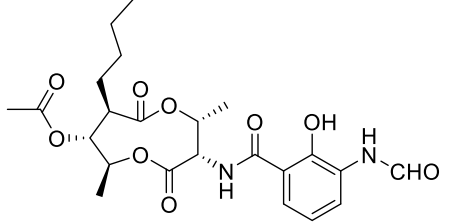
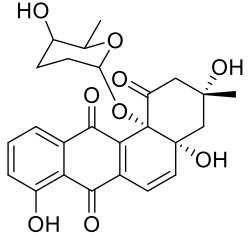
Agent scindant	Glycopeptide	Bléomycine		<i>Streptomyces verticillus</i> [55]
----------------	--------------	------------	--	--------------------------------------

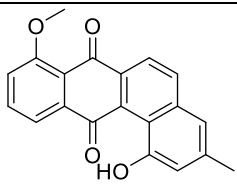
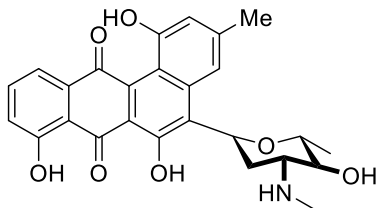
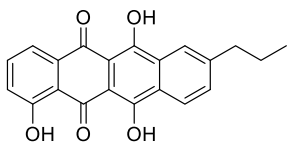
Les composés à activité cytotoxique isolés à partir d'Actinobactéries sont très nombreux, et les souches bactériennes impliquées dans des associations avec d'autres organismes sont toutes aussi concernées par la production de composés anti-cancéreux. Le tableau 3 reporte les composés cytotoxiques obtenus depuis 1997 à partir de cultures d'Actinobactéries associées à d'autres organismes.

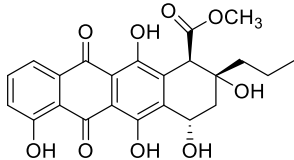
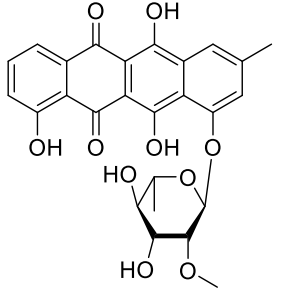
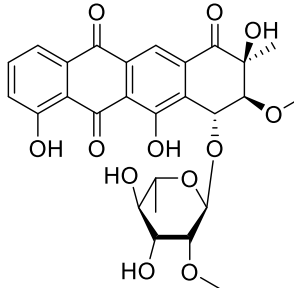
Tableau 3 : Composés cytotoxiques isolés à partir de souches d'Actinobactéries associées

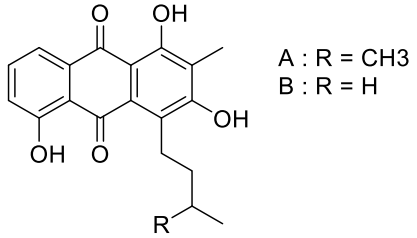
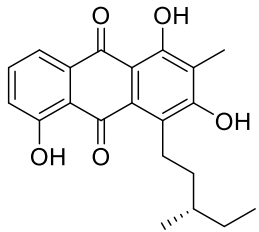
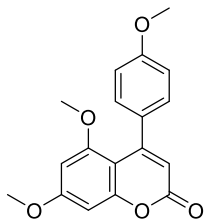
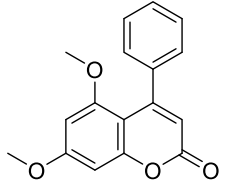
Composé	Famille structurale	Actinobactérie productrice	Association	Ref	Activité/Mécanisme d'action
Lobophorines C et D 	Macrolides	<i>Streptomyces carnosus</i>	Eponge : <i>Hymeniacidon sp</i>	[56]	Hépatome humain 7402 : (C) Cl_{50} = 0,6 $\mu\text{g/mL}$, (D) Cl_{50} = 723,1 $\mu\text{g/mL}$ Lignée cellulaire de cancer du sein humain MDA-MB 435 : (C) Cl_{50} = 61,8 μM, (D) Cl_{50} = 7,5 μM
Lobophorine K 	Macrolide	<i>Streptomyces sp.</i>	Corail : <i>Lophelia pertusa</i>	[57]	MCF-7 : Cl_{50} = 23,0 $\pm$ 8,9 μM MiaPaca-2 : Cl_{50} = 34,0 $\pm$ 85,1 μM THLE-2 : Cl_{50} = 6,3 $\pm$ 8,2 μM Cl_{50} > 42,6 μM sur A-549, HT-29 et HepG2
Divergolide D	Ansa macrolides	<i>Streptomyces sp.</i>	Plante : <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	[58]	LXFA 629L, PANC-1, RXF 486L et Saos-2 : Cl_{50} moyenne = 2,4 μM

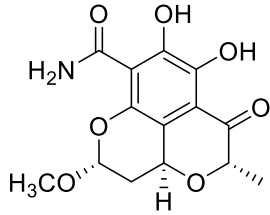
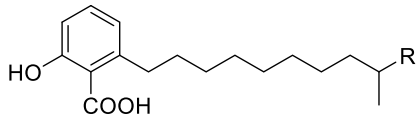
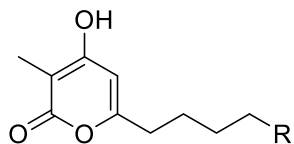
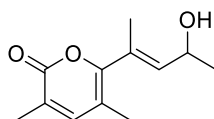
					
24-demethyl-bafilomycin C1 	Macrolide	<i>Streptomyces sp.</i>	Plante : <i>Maytenus hookeri</i>	[59]	P388 : entre 78,1% d'inhibition à 10^{-8} M et 97,9% à 10^{-4} M A-549 : entre 89,4% d'inhibition à 10^{-8} M et 96,9% à 10^{-4} M
24-demethyl-bafilomycin A1 (A) 21-O-methyl-24-demethyl-bafilomycin A1 (B) 19,21-di-O-methyl-24-demethyl-bafilomycin A1 (C)  A : $R_1 = R_2 = OH$ B : $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$ C : $R_1 = R_2 = OCH_3$ 17,18-dehydro-19,21-di-O-methyl-24-demethyl-bafilomycin A1 (D)	Macrolides	<i>Streptomyces sp.</i>	Plante : <i>Maytenus hookeri</i>	[60]	MDA-MB-435 : (A) : $CI_{50} = 4,2$ mM (B) : $CI_{50} = 4,5$ mM (C) : $CI_{50} = 5,5$ mM (D) : $CI_{50} = 3,8$ mM (E) : $CI_{50} = 11,4$ mM

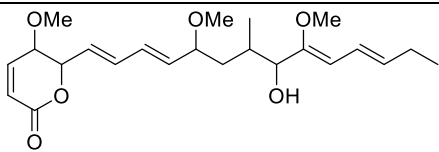
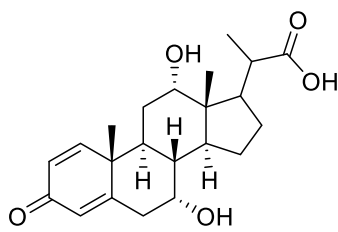
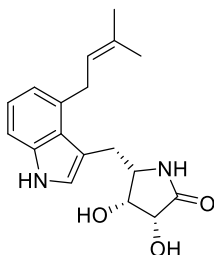
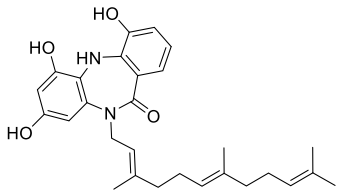
 24-demethyl-bafilomycin D (E) 					
Antimycine A18 	Macrolide	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Plante : <i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	[61]	HepG2 : $CI_{50} = 0,12 \mu\text{g/mL}$ KB : $CI_{50} = 0,92 \mu\text{g/mL}$
Sakyomicin C 	Angucycline	<i>Amycolatopsis sp</i>	Sauterelle : <i>Oxya chinensis</i>	[62]	BGC 823 : $CI_{50} = 11,03 \mu\text{M}$ HepG2 : $CI_{50} = 17,36 \mu\text{M}$ A375 : $CI_{50} = 17,5 \mu\text{M}$ Ghost-R5X4 : $CI_{50} = 14,0 \mu\text{M}$ Non actif sur KB
X-14881 E	Angucycline	<i>Pseudonocardia sp</i>	Fourmi : <i>Apterostigma dentigerum</i>	[63]	HepG2 : $CI_{50} = 36,1 \mu\text{M}$

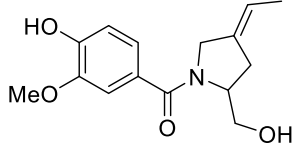
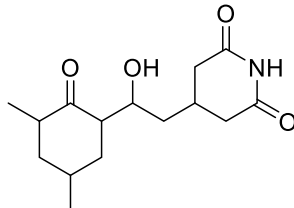
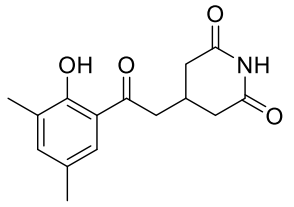
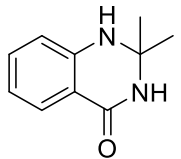
					
Mayamycine 	Angucycline	<i>Streptomyces sp.</i>	Eponge : <i>Halichondria panicea</i>	[64]	HepG2 : $CI_{50} = 0,2 \mu M$ HT-29 : $CI_{50} = 0,3 \mu M$ GXF251L : $CI_{50} = 0,2 \mu M$ LXF529L : $CI_{50} = 0,16 \mu M$ MAXF401NL : $CI_{50} = 0,29 \mu M$ MEXF462NL : $CI_{50} = 0,13 \mu M$ PAXF1657L : $CI_{50} = 0,15 \mu M$ RXF486L : $CI_{50} = 0,33 \mu M$
4,6,11-trihydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione (A)  10β-carbomethoxy-7,8,9,10-tetrahydro-4,6,7α,9α,11-pentahydroxy-9-propyltetracene-5,12-dione (B)	Anthracyclines	<i>Micromonospora sp.</i>	Ascidie : <i>Eudistoma vannamei</i>	[65]	HCT-8 : (A) $CI_{50} = 12,7 \mu M$ (B) $CI_{50} = 6,2 \mu M$

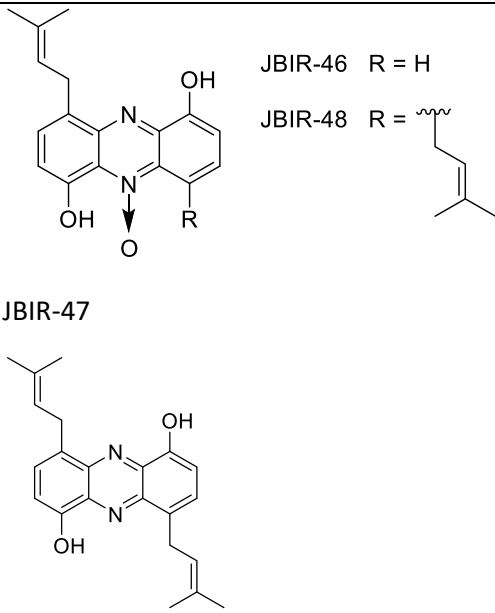
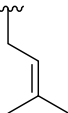
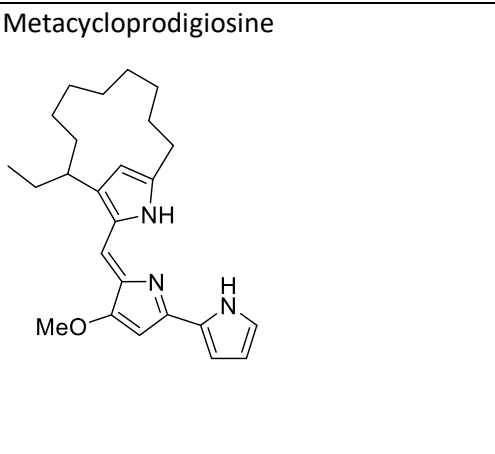
					
Tetracenoquinocine  Aranciamycine 	Anthracyclines	<i>Streptomyces sp.</i>	Eponge : <i>Haliclona sp.</i>	[66]	HeLa : tetracenoquinocine : $CI_{50} = 120 \mu M$ Aranciamycine : $CI_{50} = 2,7 \mu M$ LH-60 : tetracenoquinocine : $CI_{50} = 210 \mu M$ Aranciamycine : $CI_{50} = 4,1 \mu M$
Lupinacidines A et B	Anthraquinones	<i>Micromonospora lupini</i>	Plante : <i>Lupinus angustifolius</i>	[67]	26-L5 (effet anti-invasif) : (A) : $CI_{50} = 0,21 \mu M$ (B) : $CI_{50} = 0,92 \mu M$

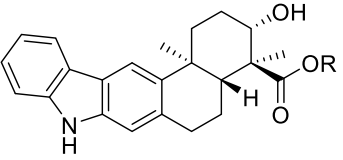
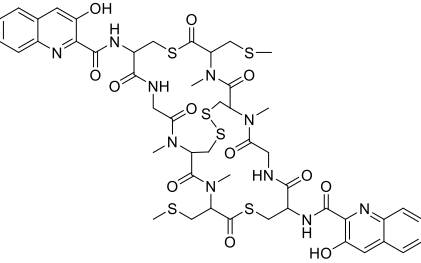
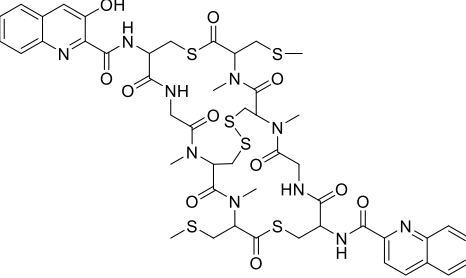
 A : R = CH₃ B : R = H					
Lupinacidine C 	Anthraquinones	<i>Micromonospora lupini</i>	Plante : <i>Lupinus angustifolius</i>	[68]	26-L5 (effet anti-invasif) : Cl ₅₀ = 0,054 µM
5,7-dimethoxy-4-p-methoxyphenylcoumarin  5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin 	4-Arylcoumarines	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Plante : <i>Zingiber officinale</i>	[69]	A 100 µg/mL la 5,7-dimethoxy-4-p-methoxyphenylcoumarin inhibe à 64% la croissance de A427 et la 5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin inhibe à 42% Diminution de l'expression de l'oncoprotéine Bcl-2 dans les cellules A427 de 41,5% et 21,7%
JBIR-58	Dérivé salicylamide	<i>Streptomyces sp.</i>	Eponge : <i>Demospongiae</i>	[70]	HeLa : Cl ₅₀ = 28 µM

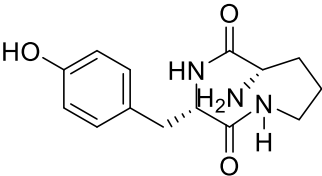
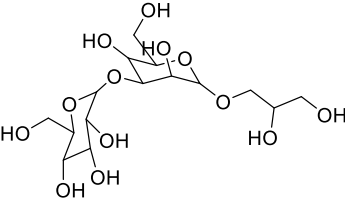
					
Salaceynes A et B  A : R = CH₃ B : R = CH₂CH₃	Acides 6-alkylsalicyliques	<i>Streptomyces laceyi</i>	Plante : <i>Ricinus communis</i>	[71]	SKBR3 : (A) : Cl ₅₀ = 3,0 µg/mL (B) : Cl ₅₀ = 5,5 µg/mL
Violapyrones H, I, B et C  R = H :  I :  B :  C : 	Dérivé α-pyrone	<i>Streptomyces sp.</i>	Etoile de mer : <i>Acanthaster planci</i>	[72]	Activité testée sur 10 lignées cellulaires cancéreuses, GI ₅₀ obtenues pour les 4 composés sont de l'ordre du microgramme par millilitre
Norcardiatone A 	2-pyranone	<i>Nocardiopsis sp.</i>	Plante : <i>Aegiceras corniculatum</i>	[73]	HeLa : 10 µg/mL, 2,73% d'inhibition et 7,39% à 20 µg/mL
Pterocidin	δ-lactone	<i>Streptomyces hygroscopus</i>	Fougère : <i>Pteridium aquilinum</i>	[74]	NCI-H522 : Cl ₅₀ = 2,9 µM OVCA-3 : Cl ₅₀ = 3,9 µM

					SF539 : $Cl_{50} = 5,0 \mu M$ LOX-IMVI : $Cl_{50} = 7,1 \mu M$
Bendigoles D 	Stéroïdes	<i>Actinomadura sp.</i>	Eponge : <i>Suberites japonicus</i>	[75]	L929 : $Cl_{50} = 30 \mu M$
Amycolactame 	Alcaloïde indolique	<i>Amycolatopsis sp</i>	Eponge : <i>Hymeniacidon sp</i>	[76]	SNU638 : $Cl_{50} = 0,8 \mu M$ HCT116 : $Cl_{50} = 2,0 \mu M$ A546 : $Cl_{50} = 13,7 \mu M$ K562 : $Cl_{50} = 9,6 \mu M$ SK-HEP1 : $Cl_{50} = 8,3 \mu M$ Non actif sur MDA-MB231
Diazepinomicin 	Alcaloïde dibenzodiazépine	<i>Micromonospora sp</i>	Eponge : <i>Aplysine aerophoba</i>	[77]	Antiprotéase contre rhodesain : $Cl_{50} = 98 \mu M$ et cathepsine L : $Cl_{50} = 72,4 \pm 5,3 \mu M$ [78]
Barmumycine	Alcaloïde pyrrolidinique	<i>Streptomyces sp.</i>	Ascidie	[79]	12 lignées cellulaires cancéreuses testées, GI_{50} , TGI et LC_{50} mesurés

					pour chacune et valeur de l'ordre du micromolaire
Cycloheximide  Actiphenol 	Alcaloïde pipéridinique	<i>Streptomyces sp</i>	Plante : <i>Arnica montana</i>	[80]	ND
2,3-dihydro-2,2-diméthyl-4(1H)-quinazolinone 	Quinazolinone	<i>Streptomyces sp.</i>	Plante : <i>Lychnophora ericoides</i>	[81]	MDA-MB435 : $CI_{50} = 1,86 \mu\text{g/mL}$ HCT-8 : $CI_{50} = 1,10 \mu\text{g/mL}$ SF-295 : $CI_{50} = 2,20 \mu\text{g/mL}$ HL-60 : $CI_{50} = 1,76 \mu\text{g/mL}$
JBIR-46, -47 et -48	Isoprénoïdes	<i>Streptomyces sp.</i>	Eponges	[82]	HL-60 : JBIR-46 : $CI_{50} = 189 \mu\text{M}$ JBIR-47 : $CI_{50} = 226 \mu\text{M}$ JBIR-48 : $CI_{50} = 96 \mu\text{M}$

 JBIR-46 R = H JBIR-48 R =  JBIR-47					
Metacycloprodigiosine 	Polypyrrole	<i>Saccharopolyspora sp.</i>	Eponge : <i>Mycale pulmose</i>	[83]	P388 : $CI_{50} = 0,007 \mu M$ HL60: $CI_{50} = 0,022 \mu M$ A-549 : $CI_{50} = 0,11 \mu M$ BEL-7402: $CI_{50} = 0,028 \mu M$ SPCA4: $CI_{50} = 7,52 \mu M$ Inhibition des H^+-ATPase vacuolaires
Xiamycin et Xiamycin methyl-ester	Indolesesquiterpene	<i>Streptomyces sp.</i>	Plante : <i>Bruguiera gymnorhiza</i>	[84]	Moyenne sur un panel de lignées cellulaires Xiamycin : $CI_{50} > 30 \mu M$

 A : R = H B : R = CH₃					Xiamycin methyl-ester : Cl ₅₀ = 10,13 µM
Coronamycin Constitué de tyrosine, méthionine, leucine et 2 autres composés dérivés des acides aminés classiques	Peptide	<i>Streptomyces sp.</i>	Plante : <i>Monstera sp</i>	[85]	HMEC : Cl₅₀ = 5-10 µg/mL BT20 : Cl₅₀ = 5-10 µg/mL
Thiocoraline 	Depsipeptide	<i>Micromonospora sp.</i>	Corail	[86]	P388 : Cl₅₀ = 0,002 µg/mL A549 : Cl₅₀ = 0,002 µg/mL HT-29 : Cl₅₀ = 0,01 µg/mL MEL-28 : Cl₅₀ = 0,002 µg/mL Inhibition de l'ADN polymerase α par bisintercalation [87]
22'-Deoxythiocoraline 	Depsipeptide	<i>Verrucosipora sp.</i>	Eponge : <i>Chondrilla caribensis</i>	[88]	A549 : Cl₅₀ = 0,13 µM Inhibition de l'ADN polymerase α par bisintercalation [87]

Dipeptide cyclique 	Dipeptide cyclique	<i>Streptomyces sp.</i>	Plante : <i>Heritiera littoralis</i>	[61]	SMMC-7721 : $Cl_{50} = 60 \mu\text{g/mL}$
1-<i>O</i>-acyl-3-[α-glucopyranosyl-(1-3)-(6-<i>O</i>-acyl-α-mannopyranosyl)]glycerol 	Glycoglycérolipides	<i>Microbacterium sp.</i>	Eponge : <i>Halichondria panicea</i>	[89]	ND

On peut constater que les Actinobactéries productrices de composés cytotoxiques les plus étudiées sont les *Streptomyces* puis les *Micromonospora*. On retrouve ensuite deux souches d'*Amycolatopsis*, une *Pseudonocardia*, une *Nocardiopsis*, une *Actinomadura*, une *Saccharopolyspora*, une *Verrucosipora* et une *Microbacterium*. La plupart du temps ces microorganismes ont été isolés à partir d'organismes marins (éponges, ascidies, corail...) ou de plantes, deux souches ont également été isolées à partir d'insectes (fourmi et sauterelle).

Parmi les 50 composés cytotoxiques isolés à partir d'Actinobactéries impliquées dans des associations avec d'autres organismes présentés ci-dessus, la famille chimique la plus représentée est celle des polyphénols avec 3 angucyclines, 4 anthracyclines, 3 anthraquinones, 2 coumarines et 3 dérivés salicyliques. On trouve également 12 alcaloïdes, 11 macrolides, 4 dérivés peptidiques, 6 pyrones, 1 stéroïde et 1 glycérolipide. Cette diversité chimique montre bien la capacité de production de métabolites d'intérêt par ce type de bactéries.

De manière générale, les mécanismes d'action de ces composés ne sont pas décrits. Cependant, on constate des activités très intéressantes pour plusieurs composés comme la thiocoraline dont la CI_{50} sur les lignées cellulaires P388, A549, HT-29 et MEL-28 est de l'ordre du nanomolaire. Les autres molécules présentées ont des activités cytotoxiques moyennes avec des CI_{50} de l'ordre du micromolaire ou de la dizaine de micromolaire.

3. Rôle en biotechnologie

Les Actinobactéries sont également très utilisées pour leur intérêt biotechnologique. Leur important bagage en enzymes de type PKS ou NRPS, qui induisent la production de nombreux composés bioactifs, en fait de véritables usines à métabolites spécifiques. Plusieurs caractéristiques en font de bons candidats pour le génie métabolique comme par exemple leur fort taux en GC et leur capacité à exprimer de longues séquences de gènes (comme les PKS). Cette capacité en fait des organismes plus compatibles et plus appropriés pour le transfert de gènes hétérologues. Ces bactéries sont également de véritables plateformes biosynthétiques de par la présence de nombreuses voies de biosynthèse et donc la présence de nombreux intermédiaires et métabolites intracellulaires ainsi que leur capacité à réaliser de délicates modifications structurales. Ce sont également des micro-organismes très résistants aux agressions biologiques (phages) ou chimiques (antibiotiques). Enfin les procédés de fermentation industriels des Actinobactéries ainsi que les techniques de séparation sont très bien décrits [90].

L'utilisation de ces bactéries en biotechnologie peut être réalisée à différents desseins, notamment dans le but d'augmenter la production de métabolites d'intérêt. Dans un premier temps la souche la plus productive est sélectionnée puis elle est modifiée jusqu'à optimisation de la biosynthèse. La production peut être améliorée de différentes manières : augmentation de l'apport en précurseurs, inhibition des voies de synthèse en compétition, surexpression des gènes impliqués dans la biosynthèse, expression de gènes de biosynthèse hétérologues, manipulation des gènes de régulation (surexpression des gènes de régulation positive et inhibition des gènes de régulation négative) [9]. Dans un second temps les manipulations biotechnologiques permettent de réaliser de nouvelles dérivatisations amenant à une plus grande diversité structurale. La technique la plus utilisée est alors la mutasynthèse par apport de précurseurs modifiés et modification de l'expression de certains gènes [9].

Les Actinobactéries les plus utilisées dans ce domaine sont encore les *Streptomyces* avec l'exemple le plus reconnu qui est probablement celui de *Streptomyces avermitilis* avec la production des avermectines (Figure 19), composés insecticides et anti-helminthiques. L'ivermectine a tout d'abord été identifiée à partir d'une souche de *S. avermitilis* MA-4680 puis de nombreux dérivés obtenus par réduction de la double liaison 22,23 de l'ivermectine ont été synthétisés avec notamment l'ivermectine. Aujourd'hui plusieurs études sur des souches recombinantes de *S. avermitilis* mènent à une production de l'ivermectine par fermentation réduisant ainsi les coûts de fabrication [91].

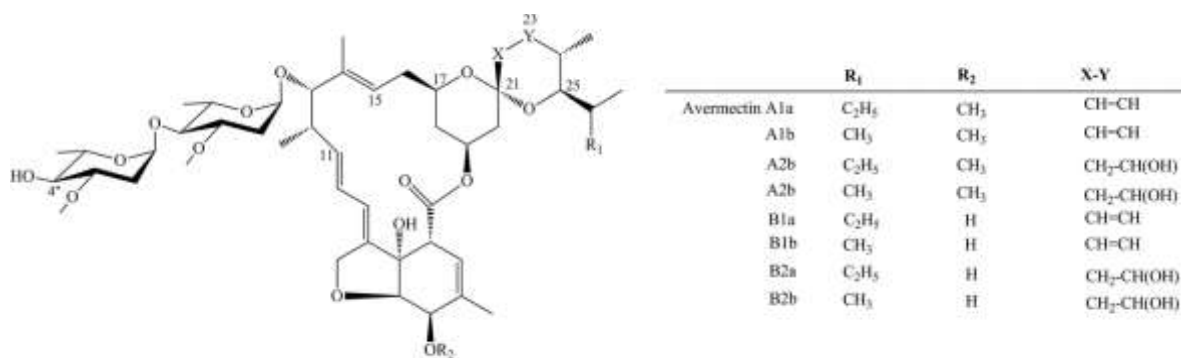


Figure 19 : Structures des avermectines [91]

4. Particularité des Actinobactéries associées aux lichens

La recherche d'Actinobactéries au sein de l'association lichénique offre une nouvelle voie vers la découverte de nouvelles souches potentiellement productrices de composés bioactifs et possédant un intérêt biotechnologique. Les travaux concernant l'isolement global des bactéries associées aux lichens mettent déjà en évidence la forte proportion d'Actinobactéries au sein du microbiome lichénique [32,92,93]. Les plus anciennes Actinobactéries fossilisées sont même décrites à partir du lichen *Chlorolichenomycites salopensis*, lichen fossilisé datant du Dévonien supérieur, elles sont observées par microscopie électronique à balayage [29]. Dès 2005, González *et al.* orientent leurs travaux sur la sélection des souches d'Actinobactéries en utilisant un milieu de culture spécifique des Actinomycetes enrichi en acide nalidixique, associé à un traitement par la chaleur avant la culture [94]. Les familles les plus représentées sont alors les Streptomycetaceae, les Micromonosporaceae, les Pseudonocardiaceae et les Thermomonosporaceae. Delphine Parrot *et al.* ont également réalisé l'isolement spécifique d'Actinobactéries en utilisant divers milieux spécifiques comme le Marine Agar, l'Actinomycete Isolation Agar (AIA) et le milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) supplémenté en acide nalidixique et cycloheximide. Ces travaux ont permis l'isolement de 247 souches soit 101 OTU dont 51 Actinobactéries. Les familles identifiées ici étant : Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Gordoniaceae, Micrococcaceae, Mycobacteriaceae, Nocardioideae, Promicromonosporaceae, Pseudonocardiaceae, Sanguibacteraceae et Streptomycetaceae [6].

L'étude des Actinobactéries associées aux lichens a ainsi permis l'identification de plusieurs nouvelles souches appartenant à ce phylum. On peut par exemple citer *Actinomycetospora rishiriensis* sp. nov. [95], ou *Frondihabitans cladoniiphilus* sp. nov. isolée pour la première fois à partir du thalle de *Cladonia arbuscula* [96] ou encore *Actinomycetospora iriomotensis* sp. nov. [97].

Dans l'optique d'étudier les capacités de biosynthèse de composés d'intérêt par les Actinobactéries associées aux lichens, des recherches des gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires par la voie des PKS et NRPS ont été réalisées. L'étude de González *et al.* a notamment détecté la présence des gènes PKS-I pour 62,6 % des 337 souches testées, 64,7 % pour le gène PKS-II et 58,5 % pour le gène NRPS [94]. De la même manière, Parrot *et al.* montrent que 45,8 % des OTU isolées étaient positives pour PKS-I et 34,7 % pour PKS-II [6]. Ces résultats démontrent le fort potentiel biosynthétique des souches isolées.

Concernant les métabolites spécifiques réellement identifiés à partir de souches d'Actinobactéries isolées à partir de lichens, très peu sont décrits. Ils sont notamment listés dans la review de Suzuki *et al.* [5]. On peut citer les acides actinoplaniques A et B (Figure 20-1), brevetés en 1997 pour leur activité inhibitrice de la farnésyl-transférase et de la farnésylation de la protéine oncogène Ras. Ils ont été obtenus à partir de la souche *Actinoplanes sp.* ATCC55532 provenant d'un lichen arboricole non identifié [98]. L'uncialamycine (Figure 20-2) a également été isolée à partir de *Streptomyces uncialis* provenant du lichen *Cladonia uncialis*. Cette molécule a d'importantes propriétés antibiotiques et cytotoxiques [99] notamment expliquée par un réarrangement de Bergman de la molécule formant un radical qui va cliver l'ADN [100]. Plus récemment, un dérivé de ce composé, l'unciaphénol, a été isolé à partir de la même souche *S. uncialis*, ce dernier a montré une activité anti-virale contre le virus VIH-1 [101]. Cette même souche bactérienne a mené à l'identification des Cladoniamides A-G dont l'une d'entre elles, la Cladoniamide G (Figure 20-5) présente des propriétés cytotoxiques sur la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 [102]. JBIR-88 (Figure 20-3), qui est une molécule de type 1,1-dichlorocyclopropane-containing angucycline et JBIR-89 (Figure 20-4) qui est un butenolide, sont tous les deux extraits d'une souche de *Streptomyces sp.*. JBIR-88 présente une activité cytotoxique significative sur les lignées HeLa et ACC-MESO-1 [103]. Des aminocoumarines ont également été obtenues à partir de l'extrait d'une souche *Streptomyces* L-4-4, isolée à partir du lichen *Cladonia gracilis*. Il s'agit des coumabiocines A-F (Figures 20-6 et 20-7) ainsi que des composés antibiotiques connus novobiocine et isonovobiocine. Les coumabiocines A-E ont également démontrées des propriétés antibiotiques contre une souche de *Streptomyces* 85E [104].

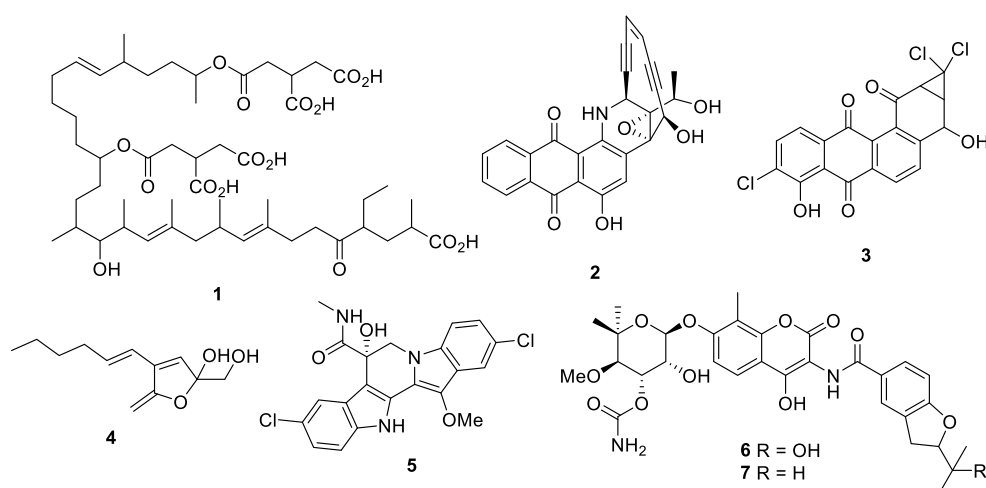


Figure 20: Structures de composés isolés d'Actinobactéries associées aux lichens : 1 : Acide actinoplanique B, 2 : Uncialamycine, 3 : JBIR-88, 4 : JBIR-89, 5 : Cladoniamide G, 6 : Coumabiocine A, 7 : Coumabiocine B

Au sein de notre laboratoire, les profils chimiques de deux souches bactériennes associées aux lichens ont été étudiés et de nombreux composés issus de leur culture ont pu être isolés. La première souche est appelée **MOLA1488** et est identifiée comme étant *Streptomyces cyaneofuscatus*, isolée du lichen *Lichina confinis*. A partir de sa culture 8 composés ont pu être identifiés : 2 dicétopipérazines (cyclo (L-Leu-L-Pro) et cyclo (L-Phe-L-Pro)), un dérivé de l'indole (3-(hydroxyacétyl) indole), un dérivé de la tryptamine (*N*-acétyl- β -oxotryptamine), un dérivé de la dactinomycine (*N*-Me-dactinomycine), l'acide usnique et un composé nouvellement décrit, la cyaneodimycine (Figure 21).

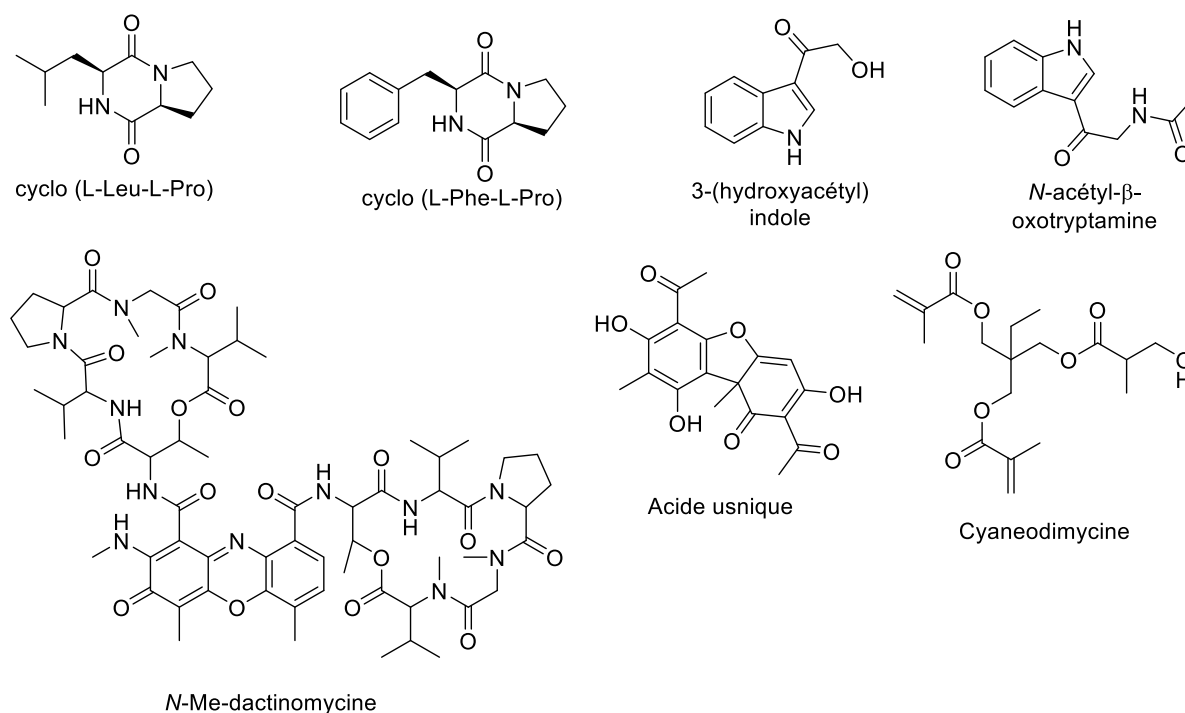


Figure 21 : Structures des composés isolés à partir de la souche **MOLA1488**

La seconde souche bactérienne étudiée est appelée **MOLA1416**. Elle est identifiée comme étant *Chelativorans intermedius* ou *Mycoplana ramosa* et elle a été isolée à partir du lichen *Lichina pygmaea*. L'étude du profil chimique de cette souche a permis l'identification de 2 composés : le 6-méthoxy-2-méthyl-3-heptylprodiginine et une dicétopipérazine (cyclo (L-Leu-L-Pro)) (Figure 22).

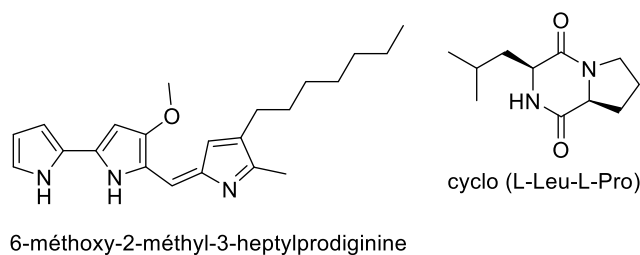


Figure 22 : Structures des composés isolés à partir de la souche **MOLA1416**

5. Focus sur le genre *Nocardia*

a. Description taxonomique, morphologique et écologique

La souche bactérienne sélectionnée pour réaliser notre étude a été identifiée comme appartenant au genre *Nocardia* qui fait partie du phylum des Actinobacteria.

Phylum : Actinobacteria

Classe : Actinobacteria

Sous-classe : Actinobacteridae

Ordre : Actinomycetales

Sous-ordre : Corynebacterineae

Famille : Nocardiaceae

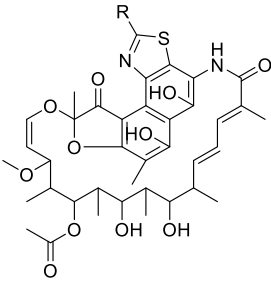
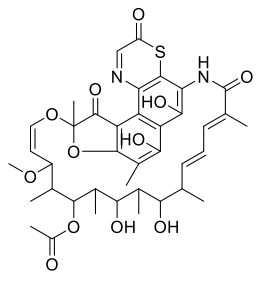
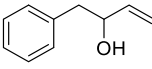
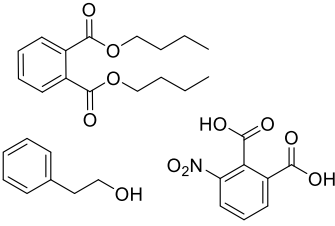
Genre : *Nocardia*

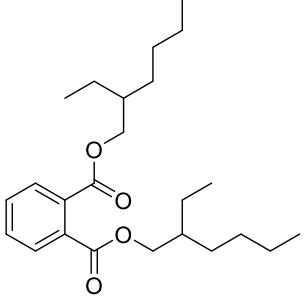
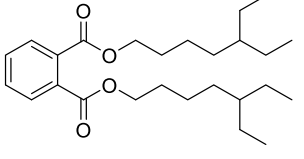
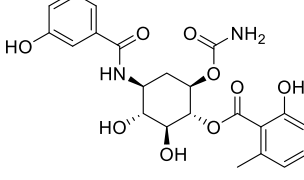
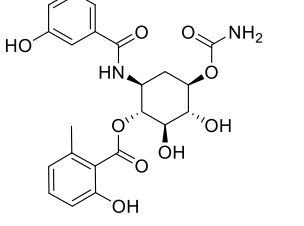
Ce sont des bactéries aérobies strictes, catalases +, formant des filaments végétatifs ramifiés pouvant se fragmenter donnant ainsi des batonnets. Plusieurs espèces de *Nocardia* sont connues pour leur pathogénicité c'est notamment le cas de *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica*, *N. nova*... responsables de nocardioses. Les infections à *Nocardia* touchent principalement les patients immuno-déprimés et elles se manifestent sous des formes pulmonaires, généralisées ou cutanées pouvant être mortelles [105]. Elles sont principalement isolées du sol et parfois de l'eau, de l'air, des insectes et des plantes [106].

b. Composés isolés à partir de culture de *Nocardia*

De par leur intérêt en terme de potentiel de production de composés bioactifs, biotechnologique et pathologique, plusieurs études ont été réalisées sur les métabolites secondaires produits par des souches du genre *Nocardia*. Les composés identifiés par la plupart de ces études ont été résumés par Luo *et al.* [107]. On peut y ajouter ces quelques composés présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Composés produits par des souches de *Nocardia* non décrits dans la review de Luo et al.

Composé	Souche	Activité	Référence
Rifamycines P et Q  P : R = H Q : R = CH₂OH Rifamycine Verte 	<i>Nocardia mediterranea</i>	ND	[108]
1-phenylbut-3-ene-2-ol  phenylethyl alcohol dibutyl phthalate 1,2-benzenedicarboxylic acid, 3-nitro 	<i>N. levis</i> MK-VL_113	Antibiotique sur 14 souches bactériennes avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) entre 10 et 100 µg/mL Antifongique sur 9 souches avec une CMI entre 20 et 250 µg/mL	[109]
bis-(2-ethylhexyl) phthalate (A)	<i>N. levis</i> MK-VL_113	Antibiotiques testés sur 13 souches bactériennes, (A) CMI entre 30 et 175 µg/mL (B) CMI entre 50 et 225 µg/mL	[110]

 bis-(5-ethylheptyl) phthalate (B) 		Antifongiques sur 9 souches (A) CMI entre 40 et 300 µg/mL (B) CMI entre 60 et 400 µg/mL	
Nabscessin A  Nabscessin B 	<i>Nocardia abscessus IFM 10029</i>	Antifongiques contre <i>Cryptococcus neoformans</i> Nabscessin A : Cl₅₀ = 32 µg/mL Nabscessin B : Cl₅₀ = 16 µg/mL	[111]

La plupart des composés isolés à partir de souches de *Nocardia* présentent des propriétés antibiotiques mais on retrouve également de nombreux sidérophores. Parmi les 60 composés listés près de la moitié (28) ont montré une activité cytotoxique ou antitumorale ce qui témoigne de l'importance de l'étude des métabolites issus de *Nocardia* dans la recherche de nouveaux composés bioactifs. Quelques structures de ces composés actifs sont présentées dans la figure 23 illustrant ainsi la diversité structurale obtenue à partir des souches de *Nocardia*.

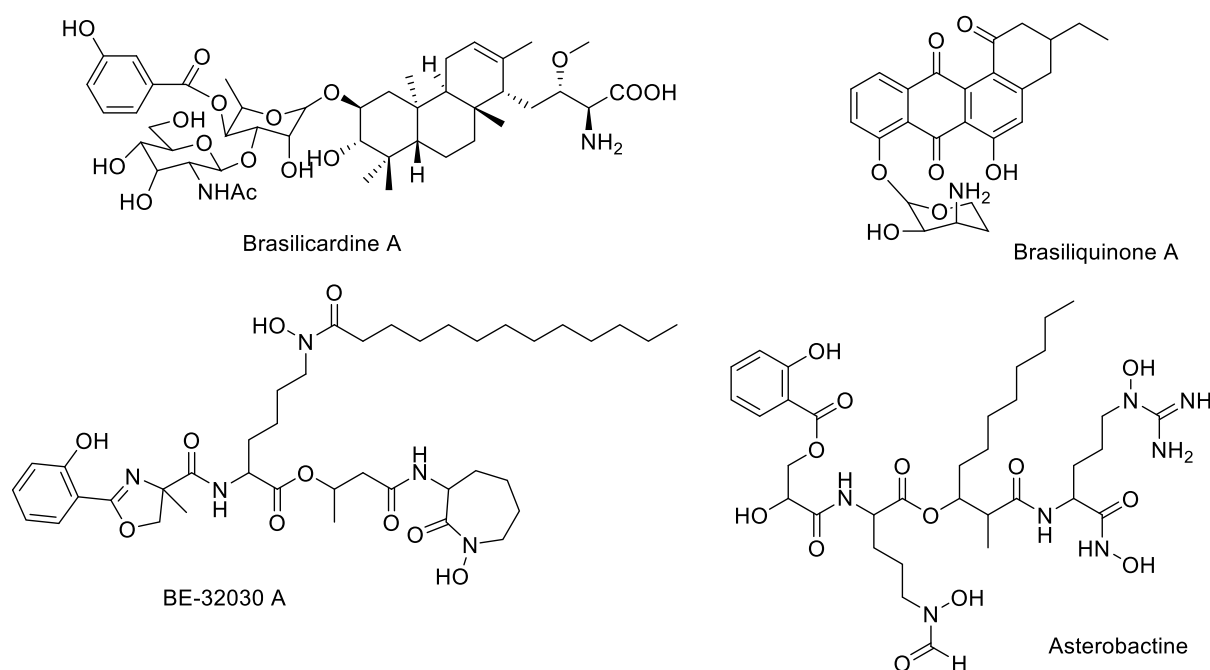


Figure 23 : Exemples de structures de composés cytotoxiques ou antitumoraux isolés à partir de culture de *Nocardia* [107].

C. Conclusion

Dans ce contexte, il paraît évident que l'organisme symbiotique lichénique a un intérêt majeur en tant que nouvelle niche écologique. L'abondante diversité de micro-organismes retrouvés au sein du thalle lichénique en est la preuve. De plus, les souches bactériennes endolichéniques représentent de nouvelles souches productrices de composés d'intérêt comme le montrent les précédents travaux d'études bactériochimiques réalisées.

Ainsi à l'origine de cette étude, 247 souches bactériennes, dont 51 Actinobactéries, isolées à partir de 3 lichens marins/maritimes et d'un lichen terrestre ont été criblées pour la recherche d'extraits cytotoxiques [6]. Une souche d'Actinobactérie, une *Nocardia sp.* isolée du lichen *Collema auriforme*, a montré une activité très intéressante sur la lignée cellulaire cancéreuse B16 (mélanome murin) avec une CI_{50} à $23 \pm 3 \mu\text{g/mL}$. Ces résultats nous ont poussés à étudier plus en détail le profil chimique de cette souche dans le but d'identifier les composés responsables de cette activité. Ce sont ces travaux qui seront décrits dans la partie 3 de ce chapitre du manuscrit.

Scène 2 : Optimisation de culture de souches bactériennes isolées de lichen

A. Intrigue et exposition de l'étude

L'intérêt de la culture de ces souches bactériennes isolées à partir de lichen a été précédemment démontré dans la première partie de ce chapitre. Le grand nombre de composés bioactifs obtenus à partir de la fermentation de ces souches ainsi que le potentiel biotechnologique qu'elles représentent, démontrent la nécessité d'une étude plus étoffée sur ce type d'organismes.

Cette partie présente les travaux d'optimisation des conditions de culture de la souche **DP94** préalablement sélectionnée.

Tout d'abord nous avons réalisé une optimisation préliminaire qui nous a permis de sélectionner le milieu et la durée de culture optimaux pour la production de composés cytotoxiques. Nous nous sommes ainsi appuyés sur l'approche « One Strain / Many Compounds » (OSMAC) qui consiste à modifier les différents paramètres de culture d'un micro-organisme (milieu, température, etc...) pour faire varier la production bactérienne [112]. Bode *et al.* ont ainsi décrit la culture de 6 souches de micro-organismes différents pour lesquelles ils ont fait varier les paramètres, ce qui leur a permis d'isoler une centaine de composés appartenant à 25 classes structurales différentes. Si on regarde par exemple le cas de la souche *Streptomyces* sp Gö 40/14, sur les 12 composés obtenus, 3 ne sont isolés qu'à partir de conditions de culture particulières. L'importance de la durée de culture a également été démontrée par Roullier *et al.* sur des souches de *Penicillium*. L'obtention d'extraits fongiques à différents moments de la culture leur a ainsi permis de mettre en évidence de nouveaux composés [113]. Ces études démontrent bien la puissance de ce type de méthode pour découvrir de nouveaux métabolites d'intérêt.

Les extraits que nous avons obtenus ont ensuite été testés pour leur activité cytotoxique sur deux lignées cellulaires, une cancéreuse (B16) issue de mélanome murin et une non cancéreuse (HaCaT) issue de kératinocytes humains.

Des essais de culture à grande échelle ont ensuite été réalisés pour confirmer l'optimisation préliminaire. Suite à l'acquisition d'un bioréacteur, l'optimisation a été poursuivie par la culture en bioréacteur de gros volumes.

Les cultures réalisées n'ont pas permis d'identifier les composés responsables de l'activité cytotoxique, un plan d'expérience a alors été élaboré pour effectuer une optimisation secondaire. Les paramètres de culture que nous avons fait varier sont alors au nombre de quatre : le pH du milieu, la température, la vitesse d'agitation et le pourcentage d'inoculum de pré-culture utilisé pour ensemencher le milieu. Les extraits ont également été testés pour leur activité cytotoxique et les résultats ont été analysés par un test statistique de type ANOVA dans le but de définir les conditions de culture optimales pour la production de composés cytotoxiques (Figure 24).

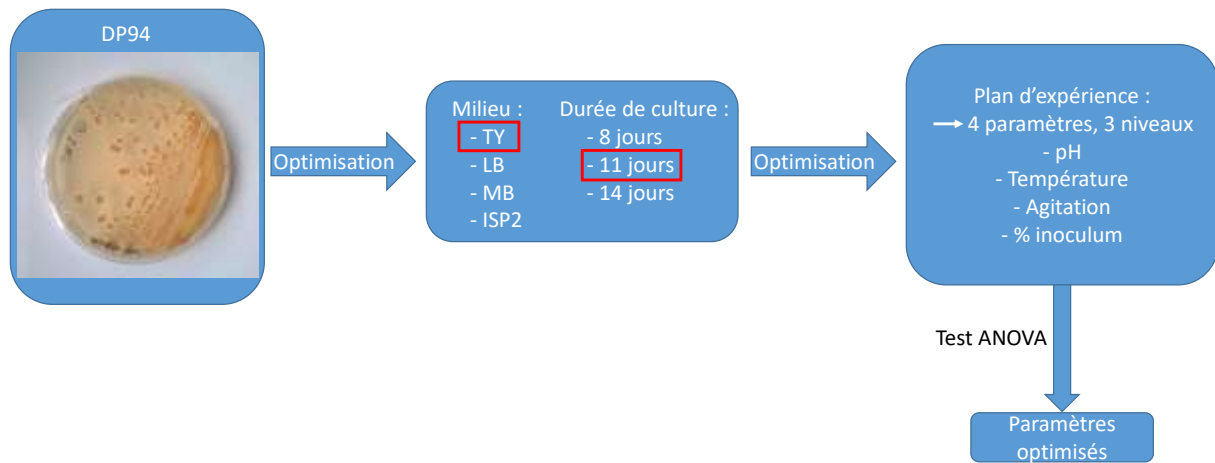


Figure 24 : Schéma général de la partie 2 du chapitre 2 : Optimisation de culture d'une souche bactérienne associée à un lichen

B. Caractérisation du personnage principal, *Nocardia* sp.

La souche sélectionnée pour cette étude est identifiée au sein du laboratoire sous la référence **DP94**. Elle a été isolée à partir du lichen terrestre *Collema auriforme*, récolté par Martin Grube et Delphine Parrot en Novembre 2012 dans la région de Graz à Kesselfallklamm (Autriche) à proximité d'une cascade (Figure 25). Le lichen a été rincé sur le terrain à l'eau stérile, puis il a été lavé à plusieurs reprises par une solution de NaCl 0,85 % / peptones issus de caséine 1 % stérile. Ce procédé permet l'obtention d'une première série de bactéries que l'on pourrait caractériser de bactéries épilichéniques. Puis le lichen a été broyé et associé à la même solution (homogénat) donnant ainsi une nouvelle série de bactéries assimilées comme étant les bactéries endolichéniques. Ces solutions ont ensuite été ensemencées sur du milieu ISP2 en boîte de Pétri supplémenté en acide nalidixique et amphotéricine B et des repiquages ont été effectués jusqu'à l'obtention de colonies pures. Ainsi, la souche **DP94** a été obtenue à partir de l'homogénat (bactérie endolichénique). Elle a ensuite été séquencée et identifiée par analyse du gène de l'ARNr 16S par comparaison avec les souches référencées dans la base de données du serveur EzTaxon, comme étant une *Nocardia* sp. Elle a tout d'abord été identifiée en 2013 comme étant *Nocardia ignorata* puis elle a été réidentifiée par Laurent Intertaglia responsable de la souchothèque de l'observatoire océanologique de Banyuls-sur-mer en 2017 et la souche **DP94** a présenté 100% d'identité avec les espèces *Nocardia soli*, *N. cummidelens* et *N. salmonicida*.



Figure 25 : Site de récolte de *Collema auriforme*

Les colonies sont de formes convexes et irrégulières de couleur orangée et elles possèdent des hyphes aériens blancs à rose pâle (Figure 26). Ce sont des bactéries à Gram positif en forme de bâtonnets. Selon les descriptions des trois espèces associées à notre souche elles poussent à des températures entre 10 et 20°C et des valeurs de pH entre 5 et 10 [114,115].

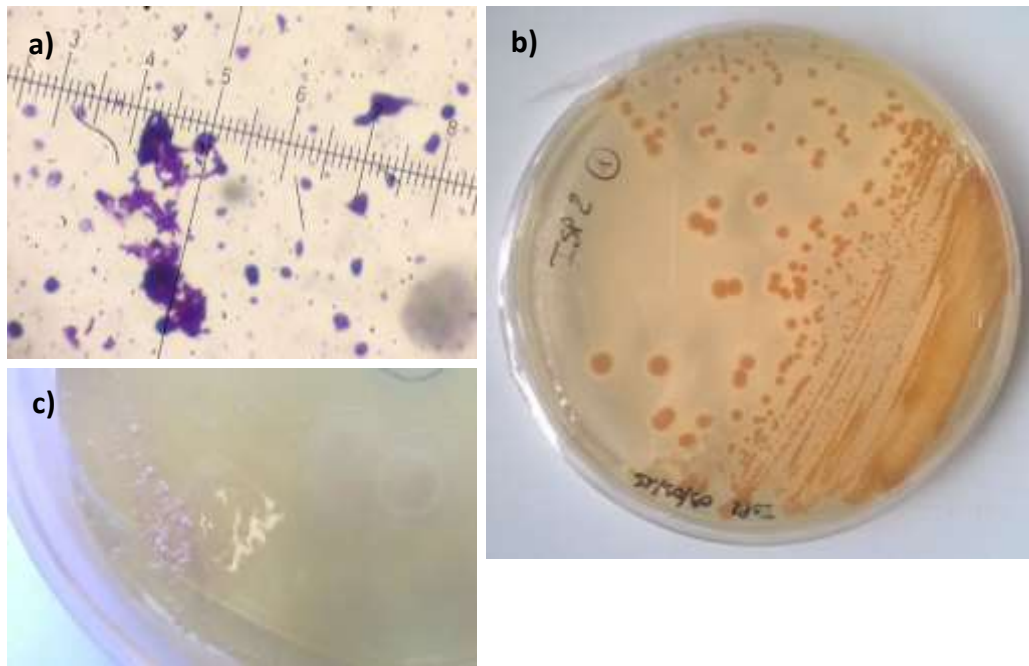


Figure 26 : Photographies de DP94, a) observation microscopique après coloration de Gram, b) et c) observation des colonies sur milieu ISP2

C. Sélection du milieu de culture et de la durée de culture

1. Essais préliminaires

La souche **DP94** a été initialement isolée sur un milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) à 24°C. Nous avons ici choisi de tester quatre milieux différents ISP2, TY (Tryptone Yeast), LB (Lysogeny Broth) et MB (Marine Broth) pour observer une éventuelle modification de la cytotoxicité des extraits obtenus.

La croissance bactérienne suit une courbe bien décrite et elle peut être déterminée par différentes techniques telles que la mesure de la densité optique (DO) régulière ou par réalisation de test au MTT. Cette courbe type est divisée en 5 phases (Figure 27) [116–118]:

- La phase de latence correspond à la phase durant laquelle on n’observe pas ou très peu d’augmentation du nombre de bactéries. Elle correspond au temps nécessaire à la bactérie pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat et jouant un rôle dans le développement bactérien.
- La phase de croissance exponentielle correspond au moment où le taux de croissance est maximal c’est-à-dire la phase où le temps de multiplication des bactéries est le plus court.
- La phase de ralentissement correspond à un ralentissement de la vitesse de croissance dû à un épuisement des ressources du milieu.
- La phase stationnaire de croissance correspond à une période où le taux de croissance bactérien est nul, le nombre de bactéries qui meurent compense celui des bactéries qui se multiplient. Cette phase est expliquée par un appauvrissement du milieu en ressources ce qui provoque une lyse de certaines bactéries libérant ainsi une nouvelle source de nutriment. Les bactéries se retrouvent dans une phase de déprivation qui déclenche certaines voies de synthèse de nouveaux composés destinés à la survie.
- La phase de déclin correspond enfin au moment où le milieu est complètement dépourvu de nutriments, on assiste alors à une lyse bactérienne sous l’action d’enzymes protéolytiques endogènes, ce qui implique un accroissement des déchets toxiques.

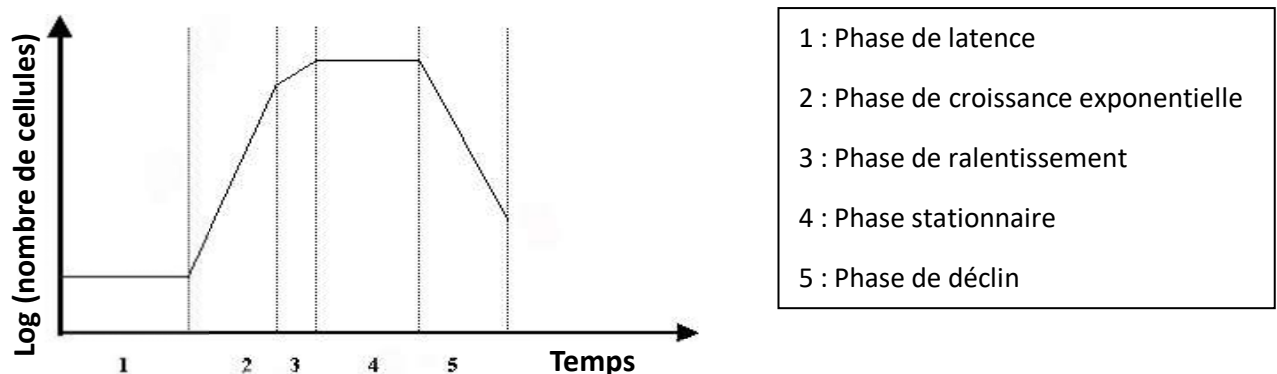


Figure 27 : Courbe de croissance bactérienne

Il est bien établi que la phase de la croissance la plus favorable à la production de métabolites spécifiques est la phase stationnaire. Par conséquent, nous avons réalisé nos essais après le début de

cette phase stationnaire à J + 1, J + 4 et J + 7, J correspondant au jour d'entrée en phase stationnaire. Dans le cas de la souche **DP94** le délai pour atteindre le premier jour de phase stationnaire est de 7 jours, ce qui signifie que nos essais ont été réalisés après 8 jours, 11 jours et 14 jours de croissance bactérienne.

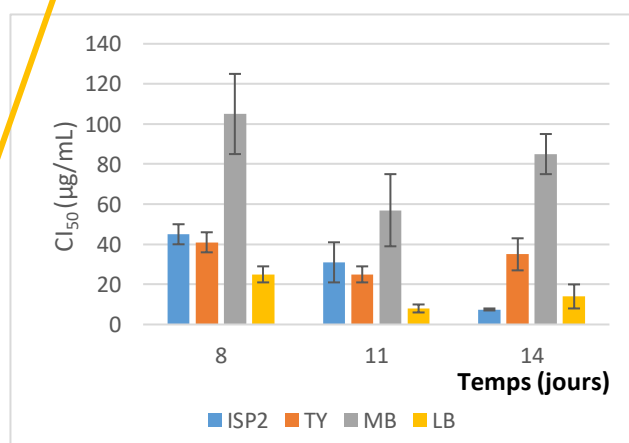
Les essais ont été réalisés à 25°C conformément à la littérature, sur 30 mL de milieu et en duplicata. A l'arrêt de la culture, les échantillons ont été centrifugés et le surnageant a été conservé, une résine Amberlite XAD 7HP y a été alors ajoutée et l'ensemble a été agité pendant 4h. Au bout de ce délai, la résine a été filtrée et désorbée par un mélange acétone/méthanol 50/50 (v/v) pendant 15 min. L'opération de désorption a été ainsi réalisée 3 fois. Après évaporation des solvants l'extrait brut est repris par de l'eau et une extraction liquide/liquide est effectuée avec de l'acétate d'éthyle dans le but de s'affranchir au maximum des constituants du milieu de culture. La phase organique est ensuite séchée pour donner l'extrait de résine. Chaque extrait a été pesé et un test de cytotoxicité a été réalisé sur un réplicat pour chaque expérience sur deux lignées cellulaires : une lignée cancéreuse de mélanome murin, B16 et une lignée non cancéreuse de kératinocytes humains, HaCaT. Les résultats sont compilés dans le tableau 5. Selon le NCI (National Cancer Institute) un extrait est considéré comme actif lorsque sa Cl_{50} est $< 20 \mu\text{g/mL}$ (au maximum $< 30 \mu\text{g/mL}$) [119].

Tableau 5 : Résultats des essais de milieu de culture et de durée de culture : poids des extraits et activité sur cellules B16 et HaCaT. a : ISP2 = International Streptomyces Project 2, TY = Tryptone Yeast, MB = Marine Broth, LB = Lysogeny Broth ; b : Concentration minimale inhibitrice de 50% de la population cellulaire

Jours de culture	Milieu ^a	Quantité d'extrait de résine (mg)	Cl_{50} ^b ($\mu\text{g/mL}$)	
			B16	HaCaT
8	ISP2	2,3	45 $\pm$ 5	59 $\pm$ 5
		2,3		
	TY	5,1	41 $\pm$ 5	72 $\pm$ 7
		5,2		
	MB	2,4	105 $\pm$ 20	115 $\pm$ 15
		2,0		
11	LB	2,8	25 $\pm$ 4	95 $\pm$ 30
		2,2		
	ISP2	3,5	31 $\pm$ 10	53
		4,5		
	TY	4,7	25 $\pm$ 4	100
		6,0		
14	MB	2,6	57 $\pm$ 18	120 $\pm$ 15
		1,6		
	LB	2,4	8 $\pm$ 2	31 $\pm$ 12
		2,5		
	ISP2	3,7	7,5 $\pm$ 0,5	41 $\pm$ 5
		3,4		
14	TY	6,6	35 $\pm$ 8	90
		6,2		
	MB	3,9	85 $\pm$ 10	79 $\pm$ 9
		3,6		
	LB	4,3	14 $\pm$ 6	70 $\pm$ 4
		4,0		

Conditions fournissant la quantité d'extrait la plus importante avec une bonne activité

Conditions fournissant la meilleure activité cytotoxique sur B16



Les extraits les plus actifs ont été obtenus à partir des cultures dans le milieu LB avec une activité maximale au bout de 11 jours de culture (soit 4 jours après le début de la phase stationnaire) avec une CI_{50} sur B16 à $8 \pm 2 \mu\text{g/mL}$. Le milieu fournissant la plus grande quantité d'extrait brut est le milieu TY et ceci peu importe la durée de la culture. A 11 jours de culture on constate une quantité d'extrait importante ainsi qu'une bonne activité cytotoxique sur les cellules B16 $CI_{50} 25 \pm 4 \mu\text{g/mL}$. La culture en milieu ISP2 donne également des extraits actifs mais la meilleure activité est observée à 14 jours de culture. Une durée de culture plus courte étant plus intéressante nous ne l'avons pas sélectionnée pour la suite des travaux. Le milieu MB est par contre le moins propice à la production du (des) métabolite(s) responsable(s) de l'activité cytotoxique.

2. Comparaison des profils chimiques

Tous les échantillons ont été analysés par HPLC/UV-DAD (Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur UV à barrette de diode) à une concentration de 5 mg/mL dans le méthanol et les chromatogrammes obtenus ont été comparés dans la Figure 28.

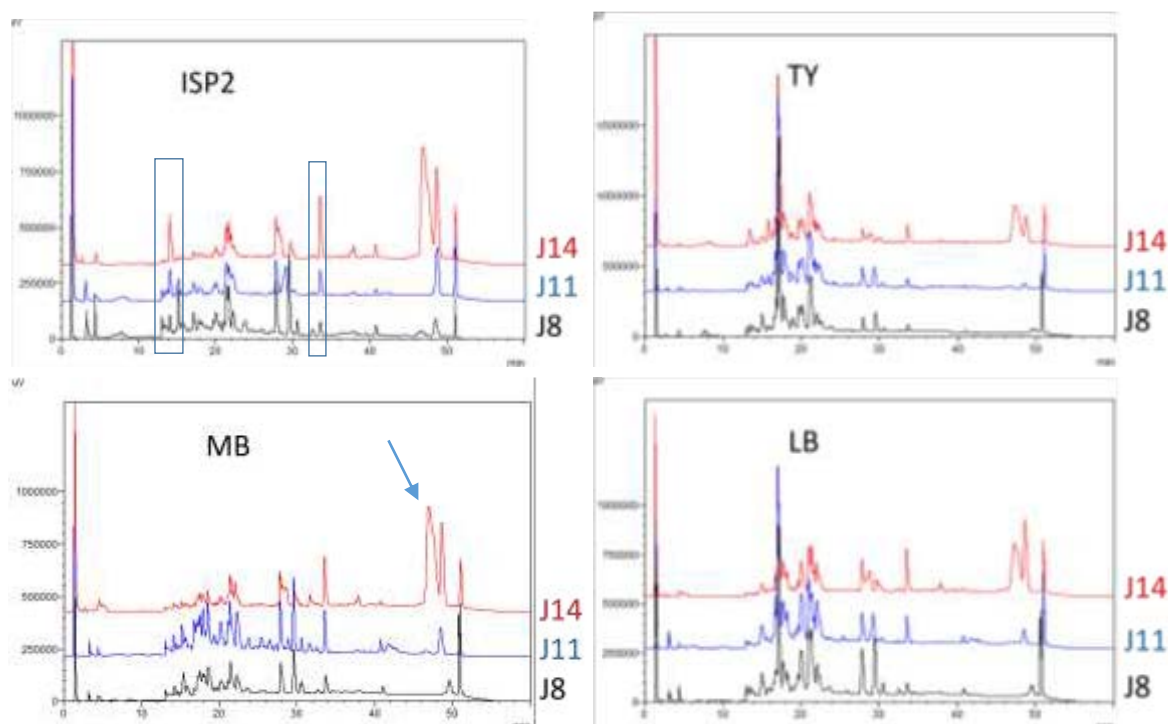


Figure 28 : Comparaison des profils chimiques obtenus à 220 nm pour chaque milieu en fonction de la durée de culture. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C_{18} 5 μm , gradient d'élution $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$: 100% H_2O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d' H_2O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.

Nous observons que l'on a bien une modification du profil chimique de notre souche suivant la durée de la culture (Figure 28). Cet effet est plus marqué dans le milieu MB où la production bactérienne est fortement amoindrie au bout de 14 jours de culture au profit d'un composé très apolaire éluant en fin de gradient (flèche sur chromatogramme MB). C'est également bien visible dans le milieu ISP2 où par

exemple un composé apparaissant autour de 15 min disparaît au fur et à mesure du temps, et à l'inverse la production du composé éluant à 34 min semble augmenter avec le temps (encarts sur chromatogrammes ISP2, Figure 28).

En comparant les spectres d'un même jour en fonction des différents milieux (Figure 29), l'effet de l'approche OSMAC est encore plus prononcé. En effet nous observons par exemple que le composé majoritaire dans l'extrait de LB et TY (éluant autour de 17 min) n'est quasiment pas présent dans les extraits de ISP2 et MB et ce quelle que soit la durée de la culture.

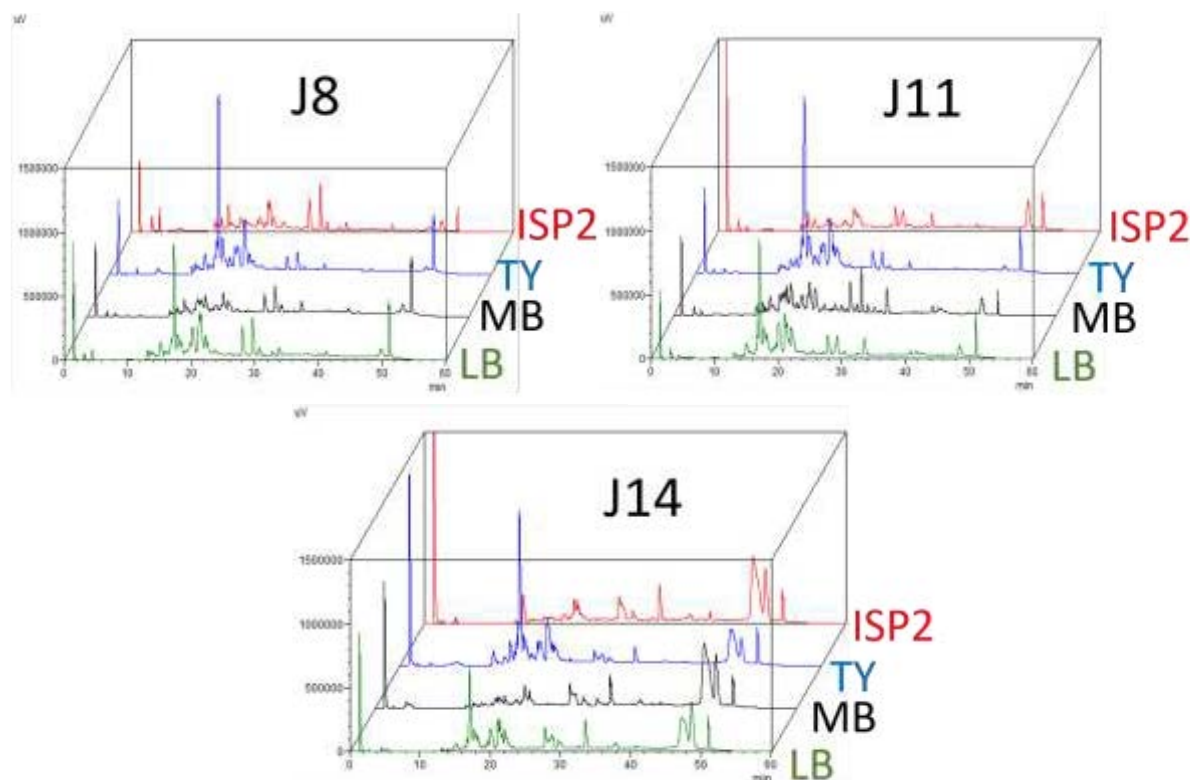


Figure 29 : Comparaison des profils chimiques à 220 nm obtenus pour chaque durée de culture en fonction du milieu. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'éluant H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.

L'effet du changement de milieu et de la durée de culture sur l'activité de nos extraits et sur leur profil chimique respectifs, montre bien l'influence de la variation des paramètres de culture sur la production bactérienne et donc l'intérêt de leur optimisation pour la découverte de nouveaux composés.

3. Confirmation des résultats à grande échelle

Au vu de ces résultats nous avons procédé à la culture de notre souche bactérienne à grande échelle pour confirmer les conditions les plus optimales c'est-à-dire dans le milieu LB sur 11 jours et dans le milieu TY sur 11 jours.

Les cultures ont été faites en erlenmeyers de 300 mL. Pour la culture en milieu TY, 18 erlenmeyers ont été ensemencés soit un volume de culture de 5,4 L et 24 erlenmeyers pour la culture en milieu LB soit un volume de 7,2 L. Les cultures ont ensuite été incubées à 25°C avec une agitation à 130 rpm jusqu'à 4 jours après le début de la phase stationnaire (soit 11 jours). Au bout de ce délai, le milieu a été centrifugé et le surnageant a été extrait à l'aide de la résine Amberlite XAD 7HP, puis celle-ci a été désorbée par le mélange acétone/méthanol 50/50 et a subi le même protocole que précédemment décrit jusqu'à obtenir l'extrait de résine (Figure 30). Après épuisement du milieu par la résine le surnageant est également récupéré et directement extrait à l'acétate d'éthyle dans le but d'obtenir les composés qui n'auraient pas été adsorbés sur la résine donnant ainsi un second extrait, appelé extrait surnageant. Chacun de ces extraits est pesé et est testé par le test au MTT sur les 2 lignées cellulaires précédemment citées : B16 et HaCaT.

Nous constatons alors que dans un premier temps la quantité d'extrait obtenue avec la culture en milieu TY est beaucoup plus importante que celle en milieu LB (Tableau 6). Le rendement calculé par le rapport de la quantité de matière sèche d'extrait sur le volume de culture, est de 101,4 mg/L de culture dans le milieu TY contre 60,3 mg/mL dans le milieu LB pour les extraits de résine. Ce résultat confirme les résultats préliminaires.

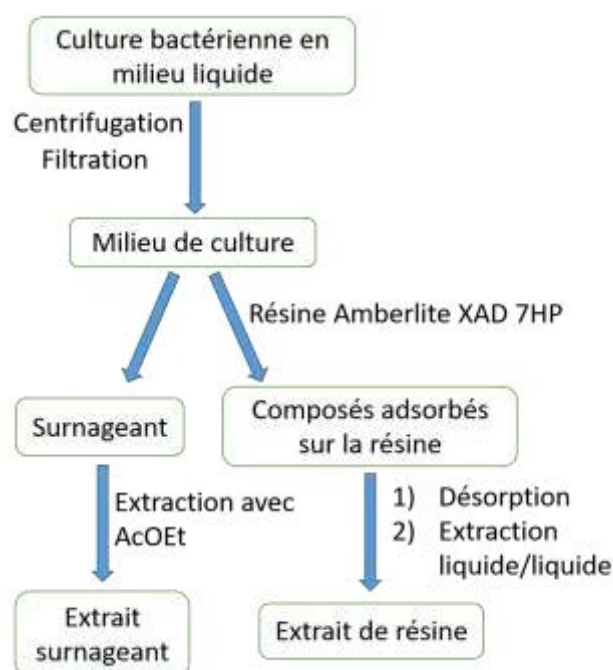


Tableau 6 : Quantité d'extrait, rendements et activité cytotoxique des extraits obtenus par culture à grande échelle

Milieu	Extrait	Quantité (mg)	Rendement (mg/L)	Cl ₅₀ (µg/mL)	
				B16	HaCaT
TY	Extrait de résine	547,6	101,4	>200	>200
	Extrait surnageant	86,8	16,1	4,6 ± 1,8	8 ± 1,5
LB	Extrait de résine	434,2	60,3	>200	>200
	Extrait surnageant	21,6	3,0	52 ± 20	73 ± 20

Figure 30 : Schéma d'extraction des extraits bactériens

Dans un deuxième temps, nous observons une perte de l'activité cytotoxique dans les deux extraits de résine mais on la retrouve dans les extraits surnageants. L'extrait obtenu par culture dans le milieu TY est alors beaucoup plus actif que celui de LB contrairement aux essais préliminaires. Cela peut être expliqué par le fait que l'agitation et l'oxygénation ne sont pas identiques entre 30 mL de culture dans un tube et 300 mL dans un erlenmeyer. Nous introduisons donc une variation des paramètres de culture en passant à grande échelle et donc potentiellement une modification de la production bactérienne.

La différence de production bactérienne induite par le changement de milieu de culture est visible dans la Figure 31 par comparaison des profils chimiques des extraits obtenus.

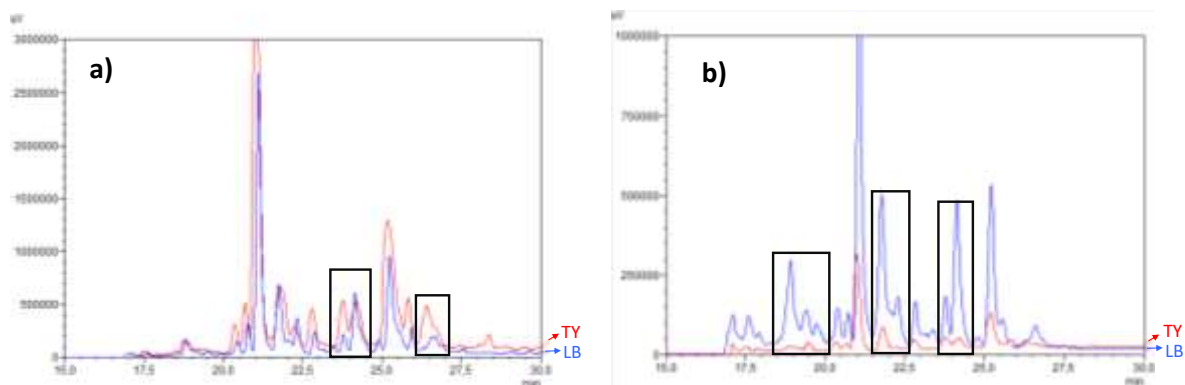


Figure 31 : Comparaison des profils chimiques des extraits de résine à 220 nm : a) et des extraits surnageants : b) des cultures en grande quantité en milieu TY (rouge) ou LB (bleu), les encarts noirs mettent en évidence les principales différences entre les profils. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevalil® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.

Nous observons notamment que les différences sont plus importantes dans les extraits surnageants. Seulement deux zones semblent varier entre les chromatogrammes des extraits de résines des cultures en milieu TY et LB et ces différences semblent surtout quantitatives. Cependant sur les chromatogrammes des extraits de surnageant on peut repérer au moins trois zones où le profil chimique varie de manière quantitative mais également de manière qualitative par l'apparition de nouveaux composés.

Par conséquent, les paramètres de culture sélectionnés pour la suite de notre étude sont donc une culture dans le milieu TY à 25°C pendant 4 jours après le début de la phase stationnaire. Nous avons ensuite voulu réaliser une culture en bioréacteur BioFlo® 115 dans le but d'optimiser les rendements d'extraction. Cette étape nous permettrait d'obtenir une quantité d'extrait assez importante pour permettre l'isolement des composés en quantité suffisante pour réaliser leur identification. De plus l'utilisation d'un bioréacteur permet de maîtriser et de suivre de nombreux paramètres de culture. Nous avons donc procédé à une optimisation des paramètres de culture par le biais d'un plan d'expérience en bioréacteur et en erlenmeyer pour comparer les deux méthodes de culture.

D. Optimisation de la culture de DP94 en bioréacteur par plan d'expérience

1. Culture en bioréacteur de DP94

Nous avons commencé par réaliser une culture de **DP94** dans des conditions de culture « standards » dans le milieu TY. La température a été fixée à 25°C, 5 L de milieu TY ont étéensemencés et l'agitation a été réglée sur 200 rpm avec un mode « cascade » en lien avec l'oxygénation du milieu. Ce réglage signifie que dans le cas où le taux d'oxygène dissous passe au-dessous d'une valeur préalablement réglée (ici 40%) l'agitation est augmentée pour maintenir une bonne oxygénation. La vitesse d'agitation maximale est réglée à 400 rpm. Enfin le pH initial du milieu a été ajusté à 7 avant l'ensemencement mais il n'a pas été réajusté lors de la culture pour observer le comportement de la souche. La culture a été suivie par mesure régulière de la densité optique à 620 nm (DO) et par enregistrement de l'évolution des différents paramètres de culture directement par le bioréacteur (Figures 32 et 33).

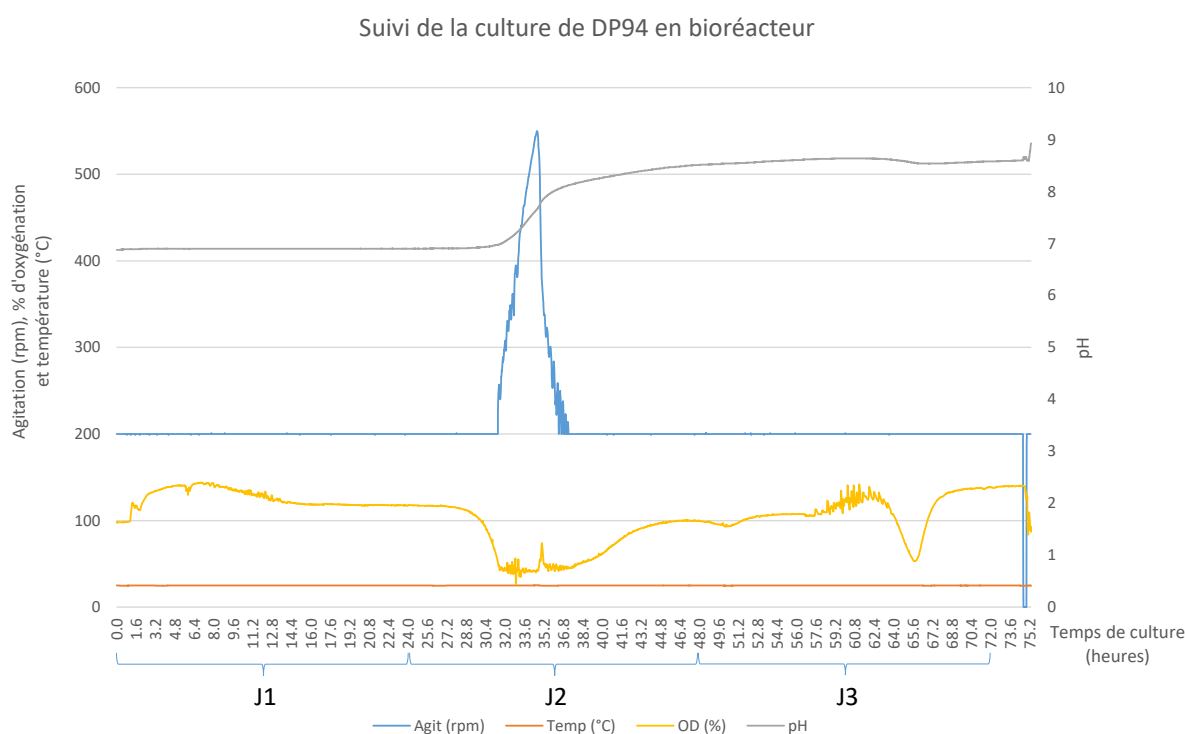


Figure 32 : Suivi des paramètres de culture de DP94 dans le milieu TY, vitesse d'agitation (bleu) en rotation par minute (rpm), température (rouge) en °C, pourcentage d'oxygène dissous, OD (jaune) du milieu en % et pH (gris) en unités de pH, en fonction du temps. Les relevés de mesures sont réalisés toutes les minutes.

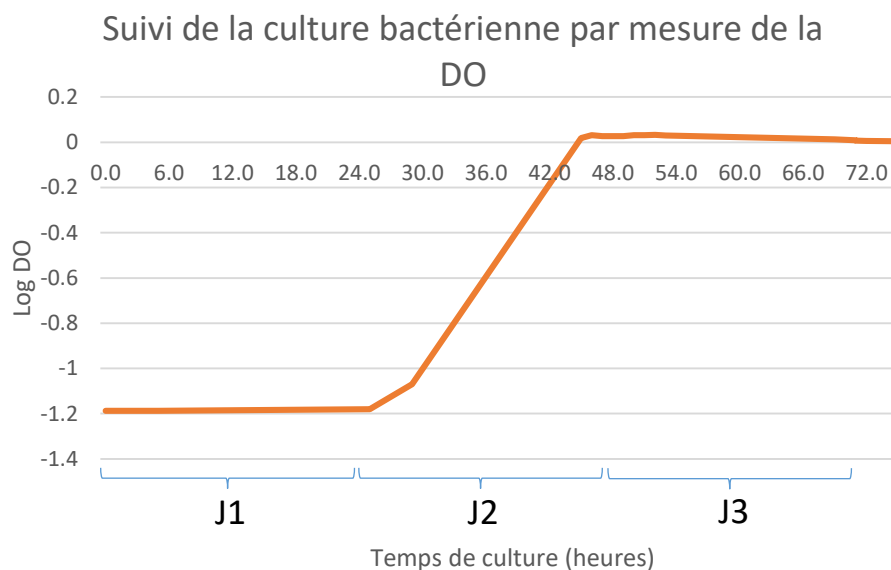


Figure 33 : Suivi de la culture bactérienne de DP94 en bioréacteur par mesure régulière de la densité optique à 620 nm (DO) représentée en log (DO) en fonction du temps

La culture a été stoppée à la fin de la phase stationnaire soit après 3 jours de culture. Les extraits de résine et surnageant ont été obtenus selon le même protocole que précédemment décrit et ils ont été testés sur les mêmes lignées cellulaires. Le tableau 7 présente les quantités d'extraits obtenues, ainsi que les rendements et l'activité de chaque extrait.

Tableau 7 : Quantité d'extrait, rendement et activité cytotoxique des extraits obtenus par culture en bioréacteur

Milieu	Extrait	Quantité d'extrait (mg)	Rendement (mg/L)	CI ₅₀ (µg/mL)	
				B16	HaCaT
TY (5 L)	Extrait de résine	657,3	131,5	>200	>200
	Extrait surnageant	137,6	27,5	120 ± 25	128 ± 33

Grâce à la culture en bioréacteur le rendement d'extraction est amélioré pour les 2 extraits (+ 30 % sur l'extrait de résine et + 70 % pour l'extrait surnageant) (Tableau 7). Cependant nous constatons une diminution conséquente de la CI₅₀ de nos 2 extraits, indiquant que les paramètres sélectionnés ne sont peut-être pas les plus adaptés pour l'obtention de composés cytotoxiques. Pour pallier cela nous avons réalisé une optimisation des paramètres de culture par l'utilisation d'un plan d'expérience.

2. Réalisation du plan d'expérience

a. En erlenmeyer

Afin d'optimiser la production de composés actifs il est possible de faire varier tous les paramètres de culture. Une étude sur le milieu et la durée de culture ayant déjà été réalisée, le travail d'optimisation des conditions de culture a été effectué pour la culture de la souche **DP94** en erlenmeyer dans le milieu TY sur un volume de 300 mL et la vitesse d'agitation est fixée à 150 rpm. Les trois paramètres à faire varier ont été choisis : la température, le pH du milieu et le pourcentage d'inoculum utilisé pour ensemençer les cultures. Chacun de ces paramètres a été testé sur 3 niveaux, ce qui implique 27 combinaisons possibles de culture (Tableau 8). L'utilisation d'un plan d'expérience permet de réaliser un nombre d'expériences limité tout en conservant des données statistiquement interprétables. La méthode de Taguchi a été utilisée pour définir ce plan d'expérience en se basant sur les tables de la matrice orthogonale L9 de Taguchi [120] (Tableau 9).

Tableau 8 : Présentation des 3 facteurs sélectionnés et des valeurs de leurs 3 niveaux pour l'étude en erlenmeyer

Facteurs	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
[A] Température (°C)	25	30	37
[B] pH	6	7	8
[C] % inoculum (v/v)	1	2	5

Tableau 9 : Conditions expérimentales en erlenmeyer avec le plan d'expérience en matrice orthogonale L9 (3³) selon Taguchi

Exp n°	Facteur		
	[A]	[B]	[C]
1 (B1)	1	1	1
2 (B2)	1	2	2
3 (B3)	1	3	3
4 (A1)	2	1	2
5 (A2)	2	2	3
6 (A3)	2	3	1
7 (C1)	3	1	3
8 (C2)	3	2	1
9 (C3)	3	3	2

Ainsi, les 9 expériences décrites dans le tableau 9 ont été réalisées sur un volume de 300 mL de TY dans des erlenmeyers de 500 mL. A la fin de la phase stationnaire, les cultures ont été arrêtées et traitées selon le même protocole que décrit précédemment. Les extraits obtenus ont été pesés et testés sur les lignées cellulaires B16 et HaCat. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Résultats du plan d'expérience en erlenmeyer : quantité d'extraits, rendement et activité cytotoxique des extraits obtenus

Exp n°	Extrait de résine (ER)				Extrait surnageant (ES)			
	Quantité d'extrait (mg)	Rendement (mg/L)	Cl ₅₀ (µg/mL)		Quantité d'extrait (mg)	Rendement (mg/L)	Cl ₅₀ (µg/mL)	
			B16	HaCaT			B16	HaCaT
1	92.0	306.7	280 ± 160	110 ± 60	59.8	199.3	375 ± 110	40 ± 15
2	83.9	279.7	96 ± 9	122 ± 4	233.6	77.9	73 ± 20	77 ± 16
3	65.6	218.7	70 ± 8	71 ± 19	19.8	66.0	74 ± 34	56 ± 24
4	28.9	96.3	145 ± 15	122 ± 22	22.2	74.0	380 ± 105	75 ± 50
5	55.2	184.0	130 ± 4	127 ± 13	17.2	57.3	390 ± 100	240 ± 150
6	91.7	305.7	64 ± 8	72 ± 1	17.5	58.3	170 ± 10	152 ± 18
7	60.6	202.0	6 ± 0	30 ± 7	175.0	583.3	480 ± 230	140 ± 70
8	53.0	176.7	81 ± 10	50 ± 7	252.1	840.3	>500	260 ± 110
9	146.7	489.0	63 ± 7	79 ± 15	11.9	39.7	137 ± 7	32 ± 10

Les résultats de cytotoxicité ont été analysés par un test statistique ANOVA pour identifier les paramètres ayant une influence significative sur l'activité et donc sur la production de métabolites cytotoxiques.

Tableau 11 : Résultats de l'analyse de variance

Facteurs	p			
	Extrait de résine		Extrait surnageant	
	Effet sur la Cl ₅₀ sur B16	Effet sur le rendement d'extraction	Effet sur la Cl ₅₀ sur B16	Effet sur le rendement d'extraction
A	51,4%	73,4%	23,6%	43,2%
B	63,4%	54,1%	12,2%	35,9%
C	66,4%	77,1%	25,9%	89,3%

Malgré une différence d'activité notable entre les différents extraits (tableau 11), aucun effet significatif des paramètres que l'on a sélectionné n'a été mis en évidence. Un facteur a une influence significative lorsque la valeur de p est inférieure à 5% ce qui n'est pas le cas dans ces résultats.

b. En bioréacteur

L'étude de l'effet des conditions de culture a également été réalisée sur des cultures en bioréacteur dans un volume de 2,5 L de milieu TY. Les trois paramètres sélectionnés pour l'optimisation sont les mêmes que précédemment : la température, le pH du milieu et le pourcentage de préculture utilisé pour ensemercer le bioréacteur. Cependant, un paramètre supplémentaire entre en compte : la vitesse d'agitation. Chacun de ces paramètres a été testé sur trois niveaux et le nombre de combinaisons possibles passe alors à 81. Le plan d'expérience a alors été mis en place pour réduire le nombre d'expériences à 9 (Tableaux 12 et 13).

Tableau 12 : Présentation des 4 facteurs sélectionnés et des valeurs de leurs 3 niveaux pour l'étude en bioréacteur

Facteurs	Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
[A] pH	6	7	8
[B] température (°C)	25	30	37
[C] % inoculum (v/v)	1	2	5
[D] agitation (rpm)	150	200	250

Tableau 13 : Conditions expérimentales en bioréacteur avec le plan d'expérience en matrice orthogonale L9 (3⁴) selon Taguchi

Exp n°	Facteur			
	[A]	[B]	[C]	[D]
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Ainsi, les 9 expériences décrites dans le tableau 13 ont été réalisées sur un volume de 2,5 L de TY dans le bioréacteur BioFlo[®] 115. A la fin de la phase stationnaire, les cultures ont été arrêtées et traitées selon le même protocole que décrit précédemment. Les extraits obtenus ont été pesés et testés sur les lignées cellulaires B16 et HaCat et les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Résultats du plan d'expérience en bioréacteur : quantité d'extraits, rendement et activité cytotoxique des extraits obtenus

Exp n°	Extrait de résine (ER)				Extrait surnageant (ES)			
	Quantité d'extrait (mg)	Rendement (mg/L)	CI ₅₀ (µg/mL)		Quantité d'extrait (mg)	Rendement (mg/L)	CI ₅₀ (µg/mL)	
			B16	HaCaT			B16	HaCaT
1	365.2	146.1	157 ± 77	92 ± 29	115.7	46.3	>500	460 ± 140
2	402.0	160.5	205 ± 100	185 ± 65	4648.2	1859.3	>500	>500
3	541.4	216.6	53 ± 16	152 ± 28	1196.6	478.6	41 ± 8	20 ± 8
4	394.9	158.0	92 ± 19	70 ± 8	380.7	152.3	285 ± 75	85 ± 5
5	444.6	177.8	345 ± 95	120 ± 40	1267.3	506.9	100 ± 30	39 ± 10
6	558.7	223.5	45 ± 15	80 ± 20	90.3	36.1	270 ± 35	225 ± 45
7	317.0	126.8	270 ± 30	185 ± 15	166.3	66.5	430 ± 90	180 ± 20
8	1757.4	703.0	340 ± 25	397 ± 27	46.1	18.4	67 ± 4	38 ± 19
9	794.9	318.0	90 ± 50	110 ± 25	109.7	43.9	390 ± 90	45 ± 2

Les résultats de cytotoxicité ont été analysés par un test statistique ANOVA pour identifier les paramètres ayant une influence significative sur l'activité et donc sur la production de métabolites cytotoxiques.

Tableau 15 : Résultats de l'analyse de variance

Facteurs	p			
	Extrait de résine		Extrait surnageant	
	Effet sur la CI_{50} sur B16	Effet sur le rendement d'extraction	Effet sur la CI_{50} sur B16	Effet sur le rendement d'extraction
A	11,8%	40,8%	50,0%	30,3%
B	2,4%	47,5%	33,3%	31,2%
C	13,1%	50,0%	38,8%	38,5%
D	50,0%	49,0%	19,2%	50,0%

Un seul effet significatif est observé ($p < 5\%$). Il s'agit de l'effet de la température sur l'activité cytotoxique de l'extrait de résine sur les cellules B16. L'effet le plus important observé (et donc la CI_{50} la plus faible) est obtenu lorsque la température est à son niveau maximal : 37 °C. Aucun autre effet significatif n'est observé ni sur le rendement d'extraction des deux extraits ni sur la cytotoxicité de l'extrait de surnageant.

L'expérience 3 (pH 6, température 37 °C, agitation 250 rpm et inoculation avec 5% de préculture) a révélé une activité cytotoxique intéressante sur la lignée cancéreuse B16 avec l'extrait surnageant le plus actif ($CI_{50} = 41 \mu\text{g/mL}$) et l'extrait de résine qui est également l'un des plus actifs ($CI_{50} = 53 \mu\text{g/mL}$). Les rendements d'extraction obtenus sont également parmi les plus élevés (extrait de résine : 216,6 mg/L de culture, extrait surnageant : 478,6 mg/L). Ces conditions de culture semblent donc les plus appropriées à notre étude. Il serait intéressant de réaliser un second plan d'expérience en se basant sur les niveaux attribués à chaque paramètre de cette expérience.

Dans le but de mettre en évidence les composés influençant l'activité des échantillons, les extraits obtenus lors du plan d'expérience en bioréacteur ont été analysés par HPLC/MS. Les données ont ensuite été traitées par le logiciel MZmine 2, les pics ont été détectés par une méthode centroïde, puis ils ont été déconvolués par l'utilisation d'un algorithme appelé « baseline cut-off » et enfin les pics ont été alignés. Les données sont rassemblées sous forme de tableau et une analyse statistique est réalisée par le logiciel Rstudio. Les échantillons sont séparés en « actifs » ($CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ sur B16 : ER3, ES3, ER4, ER6, ES8 et ER9) et « inactifs » ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ sur B16 : ER1, ES1, ER2, ES2, ES4, ER5, ES5, ES6, ER7, ES7, ER8 et ES9) et une analyse par PLS-DA est effectuée (Figure 34), le cercle des corrélations est ensuite tracé (Figure 35).



La PLSDA est validée par « cross-model validation » et elle ne montre pas une différence significative entre le groupe des échantillons actifs et des inactifs (8 composantes, 999 permutations, NMC = 0,292, $p = 0,11$). Le(s) composé(s) responsable(s) de l'activité sont probablement minoritaires et ne ressortent pas bien sur une analyse des extraits bruts. Nous avons donc choisi de renouveler cette étude ultérieurement sur un extrait fractionné (Partie 4 – B., p. 89).

E. Conclusion

Les travaux présentés ci-dessus démontrent bien la variabilité de la production bactérienne induite par les différentes conditions de culture. Le milieu de culture et la durée de la culture bactérienne adéquats pour favoriser la production de composé(s) cytotoxique(s) par la souche **DP94** ont été mis en évidence. L'optimisation des autres paramètres de culture en erlenmeyer n'a pas fait ressortir de conditions possédant une influence positive significative sur l'activité. Cependant, lors de la culture en bioréacteur il ressort que la température joue un rôle important dans la production de composé(s) bioactif(s), notamment à une valeur optimale de 37 °C. Enfin, la comparaison des données obtenues en spectrométrie de masse à partir des extraits actifs et inactifs ne montre pas de différence significative entre les deux groupes. Cela laisse envisager la possibilité que les composés responsables de l'activité soient très minoritaires dans les extraits, ou bien tout simplement qu'ils ne s'ionisent pas dans nos conditions d'analyse par spectrométrie de masse.

Scène 3 : Etude de la communication entre bactéries de type *Nocardia* sp. par l'isolement des composés produits

Les extraits de la culture de **DP94** en bioréacteur décrite dans la partie 2 – D. – 1. « Culture en bioréacteur de DP94 » (p. 55) ont été étudiés dans le but d'identifier les composés produits. L'activité des composés isolés sera également testée.

Tableau 16 : Quantité d'extrait, rendements et activité cytotoxique des extraits obtenus par culture en bioréacteur

Milieu	Extrait	Quantité d'extrait (mg)	Rendement (mg/L)	Cl ₅₀ (µg/mL)	
				B16	HaCaT
TY (5L)	Extrait de résine	657,3	131,5	>200	>200
	Extrait surnageant	137,6	27,5	120 ± 25	128 ± 33

A. Etude de l'extrait de résine

L'extrait de résine a tout d'abord été fractionné par chromatographie flash sur colonne de silice avec un gradient de solvant de gamme de polarité croissante. Les solvants utilisés dans l'ordre de polarité croissante sont le cyclohexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Cependant, du fait d'un problème d'injection, la quasi-totalité de l'extrait a été éjectée dans les fractions 2 et 3. Celles-ci ont donc été recombinaées et une seconde chromatographie flash a été réalisée dans les mêmes conditions. 47 fractions ont ainsi été obtenues. Après analyse par HPLC-UV-DAD, certaines fractions avec des profils chimiques similaires ont été rassemblées menant à 23 fractions.

1. Fraction 6

La **fraction 6** constituée de 12,1 mg a mené à l'isolement de 2 composés (**1** et **2**) après purification par HPLC semi-préparative sur colonne Prevaïl C₁₈ avec un mélange éluant d'eau et d'acétonitrile (H₂O/ACN) débutant à 30% d'ACN et allant jusqu'à 100% d'ACN en 20 min (Figure 36). Le composé **1** (1,2 mg ; 0,24 mg/L de culture) obtenu pur à partir de la sous-fraction 2, a été identifié par les données de HRMS et la comparaison des données spectrales obtenues par analyse RMN ¹H et ¹³C comme étant l'indole-3-carboxaldéhyde, un dérivé indolique retrouvé dans de nombreux organismes tels que des plantes [121], des éponges marines [122] et diverses bactéries dont des Actinobactéries [123–125]. Le composé **2** (1,5 mg ; 0,3 mg/L de culture) obtenu dans la sous-fraction 4, n'a pas pu être identifié du fait d'une trop faible quantité et la présence d'une forte proportion d'impuretés. Les sous-fractions 1 et 3 sont constituées de mélange de composés.

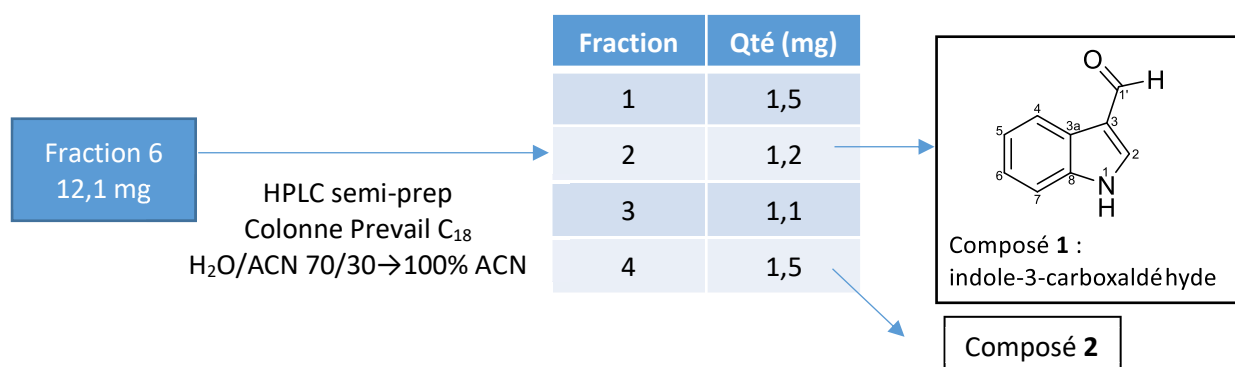


Figure 36 : Isolement des composés **1** et **2** à partir de la fraction 6

2. Fraction 7

La **fraction 7** de 20,6 mg a aussi été purifiée par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C₁₈ avec un mélange éluant H₂O/ACN, ce qui a mené à l'isolement du composé **3** (1,8 mg ; 0,36 mg/L) qui n'a pas pu être encore identifié.

3. Fraction 8

La **fraction 8** constituée de 235,3 mg, soit la fraction la plus importante, a été fractionnée une seconde fois par chromatographie flash sur gel de silice avec un système éluant constitué au départ par un mélange de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (CH₂Cl₂/AcOEt) par un gradient augmentant en polarité jusqu'à atteindre 100% d'AcOEt. Le méthanol est ensuite ajouté graduellement jusqu'à 20% de méthanol ce qui a permis d'obtenir 8 nouvelles fractions. Les fractions 1 et 2 issues de ce second fractionnement ont été rassemblées (126,9 mg) et un troisième fractionnement par chromatographie flash sur gel de silice suivant le même gradient d'élution a donné encore 10 sous-fractions (Figure 37).

La sous-fraction 6 (75,4 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C₁₈ avec un mélange isocratique de solvant H₂O/ACN 70/30 donnant 4 sous-fractions. A partir des sous-fractions 1 et 4, deux autres composés (**4** et **5**) ont été isolés. Le composé **4** (13,0 mg ; 2,6 mg/L de culture) est identifié par comparaison des données de RMN ¹H et ¹³C avec les données de la littérature comme étant une dicétopipérazine connue, la cyclo (L-Val-L-Pro) déjà isolée à partir d'actinobactéries [126,127]. Le composé **5** n'a pas pu être identifié du fait du grand nombre d'impuretés présentes malgré de nombreux essais de purification. Les sous-fractions 2 et 3 sont constituées d'un mélange des deux mêmes composés, leur isolement est en cours.

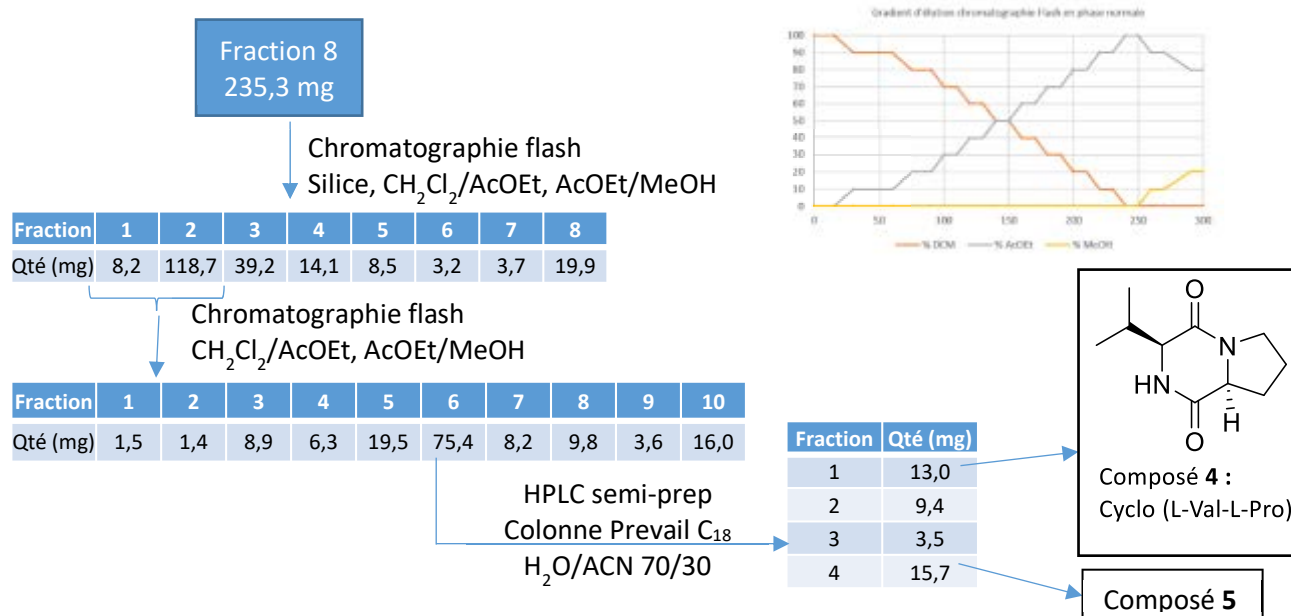


Figure 37 : Isolement des composés **4** et **5** à partir de la fraction 7

4. Fraction 9

La **fraction 9** constituée de 143,1 mg a également été fractionnée une seconde fois par chromatographie flash donnant ainsi 11 nouvelles fractions (Figure 38). La **fraction 3** a mené à l'isolement du composé **6** (6,9 mg ; 1,38 mg/L de culture) par HPLC semi-préparative avec un mélange H₂O/ACN à 60/40. Ce composé n'est pas identifié aujourd'hui du fait d'une pureté insuffisante. La **fraction 7** (20,8 mg) a été séparée par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C₁₈ avec un mélange éluant H₂O/ACN isocratique à 25% d'ACN, donnant ainsi 3 sous-fractions. La purification de la sous-fraction 1 a mené à l'identification du composé **7** (5,7 mg ; 1,14 mg/L) qui est une seconde dicétopipérazine, la cyclo (L-Tyr-D-Pro) qui a déjà été isolée à partir de *Streptomyces* sp. [128]. La structure et la configuration de la molécule ont été déterminées par comparaison des données obtenues en RMN ¹H et ¹³C et la formule brute est obtenue par la spectrométrie de masse. Les sous-fractions 2 et 3 sont constituées de mélange de plusieurs produits.

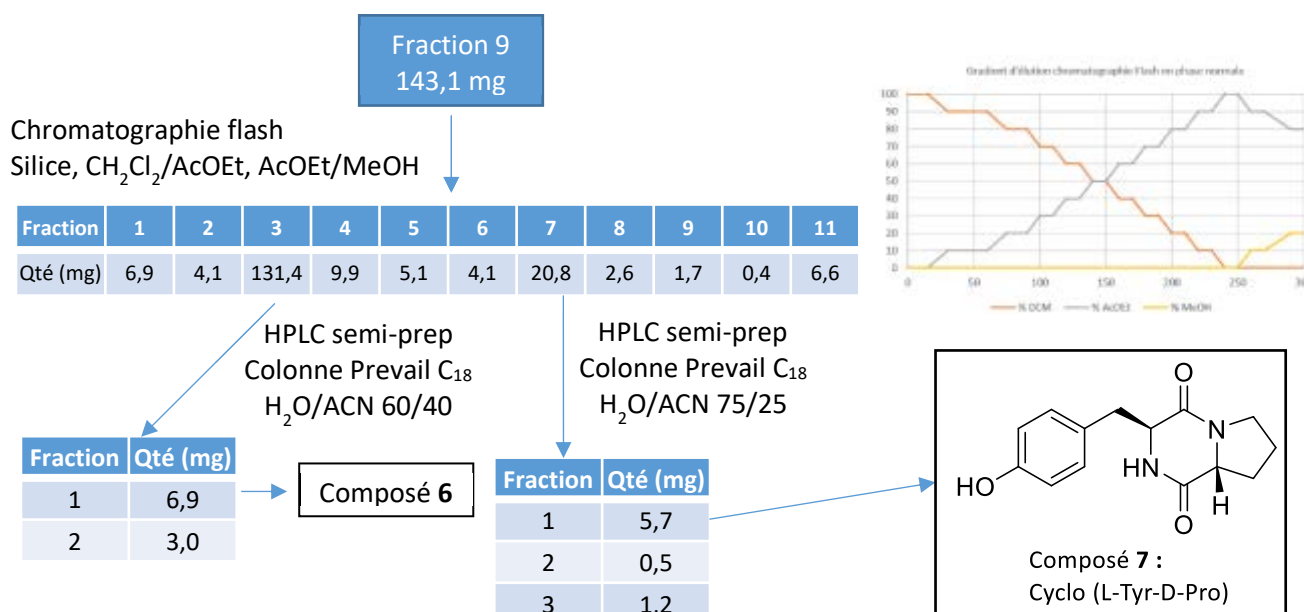


Figure 38 : Isolement des composés 6 et 7 à partir de la fraction 9

5. Fraction 14

La **fraction 14** constituée de 22,1 mg, a été séparée par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C₁₈, avec un mélange : éluant H₂O/ACN isocratique à 25% d'ACN (Figure 39). Les composés **8** (2,4 mg ; 0,48 mg/L de culture) et **9** (1,8 mg ; 0,36 mg/L) ont été identifiés à partir des 2 sous-fractions obtenues. Ce sont également 2 dicétopipérazines connues : la cyclo (L-Ala-L-Phe) et la cyclo (L-Tyr-L-Tpn) respectivement. Toutes les deux ont déjà été obtenues à partir de culture de *Streptomyces* sp [129,130].

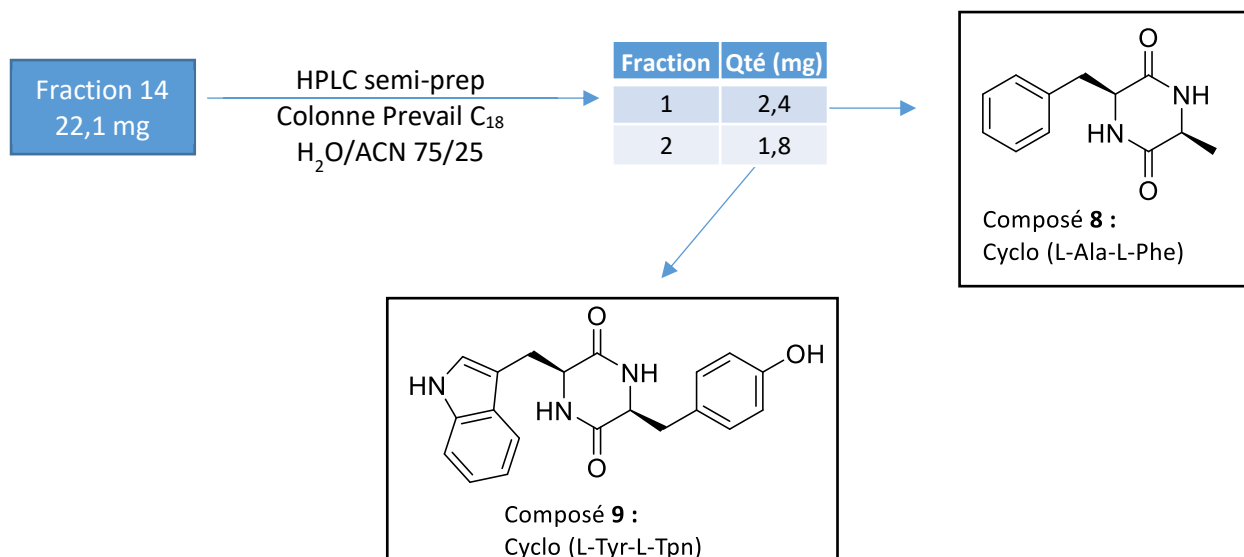


Figure 39 : Isolement des composés **8** et **9** à partir de la fraction 14

Le composé **8** a été identifié par comparaison des données spectrales obtenues en RMN ¹H et ¹³C et en spectrométrie de masse avec les données décrites dans la littérature.

La structure du composé **9** a été confirmée par synthèse à partir des 2 acides aminés correspondant (Schéma 2) : la L-tyrosine et le L-tryptophane sous sa version protégée par un groupement carboxybenzyle, L-ZTpn. Dans un premier temps le groupement carboxylique de la tyrosine a été protégé par une réaction de méthylation par le méthanol en présence de chlorure de thionyle avec un rendement quantitatif (Schéma 1). Puis les 2 acides aminés ont été condensés en présence de diisopropyléthylamine (DIPEA) et de *N,N,N',N'*-Tetraméthyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tétrafluoroborate (TBTU) pour former la liaison peptidique avec un rendement de 75 % (Schéma 2). Enfin, la cyclisation de la dicétopipérazine a été effectuée par hydrogénation catalytique avec du cyclohexène et du palladium sur charbon dans le méthanol donnant la cyclo (L-Tyr-L-Tpn) avec un rendement final de 43 % (Schéma 2).

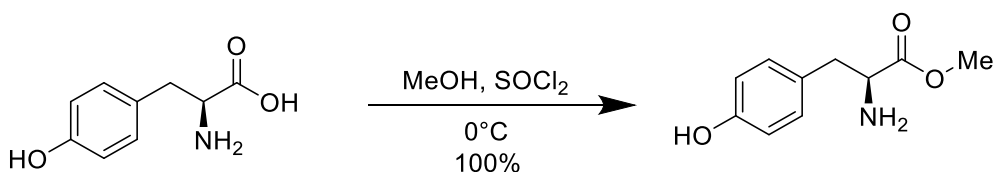


Schéma 1 : Protection de la L-Tyrosine par méthylation

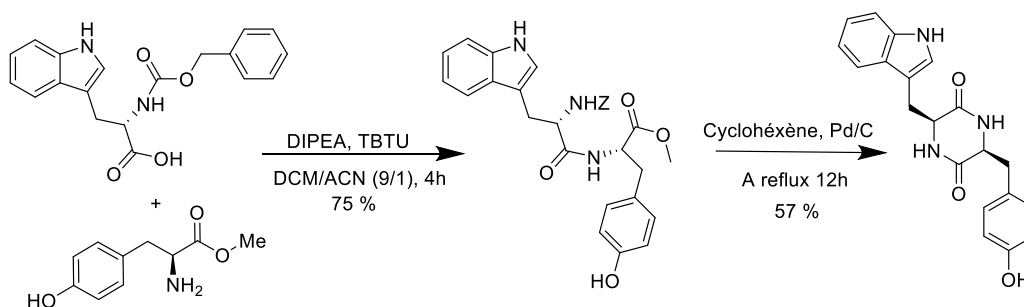


Schéma 2 : Synthèse de la cyclo (L-Tyr-L-Tpn)

Le produit obtenu a été analysé par RMN ^1H et ^{13}C ainsi que par HPLC/MS et les données ont été comparées à celles obtenues pour le composé **9** obtenu par isolement, confirmant ainsi sa structure.

6. Fraction 17

La **fraction 17** constituée de 77,8 mg a permis un deuxième isolement du composé **2** après purification par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C_{18} en utilisant un mélange éluant $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ avec un premier palier à 40% d'ACN pendant 10 min puis une montée à 100% d'ACN en 2 min et un second palier à 100% d'ACN pendant 10 min. Le produit obtenu (7,4 mg) a été purifié sur colonne de gel de silice à l'aide de dichlorométhane et 3,4 mg (0,68 mg/L de culture) du composé **2** précédemment isolé de la fraction 6 ont été récupérés (Figure 40). Il n'a pas encore été identifié à ce jour.

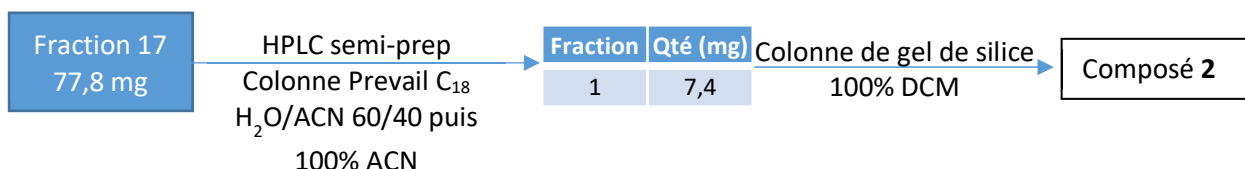


Figure 40 : Isolement du composé **2** à partir de la fraction 17

7. Fraction 18

La **fraction 18** constituée de 20,2 mg a été séparée par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C_{18} avec un gradient constitué d'un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ partant à 20% d'ACN et augmentant jusqu'à 60% d'ACN en 10 min. Cette méthode a permis d'isoler le composé **10** (3,9 mg ; 0,78 mg/L de culture) qui a été identifié comme étant le 1-(5-Deoxy- β -D-erythro-pent-4-enofuranosyl) [131] décrit pour la première fois comme étant un produit naturel (Figure 41). Ce composé est probablement issu de la déshydratation de l'adénosine [132]. La sous-fraction 2 est constituée d'un mélange de produits.

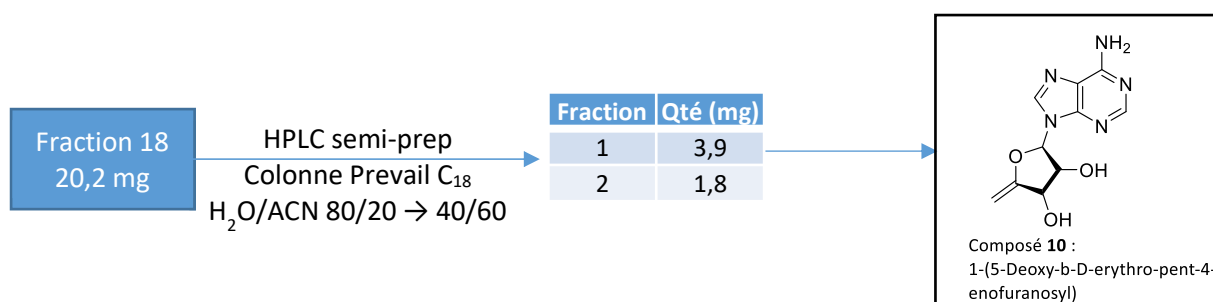


Figure 41 : Isolement du composé **10** à partir de la fraction 18

8. Fraction 19

La **fraction 19** constituée de 38,5 mg, a été fractionnée par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C₁₈ avec un mélange isocratique de solvants H₂O/ACN à 85/15. Cette méthode a permis l'obtention de 3 sous-fractions (Figure 42). Le composé **11** (7,4 mg ; 1,48 mg/L de culture) a été isolé à partir de la sous-fraction 2 et a été identifié par comparaison des données de RMN ¹H et ¹³C et de spectrométrie de masse avec les données décrites dans la littérature comme étant l'adénosine, constituant de l'ADN. Les sous-fractions 1 et 3 sont constituées de mélange de produits.

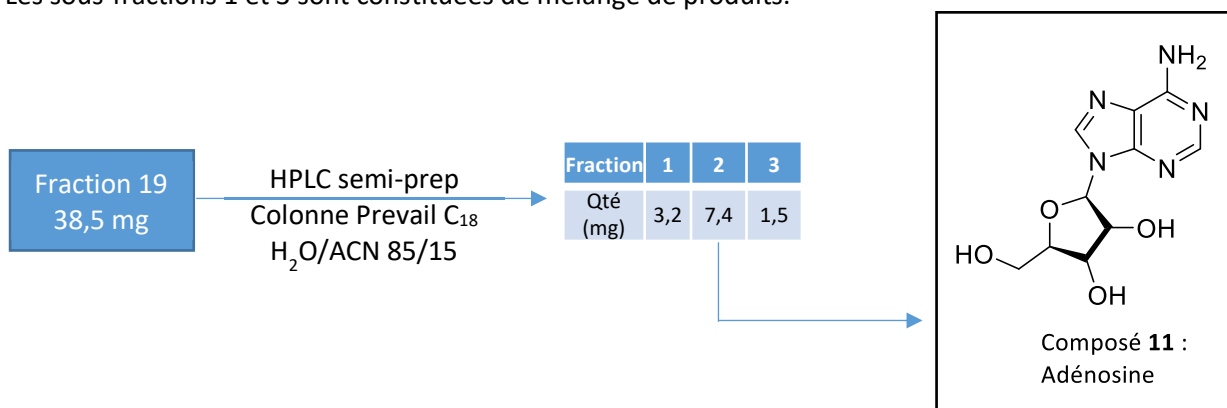


Figure 42 : Isolement du composé **11** à partir de la fraction 19

9. Fraction 21

La **fraction 21** (6,9 mg ; 1,38 mg/L de culture) était directement constituée d'un composé pur, le composé **12**, identifié comme étant la cyclo (L-OMet-L-Pro), par comparaison des données spectrales obtenues expérimentalement avec les données décrites dans la littérature (Figure 43). Il a été précédemment isolé d'une souche de *Streptomyces sp* [133].

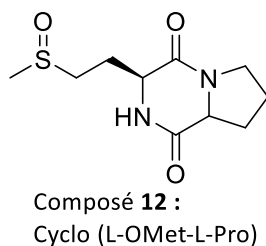


Figure 43 : Composé **12**

B. Etude de l'extract surnageant

1. Isolement des composés **13** et **14**

L'extract surnageant (137,6 mg) a tout d'abord été partitionné par une extraction liquide/liquide après avoir été repris dans du méthanol. Il a été contre-extrait trois fois par du cyclohexane. La fraction méthanolique (120,3 mg) a ensuite été fractionnée par chromatographie flash sur colonne de silice greffée en C₁₈ par un gradient de solvants constitué au départ de 80% d'eau et de 20% d'acétonitrile. Puis la proportion d'acétonitrile a été augmentée graduellement par paliers jusqu'à atteindre 100% d'ACN, ce qui a permis l'obtention de 14 fractions. La fraction 5 (16,5 mg) a mené à l'isolement de 2 nouveaux composés **13** (1,4 mg ; 0,28 mg/L de culture) et **14** (2,1 mg ; 0,42 mg/L) à partir des sous-fractions 2 et 3 obtenues après purification par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C₁₈ avec un mélange isocratique des solvants H₂O/ACN à 70/30 (Figure 44).

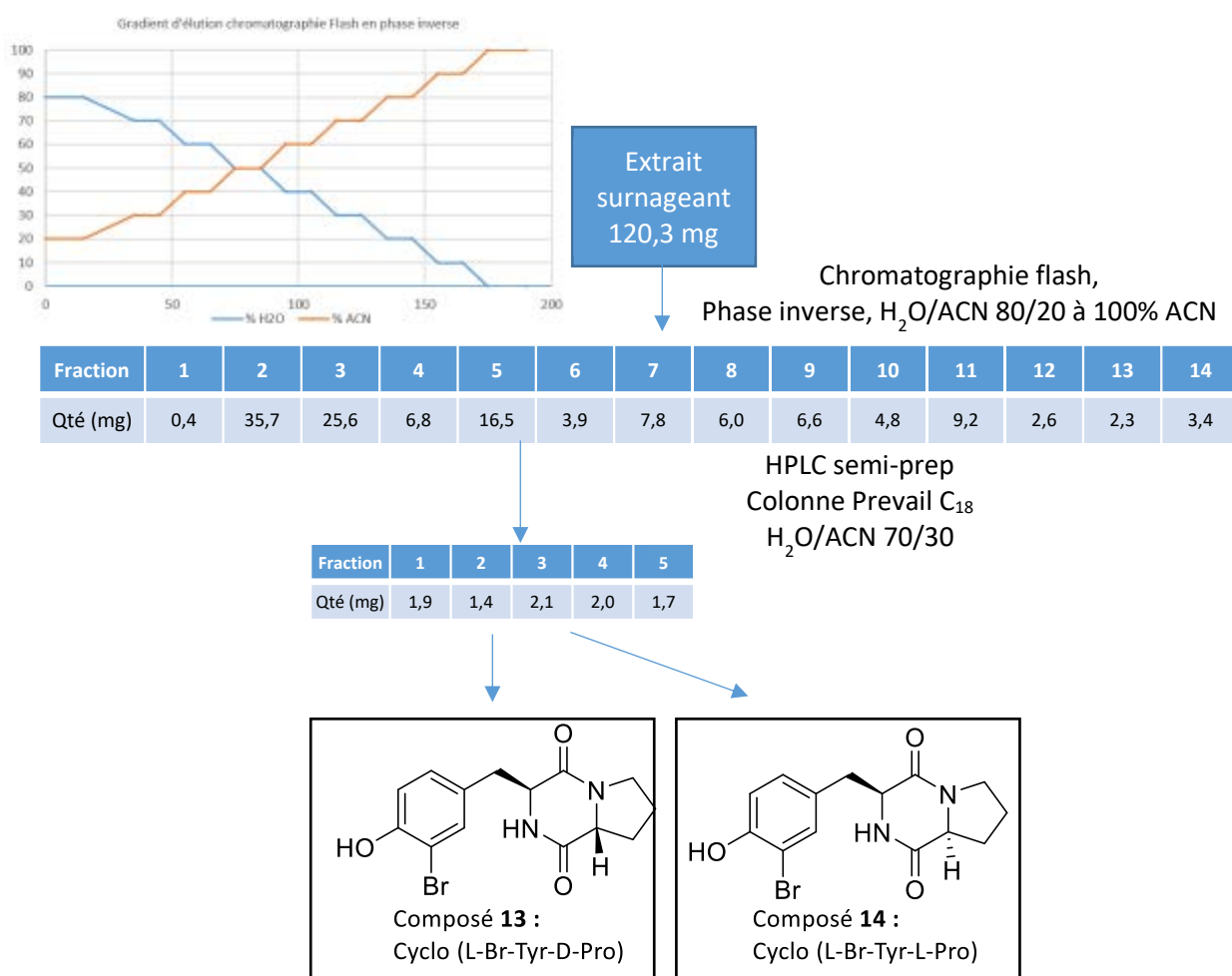


Figure 44 : Isolement des composés **13** et **14** à partir de l'extract surnageant

2. Elucidation structurale des composés **13** et **14**

L'analyse des sous-fractions 2 et 3 par LC-MS a révélé des composés avec des temps de rétention différents (23,4 min et 23,9 min) et des spectres de masse identiques possédant un massif isotopique caractéristique de composés monobromés avec un m/z à 338-340 (Figure 45).

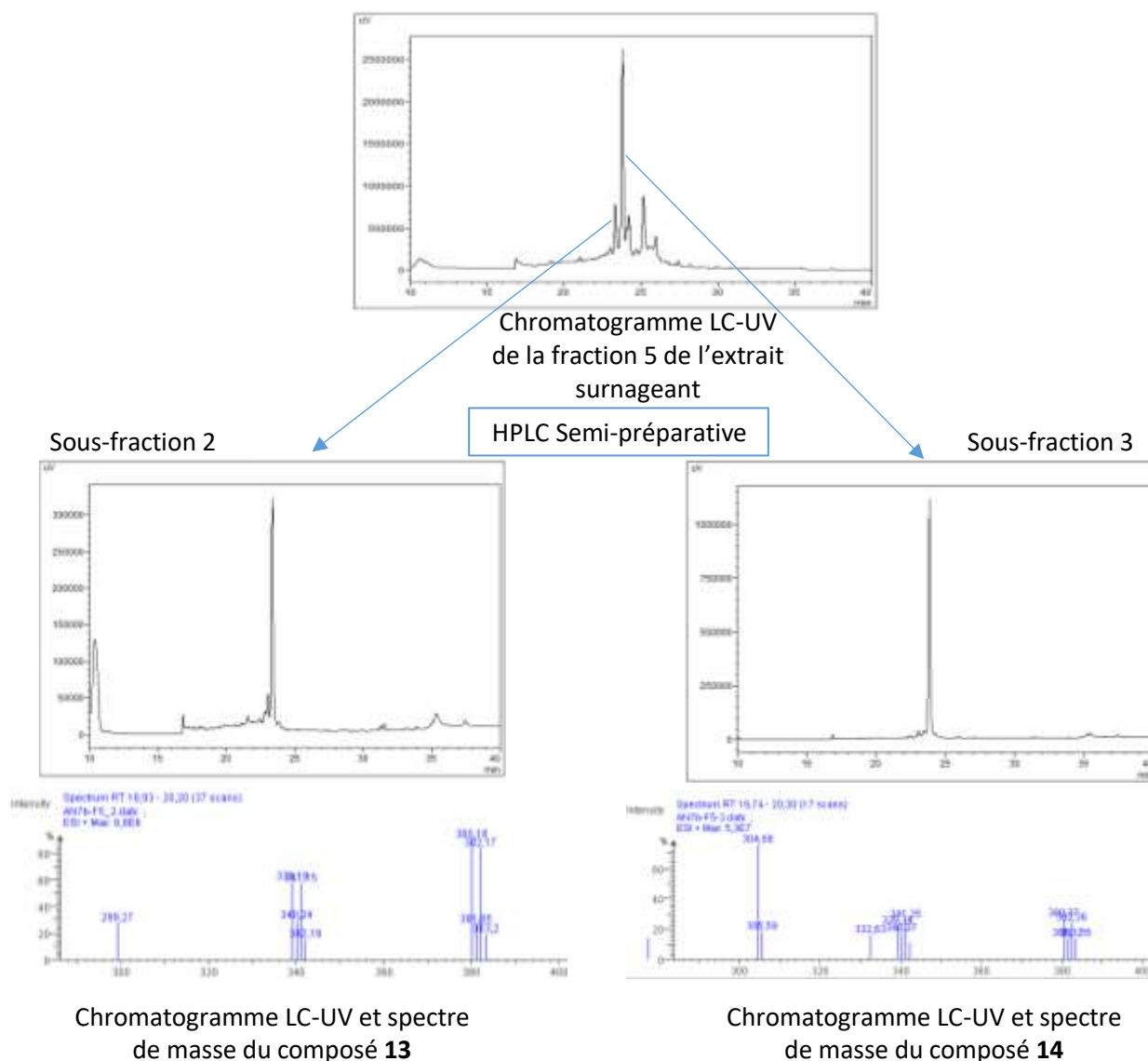


Figure 45 : Profil chimique et procédé d'isolement des composés **13** et **14**. Tous les échantillons ont été analysés à 220 nm sur une colonne Prevail C_{18} avec un gradient de H_2O (A)/acetonitrile (B) (10 min 100% de A, 30 min de 0% de B à 100% de B, 10 min 100% de B).

L'analyse des composés en HR-ESIMS (High Resolution – ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry) a donné une masse de m/z 339,0329 $[M + H]^+$, correspondant à la formule brute $C_{14}H_{15}BrN_2O_3$ (masse calculée : 339,0339) identique pour les 2 fractions.

L'analyse par RMN du proton montre des signaux similaires à ceux de la cyclo (L-Tyr-L-Pro) excepté pour les protons aromatiques. Les signaux observés en RMN du proton et du carbone 13 sont rassemblés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Données spectroscopiques RMN-¹H et RMN-¹³C des composés **13** et **14**.

No.	13		14	
	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C
1	-	-	-	-
2	-	167.3	-	166.7
3	4.14, t (4.7)	59.8	4.38, td (4.7, 2.0)	57.7
4	-	-	-	-
5	-	171.1	-	170.7
6	2.82, m	59.3	4.07, ddd (10.9, 6.3, 2.0)	60.0
7	1.70, m	29.9	1.25, m	29.5
	2.12, m		2.13, m	
8	1.95, m	22.5	1.84, m	22.6
	1.70, m			
9	3.36, m	46.2	3.38, m	45.9
	3.56, m		3.57, m	
10	2.88, dd (13.9, 4.9)	39.7	2.99, dd (14.2, 4.7)	37.1
	3.09, dd (13.9, 4.9)		3.13, dd (14.2, 4.7)	
11	-	128.9	-	129.6
12	6.98, dd (8.2, 2.1)	131.3	7.03, dd (8.3, 2.2)	131.4
13	6.83, d (8.2)	117.2	6.81, d (8.3)	116.9
14	-	110.8	-	110.6
15	-	155.0	-	154.5
16	7.29, d (2.1)	135.5	7.35, d (2.2)	135.4

La valeur du déplacement chimique de C-15 sur le spectre RMN-¹³C et la forme caractéristique du massif isotopique sur le spectre de masse confirment la présence d'un brome dans la structure. Tout d'abord, les signaux en RMN du proton et le déplacement chimique de H-3 et H-6 ainsi que la présence de 2 fonctions carbonyles (C-2 δ = 166.7, C-5 δ = 170.7) témoignent d'une structure de type dicétopiperazine. Ensuite, les corrélations COSY entre les protons H-6, H-7, H-8, et H-9 établissent la présence d'une chaîne alkyle. Cette chaîne est connectée à une fonction carbonyle grâce à une corrélation HMBC entre H-7 et C-5 correspondant ainsi au groupement proline. Les signaux aromatiques sur le spectre RMN du proton (H-12, H-13, et H-16) sont caractéristiques d'un groupement phényle meta- para- disubstitué, et les déplacements chimiques de C-15 (δ : 154.5) et C-14 (δ : 110.6) montrent la présence d'un groupement hydroxyle et d'un atome de brome, respectivement. Les corrélations COSY entre H-10 et H-3 ainsi que les corrélations HMBC entre H-10 et C-3 et C-2 témoignent de la liaison entre le cycle aromatique et le cycle dicétopipérazine. La structure du composé **14**, obtenu sous la forme d'une poudre blanche a été ainsi établie comme montré dans la figure 46.

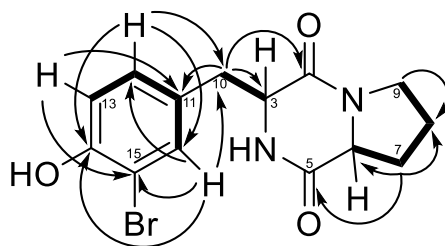


Figure 46 : Corrélations HMBC et COSY du composé **14**

Le composé **13** a également été obtenu sous la forme d'une poudre blanche et sa formule brute est identique à celle du composé **14**. Son spectre RMN-¹H présente les mêmes signaux que ceux indiqués pour le composé **14** mais avec quelques modifications dans les déplacements chimiques, et plus particulièrement pour H-3, H-6, H-7, et H-10 (Tableau 17). Ces données indiquent que ces composés sont deux diastéréoisomères. Dans le but de décrire la stéréochimie des composés leur synthèse a été réalisée.

3. Synthèse des composés **13** et **14**

La synthèse de la cyclo (L-Pro-L-Br-Tyr) **14** et de l'un de ses diastéréoisomère, la cyclo (D-Pro-L-Br-Tyr) **13** débute avec la bromation de la L-tyrosine avec du Br₂ dans des conditions acides. Par la suite, la fonction amine a été protégée en formant un dérivé *N*-Boc en présence de bicarbonate de sodium ce qui a abouti à l'intermédiaire **17** avec un excellent rendement sur 2 étapes. La L-Br-Tyrosine protégée par le *N*-Boc (**17**) a ensuite été condensée avec soit la L-Proline soit la D-Proline en présence de l'agent couplant TBTU (*O*-(1H-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluronium tetrafluoroborate) et de la base de Hünig DIPEA (*N,N*-Diisopropyléthylamine) pour donner les composés **19a** (60%) et **19b** (20%), respectivement. Finalement, la fermeture du cycle est réalisée dans l'eau chauffée à 130°C pendant 4h, donnant ainsi les composés **13** et **14** avec des rendements modérés de 64% et 36%, respectivement. La synthèse de **13** et **14** est présentée dans le schéma 3.

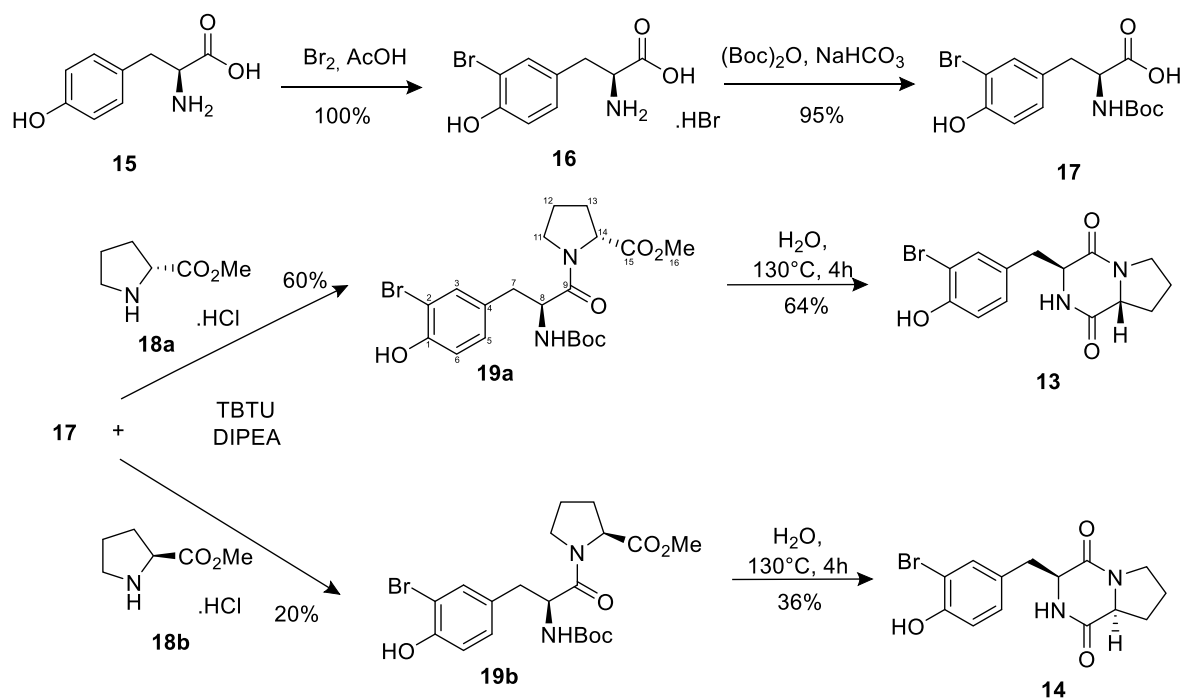


Schéma 3 : Synthèse de la cyclo (D-Pro-L-Br-Tyr) (**13**) et de la cyclo (L-Pro-L-Br-Tyr) (**14**). TBTU: (O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate), DIPEA: (N,N-Diisopropyléthylamine)

Les données de RMN- ^1H de la cyclo (D-Pro-L-Br-Tyr) et de la cyclo (L-Pro-L-Br-Tyr) obtenue par la synthèse sont identiques à celles des composés **13** et **14** isolés de la culture, confirmant ainsi la stéréochimie de ces produits. La présence de la fonction amide est mise en évidence par l'apparition d'un signal N-H à 9.54 ppm pour le composé **13** dans le $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ et à 8.72 ppm pour le composé **14** dans le $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Molecules* [134].

C. Autres composés isolés

1. A partir de la culture en erlenmeyer à grande échelle dans le milieu TY

L'extrait de résine obtenu suite à la culture de la souche **DP94** en erlenmeyer (547,6 mg) (décrite dans la partie 2, C., 3. Confirmation à grande échelle, p. 52) a également été fractionné par chromatographie flash sur colonne de gel de silice. Le mélange de solvants utilisé débute avec du dichlorométhane (DCM) et du cyclohexane à 50/50 jusqu'à 100% de DCM puis de l'acétate d'éthyle (AcOEt) est ajouté de façon progressive jusqu'à 100% d'AcOEt et enfin du méthanol est ajouté jusqu'à un maximum de 20%. Cette méthode a permis l'obtention de 20 fractions. La fraction 7 (31,5 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C₁₈ avec un gradient de solvant eau/acétonitrile partant de 100% d'eau puis augmentant de 0 à 60% d'ACN en 20 min. Ainsi, le composé **20** a été isolé (4,3 mg ; 0,86 mg/L de culture) et identifié par comparaison des données spectroscopiques obtenues par RMN ¹H et ¹³C et par spectrométrie de masse avec les données décrites dans la littérature comme étant la cyclo (L-Leu-L-Pro). Ce composé a déjà été isolé d'une Actinobactérie, une souche de *Streptomyces* sp [126] (Figure 47).

La fraction 12 (83,8 mg, 16,76 mg/L) a donné directement le composé **21** avec une pureté suffisante pour l'identifier. Il s'agit de la cyclo (L-Tyr-L-Pro) qui a également déjà été isolée à partir de diverses souches de *Streptomyces* [128,133,135]. Elle a également été identifiée par comparaison des données spectroscopiques obtenues par RMN ¹H et ¹³C et par spectrométrie de masse avec les données décrites dans la littérature.

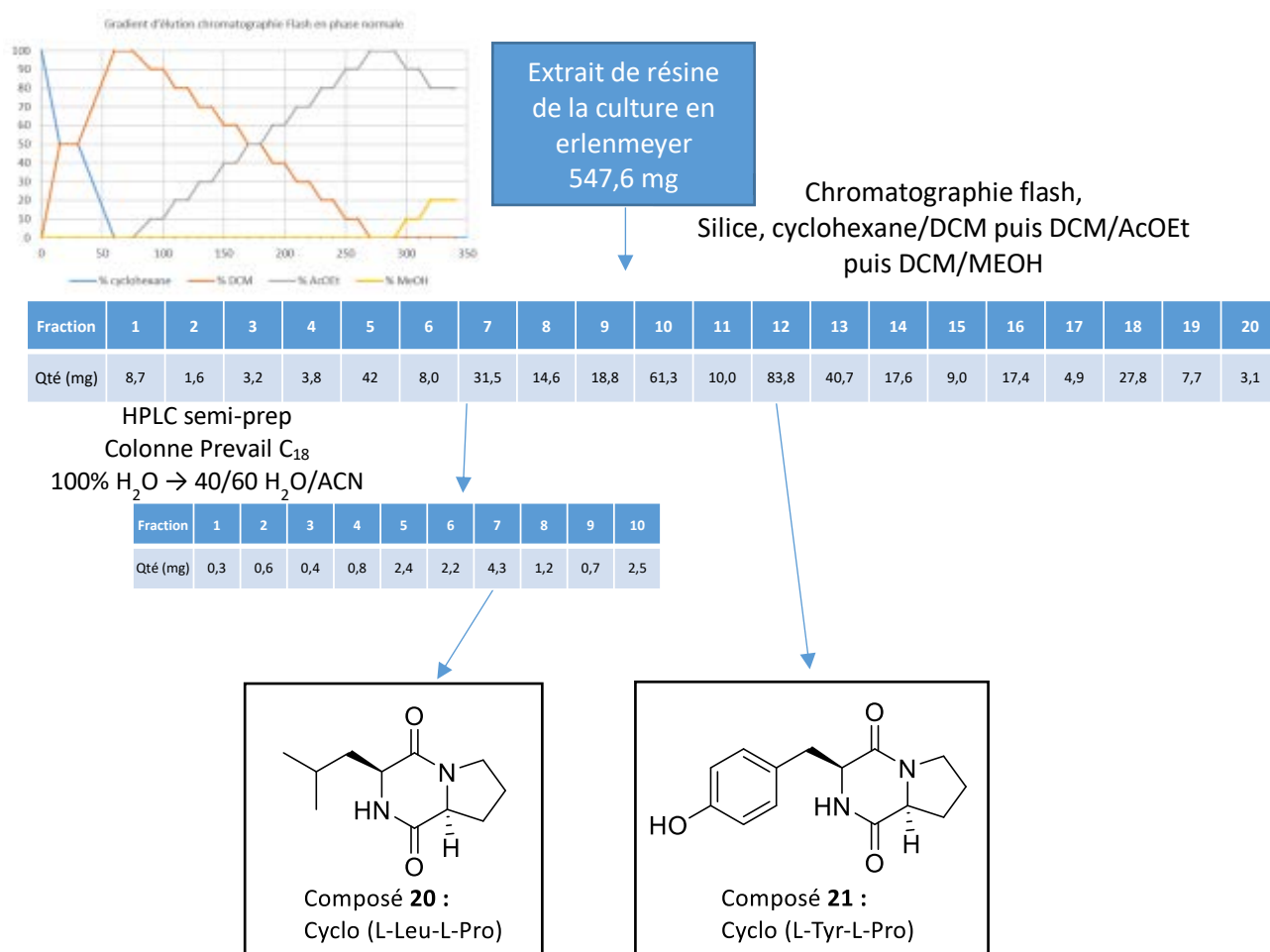


Figure 47 : Isolement des composés **20** et **21** à partir de l'extrait de résine de la culture réalisée en erlenmeyer

2. A partir d'une culture du plan d'expérience

Les analyses des chromatogrammes HPLC des extraits obtenus lors de la réalisation du plan d'expérience précédemment décrit, ont mis en évidence un composé non encore isolé présent en grande quantité dans l'une des expériences (expérience n°1). L'extrait de résine obtenu avec la première expérience (milieu TY, pH 6, 25°C, 1% d'inoculum et 150 rpm) (365,2 mg) a donc été fractionné par chromatographie flash sur colonne de gel de silice. Le mélange éluant utilisé débute à 100% de cyclohexane, redescend rapidement à 50/50 cyclohexane/DCM puis à 100% de DCM. Comme précédemment l'AcOEt est ensuite ajouté progressivement jusqu'à 100% d'AcOEt. Enfin le méthanol est ajouté jusqu'à une proportion de 20% dans l'AcOEt. Grâce à cette méthode 22 fractions ont été obtenues et la fraction 21 (10,5 mg) était constituée d'un composé pur, le composé **22**, identifié comme étant l'adénine (Figure 48).

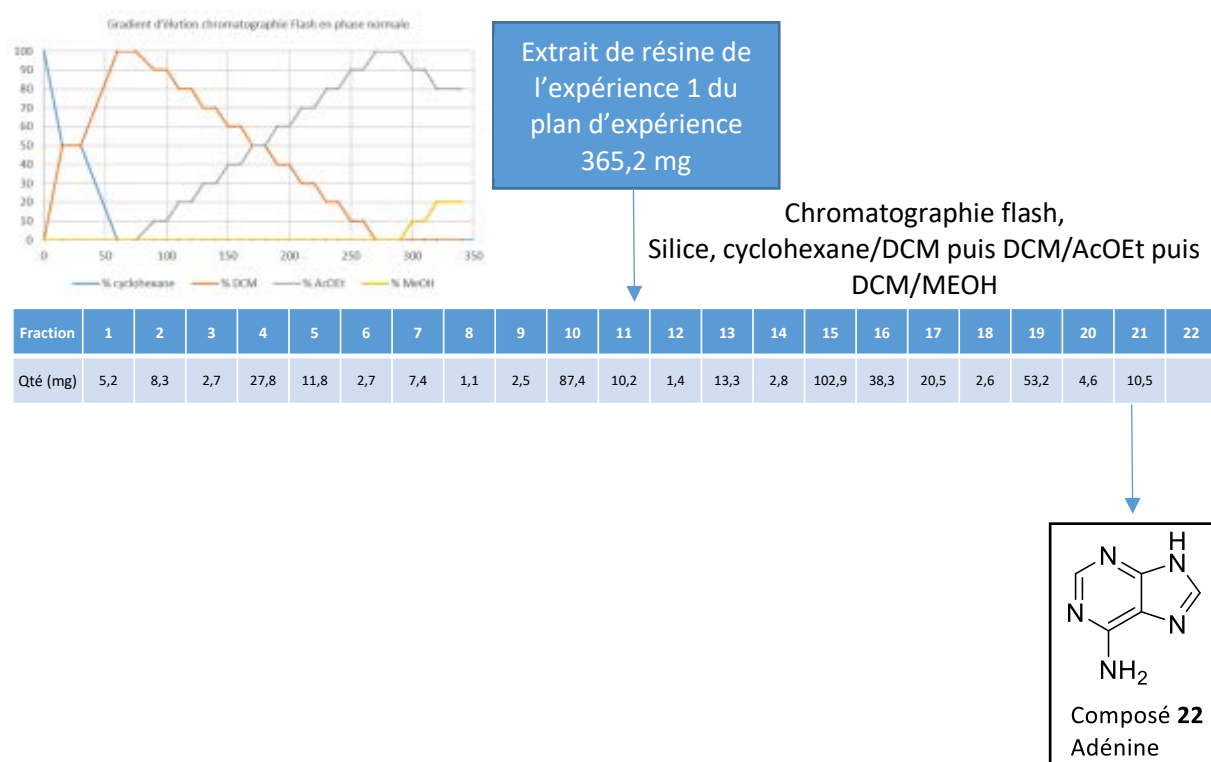


Figure 48 : Isolement du composé **22** à partir de l'extrait de résine de l'expérience 1 du plan d'expérience

D. Activités des produits isolés

1. Evaluation de l'activité biologique des composés nouveaux

L'activité cytotoxique des 2 nouvelles dicétopipérazines synthétisées a été évaluée sur deux lignées cellulaires différentes : HaCaT (kératinocyte humain) et B16 (mélanome murin) (Tableau 18). Pour les deux composés la CI_{50} était $>200 \mu\text{g/mL}$.

Les intermédiaires de synthèse **19a** et **19b** sont décrits pour la première fois dans ces travaux ; leur activité cytotoxique a également été déterminée. Seulement l'un d'eux, le **19b**, a montré une activité intéressante sur les 2 lignées cellulaires HaCaT ($CI_{50} 7 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$) et B16 ($CI_{50} 18 \pm 5 \mu\text{g/mL}$).

Tableau 18 : Activité cytotoxique des composés **13**, **14**, **19a** et **19b**

Composés		13	14	19a	19b
$CI_{50} (\mu\text{g/mL})$	HaCaT	>200	>200	>200	$7 \pm 2,5$
	B16	>200	>200	>200	18 ± 5

2. Evaluation de l'activité biologique des composés connus

Dans les paragraphes suivants seront présentées les activités biologiques connues des principaux composés isolés.

Ainsi, la cyclo (L-Val-L-Pro) (**4**) a présenté des activités moyennes d'inhibition de la croissance bactérienne sur plusieurs souches d'origine marine avec notamment une CMI de $200 \mu\text{g/mL}$ sur *Loktanella hongkongensis*. Ce composé inhibe également le développement des larves de bernacle *Balanus amphitrite* avec une CE_{50} à $37 \mu\text{g/mL}$ [136]. Elle a également été décrite comme activatrice des biorapporteurs de la N-acylhomoserine lactone (AHL) qui est impliqué dans le « quorum-sensing » avec une concentration minimale pour activer le biorapporteur de $2,5 \text{ nM}$. Elle active également l'expression des protéines vertes de fluorescence chez *Vibrio anguillarum* DM27 [137].

La cyclo (L-Tyr-L-Pro) (**21**) a montré des activités herbicides sur des feuilles de centaurée tachetée à 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} M [138]. Elle est également bien impliquée dans le « quorum-sensing » en inhibant la N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, un médiateur connu de la communication entre les bactéries. La cyclo (L-Tyr-L-Pro) inhibe la lumière émise par *Escherichia coli* pSB401, ce phénomène étant lié à l'action de la 3-oxo-C6-HSL sur le récepteur LuxR avec une DI_{50} de $0,9 \text{ mM}$. Elle active également le biosenseur d'*Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pDC141E33) [139,140].

La cyclo (Ala-Phe) (**8**) a été décrite comme composé antifouling. Elle inhibe notamment la colonisation des zoospores de *Ulva pertusa* avec une CE_{50} de $2,2 \mu\text{g/mL}$ et celle des diatomés de *Navicula annexa* ($CE_{50} = 0,8 \mu\text{g/mL}$) [129].

La cyclo (L-Tyr-L-Tpn) (**9**) a précédemment démontré des activités antibiotiques envers un certain nombre de bactéries avec des CMI de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/mL}$ et de champignons avec des CMI de l'ordre de la centaine de $\mu\text{g/mL}$ [141].

La cyclo (L-Leu-L-Pro) (**20**) a une activité antibiotique notamment envers les entérocoques résistants à la vancomycine avec des CMI de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/mL}$. Elle présente également une activité anti-mutagène sur des souches de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 avec 50% d'inhibition du nombre de colonies mutantes à une concentration de 1 $\mu\text{g/boite}$ [142]. Un autre article décrit des propriétés antibiotiques moyennes avec des CMI de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/mL}$ envers 2 souches bactériennes et de la centaine de $\mu\text{g/mL}$ envers *Escherichia coli* et avec des CMI de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/mL}$ envers 5 souches fongiques [143]. Lorsqu'elle est associée à la cyclo (Phe-Pro), un effet synergique est observé sur l'activité antibiotique. Les CMI sont alors diminuées d'un log et ces deux composés permettent une radioprotection de différentes lignées cellulaires. En présence de 1 $\mu\text{g/mL}$ de cyclo (L-Phe-L-Pro) + cyclo (L-Leu-L-Pro) le nombre de cellules survivantes à une exposition à des radiations est augmenté, il passe à 90% alors qu'il est à 50% sur le contrôle [144]. Ce composé a également la capacité d'inhiber partiellement la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* à une concentration de 1 mg/mL et totalement à 3,5 mg/mL [145]. Il possède enfin des propriétés antifongiques avec des CMI de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$ sur *Mucor ramannianus* IAM 6218, *Rhizoctonia solani* IFO 6218, *Pyricularia oryzae* IFO 5994, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 18749 et *T. rubrum* ATCC 44766 [146].

La cyclo (L-Tyr-D-Pro) (**7**) a montré des activités antibiotiques avec des CMI de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/mL}$ contre des bactéries et des champignons [143]. Une seconde étude reporte ses propriétés antibiotiques avec des CMI entre 16 et 32 $\mu\text{g/mL}$ envers différentes souches bactériennes et un effet synergique de cette activité lorsque la cyclo (L-Tyr-D-Pro) est utilisée en association avec la cyclo (L-Leu-L-Pro) (**20**) (CMI entre 1 et 4 $\mu\text{g/mL}$) et la cyclo (L-Leu-D-Pro) (CMI entre 0,5 et 8 $\mu\text{g/mL}$) [147].

Il n'y a aujourd'hui aucune activité décrite pour la cyclo (L-Omet-L-Pro) (**12**).

L'adénine (**22**) et l'adénosine (**11**) sont des métabolites primaires impliqués dans la constitution de l'ADN et de nombreux constituants cellulaires. L'adénosine est par exemple impliquée dans les transferts d'énergie au sein de l'organisme par le biais de l'ATP (Adénosine TriPhosphate). Elle est également responsable d'un certain nombre d'activités physiologiques par l'intermédiaire des nombreux récepteurs à l'adénosine (A, A2a, A2b, A3) qui se retrouvent principalement au niveau du système nerveux central, des bronches, du cœur et des vaisseaux, des plaquettes et enfin ils ont un rôle dans l'inflammation [148]. Le composé (**10**), isolé pour la première fois à partir d'une source naturelle [149] a été décrit chez les bactéries comme un produit de dégradation de la coenzyme B12 ou adénosylcobalamine, obtenu par l'action de la lumière et d'un facteur de transcription nommé CarH [150]. Il existe notamment un de ses dérivés plus connu pour ses propriétés antibactériennes. Il s'agit de l'angustmycin A (ou decoyinine) qui est elle-même isolée à partir d'un *Streptomyces hygroscopicus* var *decoyicus* existant en équilibre avec son équivalent hydraté : la psicofuranine (Figure 49) [132].

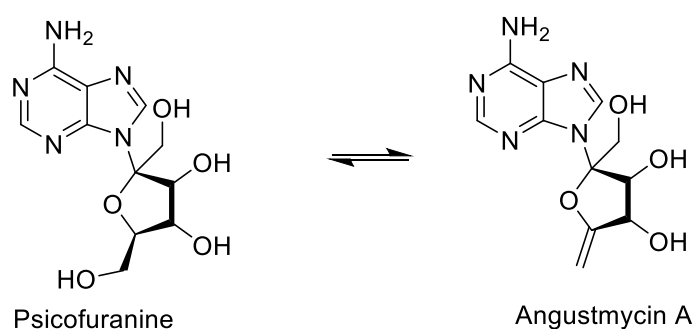


Figure 49 : Structures de la psicofuranine et son équivalent déshydraté l'angustmycine A

Un dérivé de l'auxine, l'indole 3-carbaldéhyde (**1**) a également été isolé. Ce composé a montré une activité antiparasitaire notamment par l'inhibition de la croissance de *Trypanosoma cruzi*, parasite responsable de la maladie de Chagas, avec une CI_{50} de 26,9 μ M [151] ainsi que par l'inhibition des zoospores de *Phytophthora capsici*, un phytopathogène impliqué dans la destruction de cultures de poivrons. Il inhibe 100 % de la germination des zoospores à 500 ppm [152]. Des études démontrent également une activité antibactérienne à plusieurs reprises contre *Staphylococcus aureus* (CMI = 32 μ g/ml), *Enterococcus faecium* (CMI = 32 μ g/ml), *Escherichia coli* (CMI = 64 μ g/ml) et *Legionella pneumophila* (CMI = 100 μ g/mL) [125,153]. Il inhibe les biofilms bactériens formés par *Vibrio cholerae* O3 à hauteur de 65 % à une concentration de 25 μ g/mL, avec une CMI de 50 μ g/mL sur *V. cholerae* [154], celui de *Vibrio parahaemolyticus* est inhibé à 71% et 89% à 200 et 400 μ g/mL respectivement [155]. Le biofilm d'*Escherichia coli* O157:H7 est inhibé 11 fois en présence de l'indole-3-carbaldéhyde à 100 μ g/mL et celui de *P. aeruginosa* PAO1 est inhibé 1,9 fois. Ces activités inhibitrices de la croissance bactérienne sont notamment liées à la capacité de l'indole 3-carbaldéhyde à moduler la cascade du « quorum sensing », dans le cas de *Vibrio*. L'indole-3-carbaldéhyde stimule les récepteurs opaR qui régulent la capacité de former des biofilms (stimule la production de capsule et inhibe la production de flagelles latéraux) [154,155].

Puisqu'aucune activité cytotoxique n'a été déjà mentionnée, tous les composés isolés ont été testés sur les lignées cellulaires B16 et HaCaT. Les résultats sont présentés dans le tableau 19 ci-dessous.

Tableau 19 : Résultats des tests de cytotoxicité des composés isolés **1-12** et **20-22** sur cellules HaCaT et B16

Composé	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CI_{50} B16 (μ g/mL)	72 $\pm$ 6	63 $\pm$ 1	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
CI_{50} HaCaT (μ g/mL)	79 $\pm$ 6	31 $\pm$ 3	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
Composé	10	11	12	20	21	22			
CI_{50} B16 (μ g/mL)	150 $\pm$ 6	>200	>200	>200	>200	>200			
CI_{50} HaCaT (μ g/mL)	100 $\pm$ 22	>200	>200	>200	>200	>200			

Les composés isolés ne présentent que peu ou pas d'activité cytotoxique. Ces résultats sont notamment surprenants pour le composé **10** pour lequel on aurait pu imaginé une réaction d'addition de Mickaël sur l'ADN. Le produit a été testé une seconde fois et a présenté une CI_{50} > 200, donc une augmentation, cela peut être expliqué par une hydratation du composé en adénosine par l'eau présente dans le DMSO (solvant utilisé pour les tests biologiques).

E. Variation de la communication suivant les conditions de culture

Comme vu précédemment lors de l'optimisation de la culture de la souche **DP94**, on constate une variation de la production bactérienne en fonction des différents milieux de cultures utilisés. Les composés isolés ont été repérés sur les profils chimiques obtenus dans les différents milieux montrant ainsi de façon concrète les variations de la production. Ils ont tout d'abord été situés sur le chromatogramme de l'extrait de résine brut à partir duquel la plupart des composés (**1 – 11**) ont été isolés. On peut déjà remarquer que l'on ne retrouve pas tous les composés, par exemple les dicétopipérazines bromées **13** et **14** isolées à partir de l'extrait surnageant ne sont pas présentes dans cet extrait de résine (Figure 50).

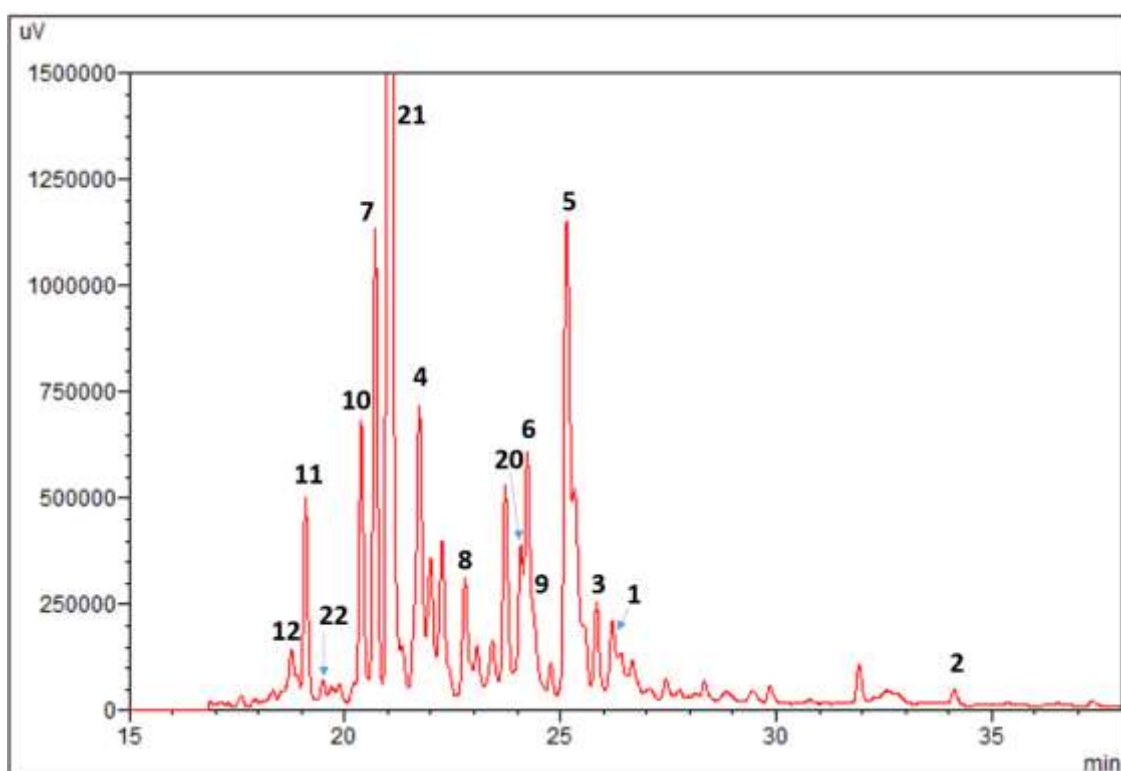


Figure 50 : Chromatogramme de l'extrait de résine à 220 nm. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.

Les composés isolés (**1 – 21**) ont ensuite été repérés sur les chromatogrammes obtenus lors des essais d'optimisation (Figure 51). Nous constatons que le profil chimique de la souche **DP94** dans le milieu ISP2 est différent de celui obtenu avec TY. Les composés majoritaires de l'extrait de résine de la culture dans le milieu TY (**5**, cyclo (L-Tyr-D-Pro) **7** et cyclo (L-Tyr-L-Pro) **21**) ne sont par exemple que très peu présents voir complètement absents de ce chromatogramme. Les composés en début de gradient dont la concentration évolue au cours du temps sont identifiés comme étant le 1-(5-Deoxy-β-D-erythro-pent-4-enofuranosyl) (**10**) et l'adénosine (**11**). Il semble que la concentration en adénosine augmente au fil des jours au détriment du composé **10**.

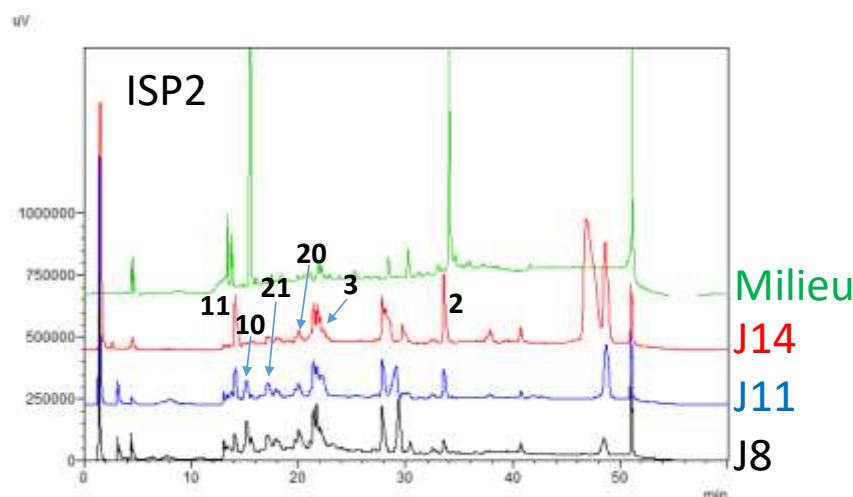


Figure 51 : Chromatogrammes des extraits obtenus dans le milieu ISP2 lors de la sélection du milieu de culture à 220 nm. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.

Lors de la culture de la souche bactérienne dans le milieu MB, la différence est encore plus flagrante et la production est complètement inhibée. Le seul composé isolé identifié sur ce chromatogramme est le composé **2** dont la structure n'est pas encore identifiée (Figure 52).

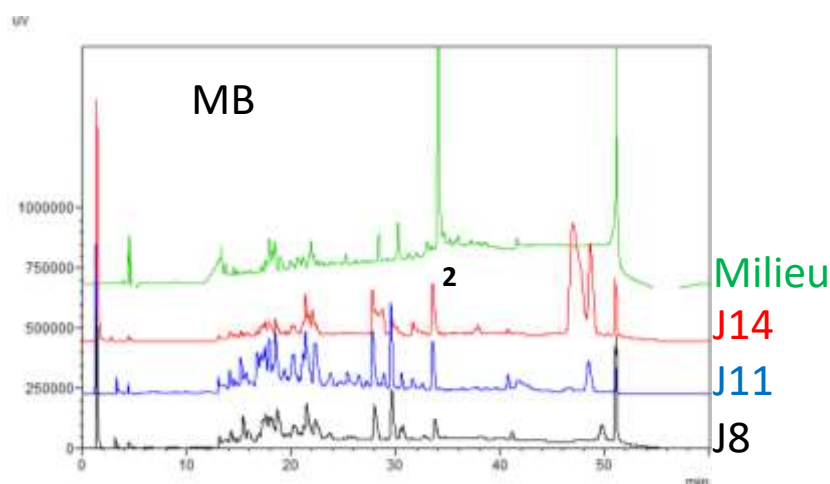


Figure 52 : Chromatogrammes des extraits obtenus dans le milieu MB lors de la sélection du milieu de culture à 220 nm. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm.

A contrario, la production bactérienne dans le milieu LB est très similaire à celle dans le milieu TY. De nombreux composés isolés sont retrouvés sur le chromatogramme, notamment les composés majoritaires (**2, 4 – 7, 10, 20 – 21**). Cette similarité du profil chimique est peut-être en lien avec l'activité de ces extraits car comme précédemment expliqué les extraits les plus cytotoxiques étaient ceux obtenus dans les milieux TY et LB (Figure 53).

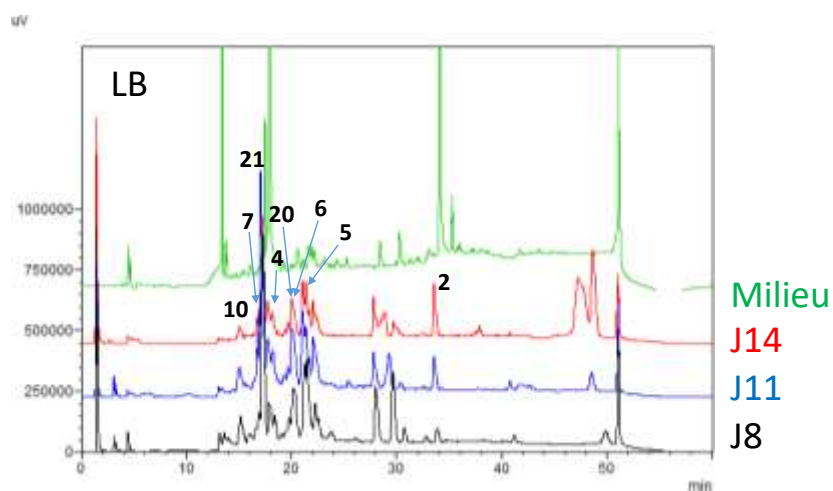


Figure 53 : Chromatogrammes des extraits obtenus dans le milieu LB lors de la sélection du milieu de culture à 220 nm. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm

F. Conclusion

Tous ces travaux d'isolement et de comparaison des profils chimiques ont permis d'isoler 17 composés dont 13 ont été identifiés aujourd'hui. Parmi ceux-là on retrouve 9 dicétopipérazines (**4**, **7-9**, **12-14**, **20-21**) qui sont des composés couramment retrouvés dans les productions bactériennes, dont 2 sont nouvellement décrites (**13** et **14**). Plusieurs activités sont attribuées à ces dérivés dicétopipérazines et sont résumées dans l'article d'Alan Borthwick [156]. On peut citer notamment une inhibition de la phosphodiesterase 5 (PDE 5) impliquée dans les troubles de l'érection, des propriétés anti-cancéreuses, anti-virales, antibiotiques et antifongiques, l'inhibition des métalloprotéinases, ainsi que des effets neuroprotecteur, anxiolytique et anti-inflammatoire. Les composés isolés lors de ce travail sont plutôt décrits pour leur implication dans le « quorum-sensing » qui est un terme pour désigner la communication entre les bactéries par la production et la détection de petites molécules chimiques. Ces signaux permettent la régulation des facteurs de virulence et de la prolifération. Le composé **1**, un dérivé de l'auxine est lui aussi connu pour son implication dans le quorum-sensing. Enfin les composés **10**, **11** et **22** sont des dérivés amino-puriques couramment retrouvés chez les organismes vivants.

Cependant ces composés isolés n'ayant pas permis d'expliquer l'activité de l'extrait brut, nous avons procédé à différentes analyses. Les profils chimiques ont été comparés et des études par réseaux moléculaires ont été réalisées permettant de mettre en évidence des composés potentiellement actifs.

Scène 4 : Ciblage des composés bioactifs

A. Analyse des échantillons par réseaux moléculaires

La première culture en grande quantité dans le milieu TY réalisée en erlenmeyer (5,4 L, 130 rpm, 25 °C, 11 jours de culture) décrite en II. C. 3. (Confirmation des résultats à grande échelle, p. 52) présentait une activité cytotoxique intéressante sur la lignée cellulaire B16.

Tableau 20 : Quantité d'extrait, rendements et activité cytotoxique des extraits obtenus par culture à grande échelle dans le milieu TY

Milieu	Extrait	Quantité (mg)	Rendement (mg/L)	Cl ₅₀ (µg/mL)	
				B16	HaCaT
TY	Extrait de résine	547,6	101,4	>200	>200
	Extrait surnageant	86,8	16,1	4,6 ± 1,8	8 ± 1.5

L'extrait surnageant montrant la plus forte activité nous avons procédé à son fractionnement par chromatographie Flash sur colonne de gel de silice avec un mélange éluant constitué de cyclohexane/DCM puis de DCM/AcOEt et enfin de AcOEt/MeOH ce qui a conduit à l'obtention de 26 fractions. Celles-ci ont été testées sur les 2 lignées cellulaires habituelles HaCaT et B16.

Tableau 21 : Récapitulatif des fractions obtenues et leur activité cytotoxique

Fraction	Quantité (mg)	Cl ₅₀ sur B16 (µg/mL)	Cl ₅₀ sur HaCaT (µg/mL)
1	7,2	>200	>200
2	2,9	>200	>200
3	2	143 ± 4	73 ± 6
4	1,9	146 ± 8	115 ± 0
5	2	>200	>200
6	3	197 ± 29	74 ± 0
7	1	>200	>200
8	7,2	95	78
9	2	83	125
10	3,4	8,5	0,9
11	11,9	38	98
12	4,3	>200	>200
13	8,8	183 ± 9	>200
14	3,4	150 ± 7	11 ± 5
15	6,9	158 ± 24	83 ± 33
16	2,2	>200	>200
17	6,5	184 ± 20	>200
18	18,1	108 ± 14	>200
19	7,6	79 ± 0	147 ± 21
20	3,7	>200	>200
21	11,7	>200	>200
22	6,6	>200	>200
23	3,4	145 ± 15	>200
24	4,2	>200	>200
25	14,2	>200	160 ± 37
26	5,4	>200	>200

Chaque fraction a été analysée par HPLC/MS/MS à la plateforme P2M2 de l'INRA de Rennes. L'analyse HPLC est réalisée sur la colonne Prevail C₁₈ habituellement utilisée dans notre laboratoire avec un gradient d'eau + 0,1 % d'acide formique/acétonitrile + 0,1 % d'acide formique. L'analyse MS/MS est effectuée en sortie de colonne par un analyseur de type quadripôle. Les données ainsi obtenues ont été analysées sur la plateforme GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) où les spectres de fragmentation obtenus expérimentalement vont être analysés et comparés entre eux d'une part et comparés d'autre part par rapport à des bases de données. Les spectres sont ensuite regroupés par similarité de fragmentation, donnant ainsi des clusters qui correspondent alors à un ensemble de composés ayant des structures proches.

Les fractions ont été regroupées en 5 groupes selon leur Cl₅₀ sur B16.

Tableau 22 : Répartition des fractions dans les différents groupes suivant leur activité cytotoxique

Groupe	Couleur	Valeur de la Cl ₅₀	Fractions incluses
Groupe 1	Rouge	Cl ₅₀ < 10 µg/mL	F10
Groupe 2	Orange	10 < Cl ₅₀ < 50 µg/mL	F11
Groupe 3	Jaune	50 < Cl ₅₀ < 100 µg/mL	F8, F9, F19
Groupe 4	Gris	100 < Cl ₅₀ < 200 µg/mL	F3, F4, F6, F13, F14, F15, F17, F18, F23
Groupe 5	Bleu	Cl ₅₀ > 200 µg/mL	F1, F2, F5, F7, F12, F16, F20, F21, F22, F23, F24, F25, F26

La plateforme GNPS fournit une liste de clusters, ceux-ci sont ensuite visualisés par le logiciel Cytoscape. Chaque ion détecté est représenté par un nœud, une couleur est attribuée à chaque groupe et les nœuds sont colorés selon le groupe à partir duquel ils proviennent. Ainsi nous avons recherché les clusters avec une forte proportion de rouge ou orange, qui seront donc constitués essentiellement d'ions présents dans les fractions actives. On peut donc supposer que ces ions ont un rôle dans l'activité de l'extrait. L'étude a été réalisée en mode positif et en mode négatif.

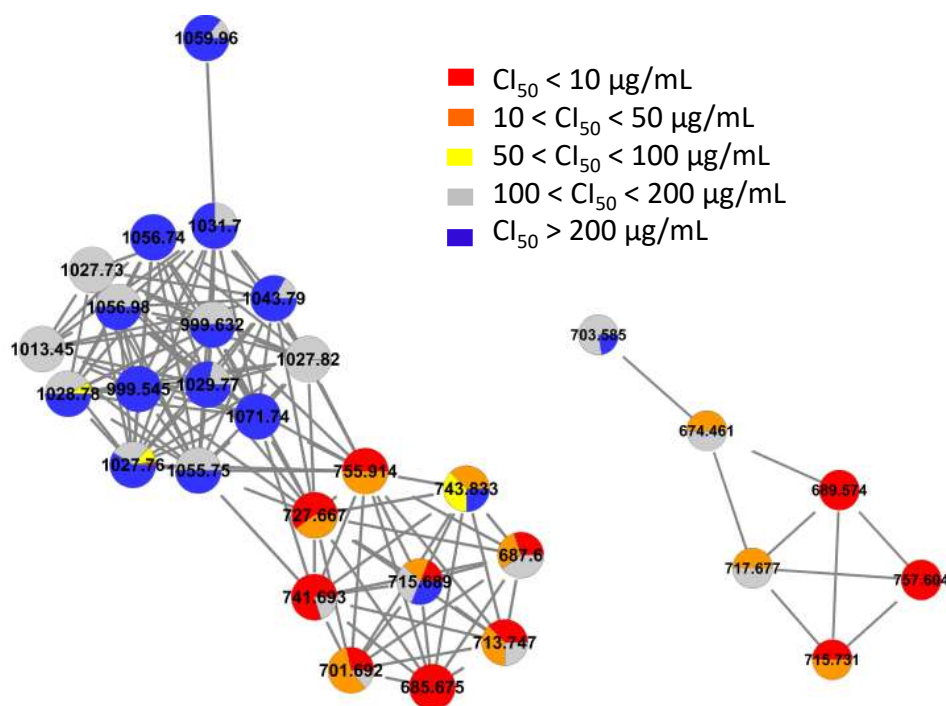


Figure 54 : Clusters de composés probablement actifs obtenus par GNPS et visualisés par Cytoscape en mode positif

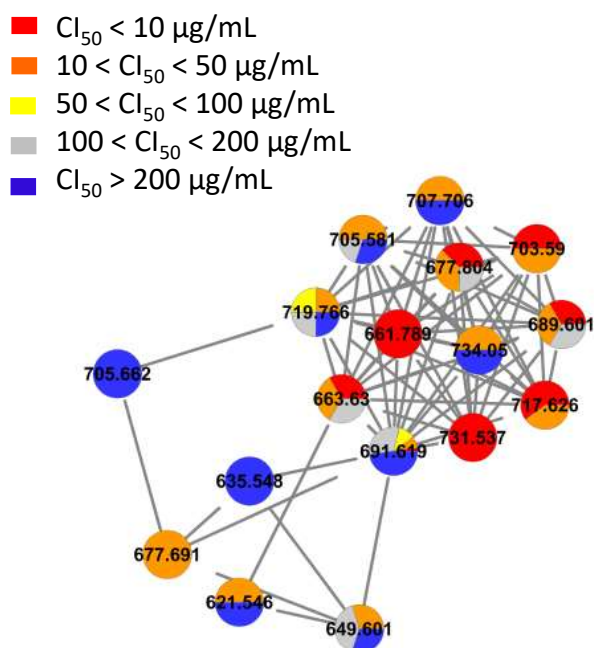


Figure 55 : Clusters de composés probablement actifs obtenus par GNPS et visualisés par Cytoscape en mode négatif

Les ions colorés en rouge-orange ont ensuite été recherchés sur les chromatogrammes et ils sont résumés dans les tableaux suivants (Tableau 23 : mode positif, tableau 24 : mode négatif) avec les temps de rétention auxquels ils sont retrouvés.

Tableau 23 : Ions en mode positif constituant les clusters de composés potentiellement actifs

Ion détecté (m/z)	Temps de rétention (min)	Echantillon
685,7	36,7	F10
755,9	35,8	F10, F11
727,7	34,0 et 41,2	F10, F11
741,7	43,3	F10, F18
701,7	42,5	F10, F11, F18
713,7	39,2	F10, F11, F18
687,6	39,5	F10, F11, F13, F18
689,6	39,5	F10
757,6	35,9	F10
715,7	39,3	F10, F11

Tableau 24 : Ions en mode négatif constituant les clusters de composés potentiellement actifs

Ion détecté (m/z)	Temps de rétention (min)	Echantillon
661,8	37,1	F10
731,5	36,0	F10
717,6	44,7	F10, F11
703,6	33,8 et 41,3	F10, F11
677,8	42,7	F10, F11, F18
689,6	39,2	F10, F11, F18
663,6	39,6	F10, F11, F18

Il semble que les mêmes composés ressortent en mode positif et en mode négatif, par exemple les ions 685,7 en mode positif et 661,8 en mode négatif ont un temps de rétention similaire (36,7 et 37,1 min). Il en est de même pour les ions 727,7 et 703,6 ; 755,9 et 731,5 ; 701,7 et 677,8 ; 713,7 et 689,6 ainsi que 687,6 et 663,6. Il y a une différence de 24 entre l'ion détecté en mode positif et l'ion en mode négatif, on est donc en présence des ions $[M+Na]^+$ et $[M-H]^-$ pour chaque composé.

Les composés mis en évidence n'ont malheureusement pas pu être isolés du fait d'une trop faible quantité. Ces composés n'ont pas trouvé de correspondance avec les données des bibliothèques de spectres entrées dans GNPS, indiquant que nous sommes possiblement en présence de composés nouveaux. Il serait intéressant par la suite de réaliser différentes cultures bactériennes en suivant ces composés pour définir les conditions optimales menant à leur production en quantité suffisante pour analyse. Un ciblage sur les composés présentés dans les fractions F10 et F11 (les plus actives) sera réalisé prioritairement.

B. Analyse par PLS-DA

Lors de la réalisation du plan d'expérience en bioréacteur, une des neuf cultures, l'expérience 3 (pH 6, température 37 °C, agitation 250 rpm et inoculation avec 5% de préculture) a révélé une activité cytotoxique intéressante sur la lignée cancéreuse B16 (extrait de résine CI_{50} = 53 $\mu\text{g/mL}$, extrait surnageant CI_{50} = 41 $\mu\text{g/mL}$) et une quantité d'extrait suffisante pour réaliser plus d'analyses (extrait de résine 541,4 mg, extrait surnageant : 1196,6 mg). Nous avons donc procédé dans un premier temps à un fractionnement de l'extrait de résine issu de cette culture par chromatographie Flash sur colonne de gel de silice à l'aide d'un mélange éluant de cyclohexane/dichlorométhane puis dichlorométhane/acétate d'éthyle et enfin acétate d'éthyle/méthanol. 18 fractions ont ainsi été obtenues puis elles ont été testées sur les mêmes lignées cellulaires HaCaT et B16.

Tableau 25 : Fractions obtenues à partir de l'extrait de résine de l'expérience 3 du plan d'expérience

Fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18
Quantité	5,2	3,7	3,8	3,4	11,9	5,1	6,8	0,7	40,4	33,7	88,4	98,0	57,9	36,5	9,4	76,9	17,1	19,8
CI_{50} B16 ($\mu\text{g/mL}$)		>200	27$\pm$5	30$\pm$8	84$\pm$8	110$\pm$30	40$\pm$2	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	10$\pm$2	140$\pm$13	170$\pm$14	75$\pm$4
CI_{50} HaCaT ($\mu\text{g/mL}$)		>200	27$\pm$12	27$\pm$4	100$\pm$4	41$\pm$6	92$\pm$2	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	15$\pm$8	51$\pm$9	160$\pm$21	55$\pm$9

Chaque fraction a été analysée par HPLC/MS sur une colonne Prevail C_{18} avec un gradient constitué d'eau + 0,1 % d'acide formique et d'acétonitrile + 0,1 % d'acide formique. Il débute à 0 % d'ACN pendant 5 minutes puis la proportion d'acétonitrile est augmenté jusqu'à 100 % en 30 min puis un palier à 100 % d'ACN est maintenu pendant 10 min avant de redescendre à 0% d'ACN en 5 min. En sortie de colonne les échantillons sont analysés par UV-DAD puis par spectrométrie de masse en ESI (Electro-Spray Ionisation) mode positif. Les chromatogrammes obtenus sont retraités par le logiciel MZmine 2, après extraction des ions et déconvolution. Les chromatogrammes sont ensuite alignés et les données sont extraites sous forme de tableau. Les données sont traitées par le logiciel Rstudio. Les échantillons sont séparés en fractions actives et fractions inactives et une PLS-DA est réalisée (Figure 56), le cercle des corrélations est tracé (Figure 57).

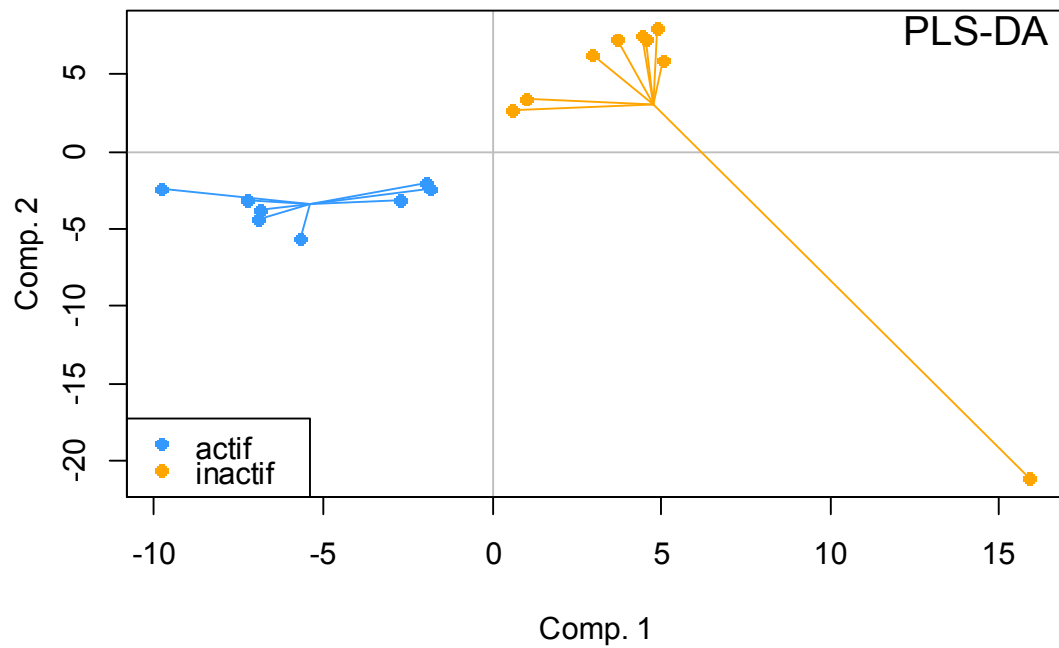


Figure 56 : Représentation graphique de la PLS-DA

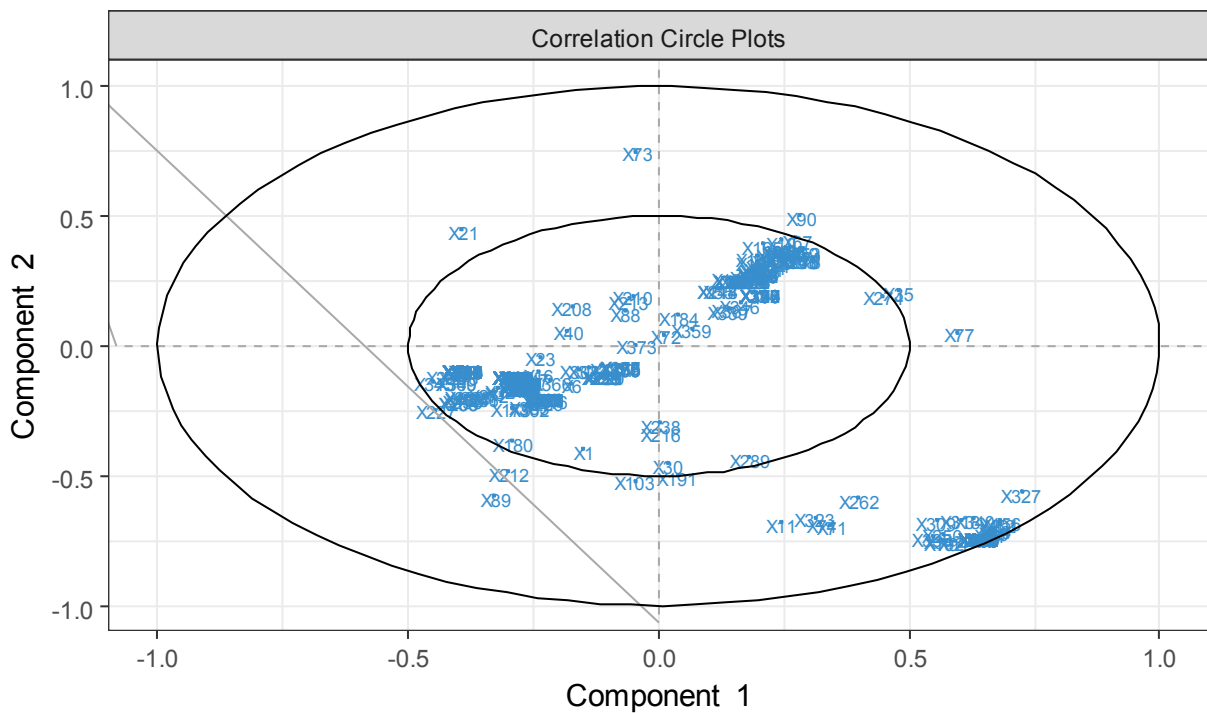


Figure 57 : Cercle des corrélations

La validation de la PLS-DA a été effectuée par « cross model validation » et elle ne montre pas une différence significative entre les deux groupes actifs et non actifs (8 composantes, 999 permutations, NMC = 0,365, $P = 0,19$). Les fractions actives sont alors rassemblées en deux groupes : de F3 à F7 et de F15 à F18. Une seconde analyse multivariée a donc été réalisée en séparant les deux groupes de

fractions actives donnant ainsi les groupes actif 1, actif 2 et inactif (Figure 58), le cercle des corrélations est également tracé (Figure 59).

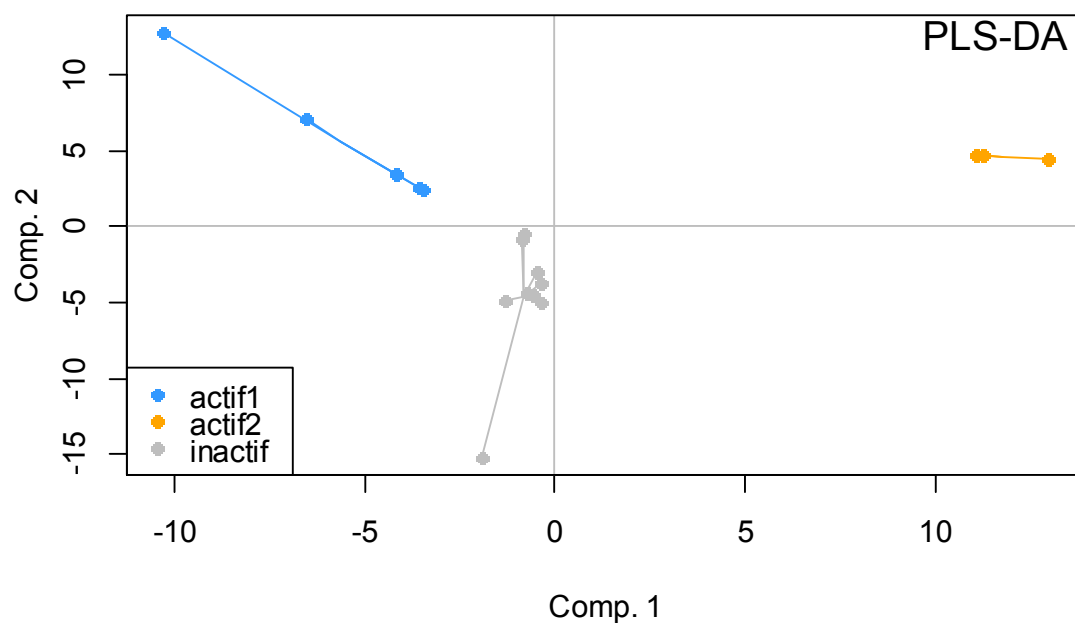


Figure 58 : Représentation graphique de la PLSDA

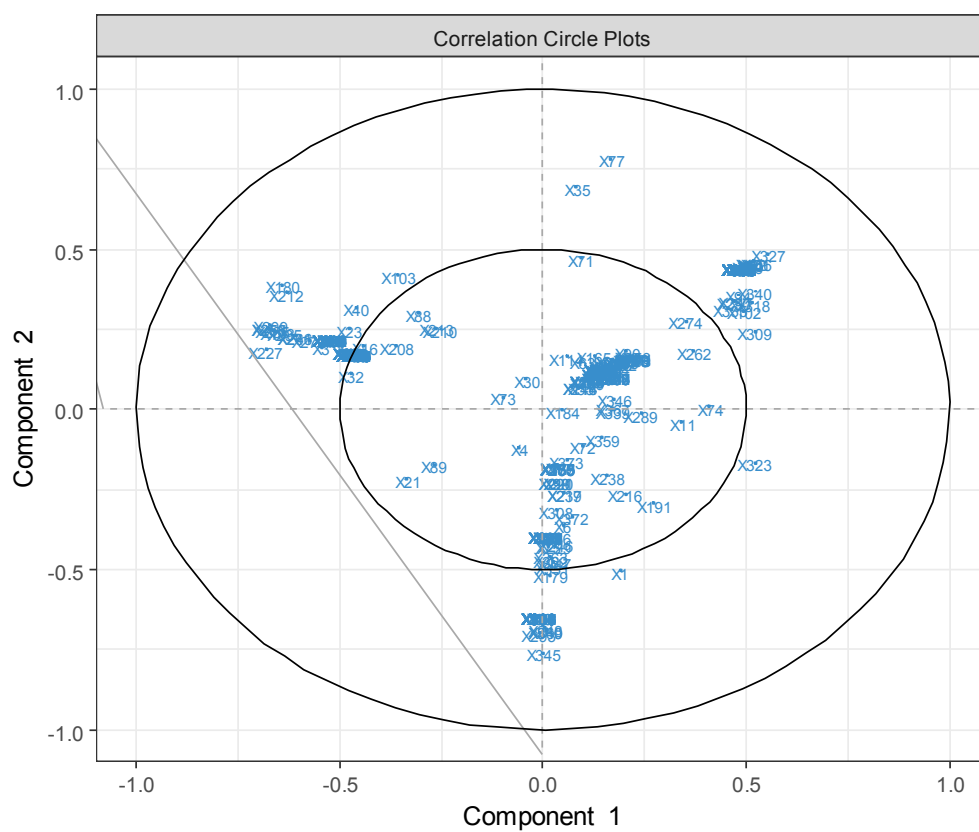


Figure 59 : Cercle des corrélations

L'analyse multivariée a de nouveau été testée par double validation croisée, indiquant ici une différence significative entre les trois groupes : actif 1, actif 2 et inactif (8 composantes, 999 permutations, NMC = 0,3, P = 0,011).

Les variables ayant le plus d'influence sur la séparation des trois groupes sur l'axe des X (composante 1. Figure 60) et sur l'axe des Y (composante 2. Figure 61) ont été mises en évidence graphiquement.

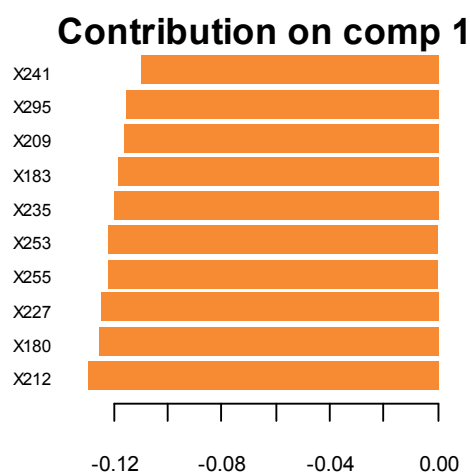


Figure 60 : Variables avec l'effet le plus important sur la séparation des échantillons suivant l'axe des X

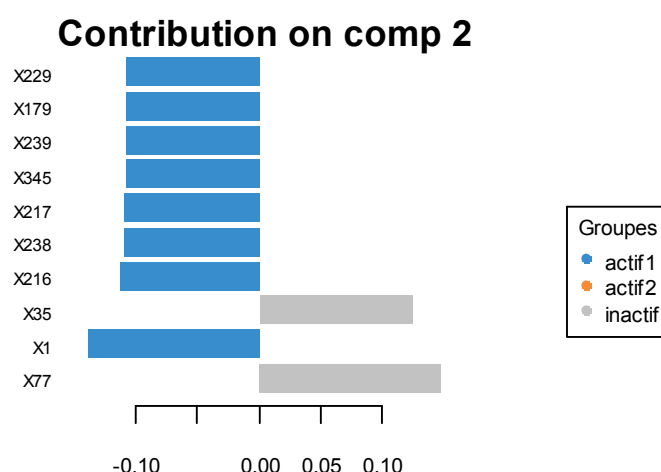


Figure 61 : Variables avec l'effet le plus important sur la séparation des échantillons suivant l'axe des Y

Les ions les plus influents sur la séparation entre les différents groupes sont susceptibles d'être responsables de l'activité biologique observée. Ceux qui influencent la séparation sur l'axe des X sont potentiellement impliqués dans l'activité des échantillons du groupe actif 2 (Fractions 11 à 18) et ceux qui agissent sur l'axe des Y influencent l'activité du groupe actif 1 (Fractions 1 à 10). Ils ont été répertoriés dans le tableau suivant leur masse et leur temps de rétention.

Tableau 26 : Ions influençant la séparation des échantillons sur l'axe des X (mode positif)

Numéro de variable	m/z de l'ion	Temps de rétention (min)
212	302,4	28,0
180	274,4	25,3
227	318,4	25,5
255	352,3	24,0
253	346,4	28,3
235	330,4	31,3
183	275,4	25,2
209	299,2	3,5
295	396,5	37,8
241	336,3	25,5

Tableau 27 : Ions influençant la séparation des échantillons sur l'axe des Y (mode positif)

Numéro de variable	m/z de l'ion	Temps de rétention (min)
1	101,1	51,4
216	304,4	30,3
238	332,4	33,4
217	305,4	30,3
345	515,5	36,8
239	239,3	30,9
179	274,3	27,1
229	323,3	29,3

Ces composés ne correspondent à aucun des composés précédemment isolés au niveau de leur temps de rétention et de leur masse. Ils n'ont actuellement pas pu être identifiés du fait d'une trop faible quantité, mais ces données apportent des informations quant à l'orientation de prochains travaux.

C. Conclusion

Les études de réseaux moléculaires et de chimiométrie ont permis de mettre en évidence de nombreux composés possiblement impliqués dans l'activité des différentes fractions analysées. Comme nous l'avions supposé au début de nos travaux il s'agit de composés présents en très faible quantité et leur isolement nécessite d'augmenter les volumes de culture et un ciblage lors des étapes de purification.

Scène 5 : Fractionnement bioguidé par chromatographie par partage centrifuge

A. Chromatographie par partage centrifuge (CPC)

L'expérience 3 du plan d'expérience a été répétée pour confirmer les résultats d'activité obtenus. Les quantités d'extraits de résine et de surnageant ainsi que leurs activités sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 28 : Quantité d'extrait, rendement et activités des extraits issus de la répétition de l'expérience 3 du plan d'expérience.

Milieu	Extrait	Quantité (mg)	Rendement (mg/L)	Cl ₅₀ (µg/mL)	
				B16	HaCaT
TY	Extrait de résine	627,8	156,8	>200	>200
	Extrait surnageant	170,3	42,6	33 ± 8	23 ± 5

L'extrait surnageant conserve une activité très intéressante. Les méthodes de séparation précédemment utilisées ne nous ont pas permis d'isoler le(s) composé(s) responsable(s) de cette cytotoxicité nous avons donc choisi d'utiliser une méthode de séparation différente. La CPC est une méthode consistant en un partage de l'échantillon entre deux phases liquides non miscibles séparées par une force centrifuge. Dans un premier temps un système de solvant a été déterminé, en s'appuyant sur des gammes de solvants existantes (Oka, Abbott, etc...). Les systèmes aux extrêmes de la gamme Oka ont été testés en premier lieu, la répartition des composés majoritaires a été observée par CCM. Le système 16 (le plus polaire) constitué d'eau et d'AcOEt en proportion 1/1 (v/v) de la gamme s'est avéré le plus approprié à notre extrait. Dans un second temps nous avons optimisé les paramètres de la CPC pour notre système de solvant. Nous avons fait varier la vitesse de rotation et le débit de solvant en mesurant le volume de solvant éjecté. La phase stationnaire (phase supérieure en mode descendant et phase inférieure en mode ascendant) a tout d'abord été injectée dans l'appareil puis nous avons fait circuler la phase mobile (phase inférieure en mode descendant et phase supérieure en mode ascendant) tout en mesurant le volume de phase stationnaire éjecté. Nous avons sélectionné les conditions avec lesquelles ce volume est le plus faible. Les résultats sont compilés dans les tableaux 29 (mode ascendant) et 30 (mode descendant).

Tableau 29 : Mode ascendant. Volume de phase stationnaire éjecté (en mL) durant l'équilibrage de la CPC en fonction de la vitesse de rotation et du débit. Volume total de colonne : 57 mL.

Débit (mL/min)	Vitesse de rotation (tours/minute)				
	1000	1200	1500	1800	2000
2	26	24	27	27	27
4	27	26	26	28	27
6	28	29	28	28	29

Tableau 30 : Mode descendant. Volume de phase stationnaire éjecté (en mL) durant l'équilibrage de la CPC en fonction de la vitesse de rotation et du débit. Volume total de colonne : 57 mL.

Débit (mL/min)	Vitesse de rotation (tours/minute)				
	1000	1200	1500	1800	2000
2	54	33	36	46	46
4	30	33	40		41
6	32		36		41

La séparation a donc été réalisée en mode ascendant avec la phase inférieure comme phase stationnaire (eau) et la phase supérieure comme phase mobile (AcOEt). Le débit a été fixé à 2 mL/min et la vitesse de rotation à 1200 tours/min. Le volume d'éjection de la phase mobile est alors de 24 mL. L'échantillon a été injecté en 3 fois, la CPC est reliée à un collecteur de fractions et des fractions de 2 mL sont récupérées. Chaque fraction est déposée sur une plaque CCM (silice) et les plaques sont éluées dans un mélange de solvant DCM/MeOH (95/5). Elles sont visualisées à 254 nm, 312 nm et 365nm, elles sont également révélées par une solution d'anhydride sulfurique. Les fractions sont ensuite rassemblées suivant leur composition menant ainsi à 5 fractions. La phase aqueuse est ensuite poussée hors de la colonne en changeant le mode de la CPC en mode descendant et en injectant la phase supérieure (AcOEt).

Tableau 31 : Fractions collectées en CPC, quantités et activités cytotoxiques sur lignées cellulaires B16 et HaCaT

Fraction	Quantité (mg)	Cl ₅₀ sur B16 (µg/mL)	Cl ₅₀ sur HaCaT (µg/mL)
F1	63,2	44 ± 18	90 ± 18
F2	11,8	115 ± 20	155 ± 17
F3	16,5	>200	>200
F4	2,0	125 ± 200	86 ± 18
F5	2,9	16 ± 4	15 ± 2
CPC eau	20,4	13 ± 7	9

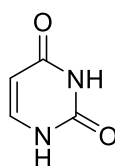
Les fractions F5 et CPC eau sont les plus actives. La fraction F5 est constituée d'un composé presque pur, il a été purifié grâce à une cartouche SPE greffée en C₁₈. L'analyse par HRMS en mode positif de ce composé **23** donne un ion [M+H]⁺ de m/z 150,0774 correspondant à une formule brute de C₆H₇N₅. Cette formule correspond à celle d'une méthyl-adénine et le spectre RMN du proton du composé **23** est cohérent avec cette hypothèse. Cependant pour localiser le méthyl sur l'adénine une analyse complémentaire par RMN 2D est nécessaire.

La fraction CPC eau constituée de plusieurs composés a été séparée par HPLC semi-préparative sur colonne Prevail C₁₈ avec un mélange éluant constitué d'eau et d'acétonitrile. Cette séparation a mené à 4 fractions qui ont de nouveau été testées sur les lignées cellulaires HaCaT et B16.

Tableau 32 : Fractions collectées suite au fractionnement de la fraction CPC eau par HPLC semi-préparative, quantités et activités cytotoxiques sur lignées cellulaires B16 et HaCaT.

Fraction	Quantité (mg)	Cl ₅₀ sur B16 (µg/mL)	Cl ₅₀ sur HaCaT (µg/mL)
F0	2.5	30 ± 7	37 ± 9
F1	3	40 ± 11	6 ± 3,5
F2	1	>200	>200
F3	1.3	>200	>200

Nous constatons une diminution de l'activité de la fraction CPC eau au cours des analyses. Les fractions F0 et F1 contiennent le même composé **24**. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en mode négatif donne un ion $[M-H]^-$ de m/z 111,0200 correspondant à une formule brute de $C_4H_3N_2O_2$, correspondant à l'uracile. Le spectre RMN 1H est également en accord avec cette structure.



Uracile

Figure 62 : Structure du composé **24**

Il est étonnant de trouver ce type de métabolite primaire comme composé actif. Plusieurs dérivés de la pyrimidine sont utilisés comme antimétabolites dans les traitements anticancéreux, comme la 5-Fluorouracile ou la cytarabine. Un dérivé de l'uracile facilement hydrolysable pourrait être responsable de l'activité.

Scène 6 : Matériels et méthodes

A. Procédures générales

1. Solvants et réactifs

Tous les solvants et réactifs utilisés lors de ces travaux ont été fournis par Sigma-Aldrich (Lyon, France) Carlo Erba Reactifs (Val de Reuil, France), VWR (Fontenay-sous-bois, France), Acros Organics (Halluin, France)... Les solvants utilisés pour les études analytiques ou de séparation par chromatographie liquide haute pression étaient de qualité HPLC. L'eau ultra pure a été obtenue à l'aide d'un système EasyPure (Barnstead™, ThermoFisher Waltham, MA, USA).

2. Méthodes séparatives

a. Chromatographie de type Flash

Les séparations par chromatographie Flash ont été réalisées sur un appareil PuriFlash de chez Interchim (Montluçon, France). La phase stationnaire utilisée était des colonnes prépackées (Chromabond Flash 15, 25 ou 40g, Macherey-Nagel, Hoerd, France) constituées de silice (phase normale) ou de silice greffée en C₁₈ (phase inverse). Pour les séparations sur phase normale, les solvants utilisés étaient du cyclohexane, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du méthanol de qualité analytique. Pour les séparations sur phase inverse la phase mobile utilisée était constituée d'acétonitrile de qualité analytique et d'eau ultra-pure.

Le gradient classiquement utilisé est présenté ci-dessous :

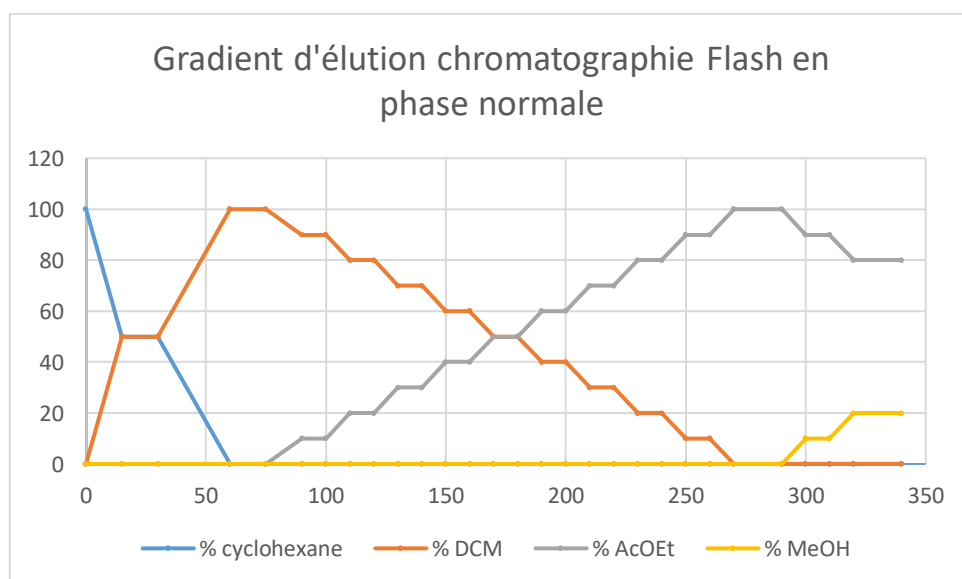


Figure 63 : Gradient d'élution classique utilisé pour la séparation des fractions sur phase normale (SiO₂) avec comme éluant du cyclohexane, du dichlorométhane, de l'acétate d'éthyle et du méthanol

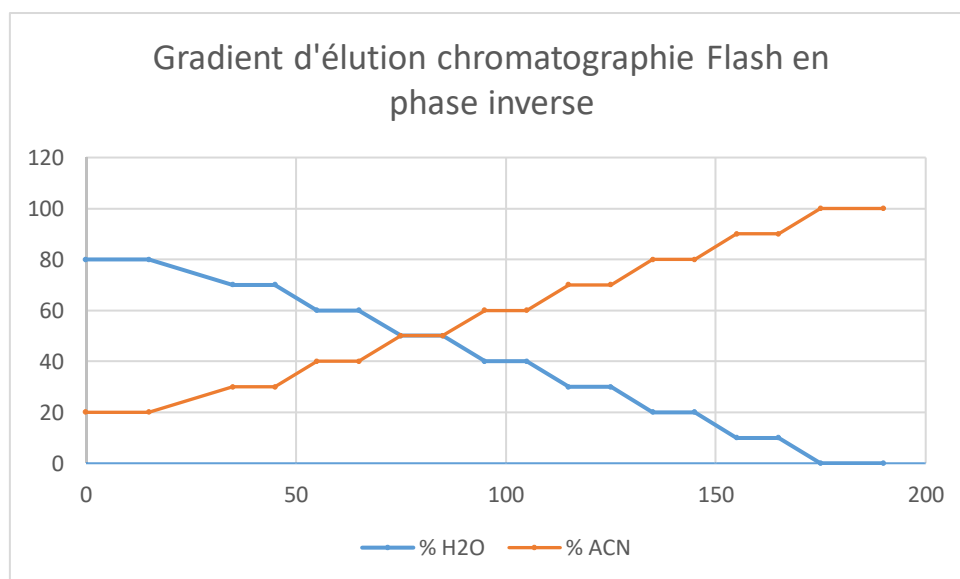


Figure 64 : Gradient d'élution classique utilisé pour la séparation des fractions sur phase inverse (silice greffée en C₁₈) avec comme éluant de l'eau et de l'acétonitrile

b. HPLC-semi préparative

Les séparations par HPLC semi-préparative ont été réalisées sur une chaîne HPLC de chez Shimadzu (Marne-la-Vallée, France), avec un détecteur UV à barrette de diodes en sortie de colonne. La colonne utilisée est une colonne Prevail C₁₈ (5 µm, 250 x 10 mm, Grace, Columbia, MD, USA) et les solvants sont de l'acétonitrile qualité HPLC et de l'eau ultra-pure.

3. Méthodes analytiques

a. HPLC-UV/MS

Les analyses HPLC/UV et HPLC/MS basse résolution ont été réalisées sur une chaîne HPLC de chez Shimadzu (Marne-la-Vallée, France), avec une colonne Prevail C₁₈ (5 µm, 250 x 4,6 mm, Hichrom, Reading, UK) connectée à un détecteur UV à barrette de diode (SPD-M20A). Les solvants utilisés sont de l'acétonitrile qualité HPLC et de l'eau ultra-pure. Pour les analyses en spectrométrie de masse de l'acide formique a été ajouté à hauteur de 0,1% dans chaque solvant. Le débit utilisé est de 0,8 mL/min et un split en sortie du détecteur UV permet de limiter le débit arrivant dans le spectromètre de masse à 0,2 mL/min. L'analyse par spectrométrie de masse est effectuée en mode ESI (+ ou -) par un appareil expression CMS de chez Advion (Ithaca, NY, USA). Le traitement des données est réalisé sur le logiciel LabSolutions pour les données de chromatographie et le logiciel Advion pour les données de masse.

Les échantillons sont préparés à 1 mg/mL dans le méthanol préférentiellement, de l'eau ou de l'acétonitrile peut être ajouté pour faciliter la dissolution des échantillons. Après filtration, 20 µL sont injectés dans la colonne. Le gradient analytique classiquement utilisé pour les analyses débute à 0%

d'acétonitrile, puis il monte jusqu'à 100% d'acétonitrile en 30 min, un pallier de 10 min à 100% d'ACN permet un rinçage de la colonne puis celle-ci est rééquilibrée en 10 min.

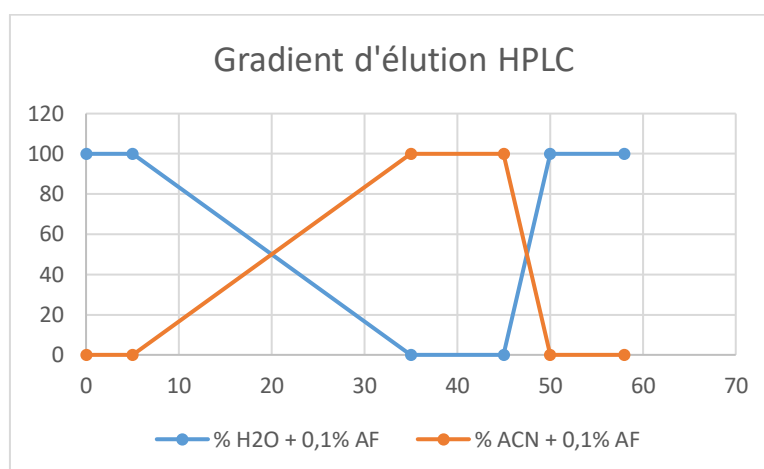


Figure 65 : Gradient d'élution analytique classique

b. HPLC-MS/MS

Les analyses de MS/MS ont été réalisées à la plateforme P2M2 (INRA, Le Rheu, France) sur un système constitué d'un passeur d'échantillon automatique thermostaté Surveyor® et muni d'un four à colonne, d'un dégazeur de solvants par bullage d'hélium, d'une pompe binaire haute pression et d'un détecteur à barrettes de diodes. La sortie est directement connectée à la source d'électronébulisation (ESI), sans dérivation. La séparation est réalisée sur la même colonne Prevail C₁₈ que celle utilisée pour l'analyse en HPLC/UV/MS.

Le spectromètre de masse est constitué d'une source d'électronébulisation ou électrospray (ESI) et d'un analyseur LCQ Deca® composé d'un quadripôle, d'un octapôle, d'une lentille interoctapôle et d'une trappe d'ion. L'hélium est utilisé comme gaz de collision et de focalisation.

Les échantillons sont préparés à 5 mg/mL dans le méthanol et 20 µL sont injectés dans le système chromatographique. Le système éluant utilisé est le même que précédemment décrit.

c. HRMS (High Resolution Mass Spectrometry)

Les analyses de masse haute résolution ont été effectuées soit à la plateforme analytique CRMPO (Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest, Rennes, France) soit à la plateforme BIO2MAR (Biodiversité et Biotechnologies Marines) à Banyuls-sur-mer.

Au CRMPO les analyses ont été réalisées soit sur un spectromètre de masse de type Q-TOF 6510 (quadropole – time of flight : analyseur quadripôle à temps de vol) de chez Agilent (Santa Clara, CA, USA) soit sur un appareil Q-Exactive de chez ThermoFisher (Waltham, MA, USA) qui est un hybride entre un quadripôle et un orbitrap.

Les analyses à la plateforme BIO2MAR ont été réalisées sur une HPLC U3000 dual gradient RSLC (Rapid Separation Liquid Chromatography) couplée avec un Q-Exactive Focus (LC-FT-MS/MS avec une sonde HESI).

d. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Différents appareils ont été utilisés suivant la quantité de produit disponible pour l'analyse :

- Appareil à transformée de Fourier BRUKER DMX 300 (300 MHz pour le ^1H et 75 MHz pour le ^{13}C) (Equipe CORINT, Rennes, France)
- Appareil à transformée de Fourier BRUKER 500 et cryo500 (500 MHz pour le ^1H et 125 MHz pour le ^{13}C) (Plateforme PRISM, Rennes, France)

Les spectres ont été réalisés dans différents solvants deutérés suivant leur polarité : CDCl_3 , CD_3OD , D_2O , $\text{DMSO}-d_6$. Les déplacements chimiques (δ) et les constantes de couplage (J) sont exprimés en partie par millions (ppm) et en Hertz (Hz) respectivement. La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s (singulet), bs (singulet large), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (doublet dédoublé), etc. Les données ont été traitées à l'aide du logiciel MestReNova.

e. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire $[\alpha_D^{20}]$ a été mesuré à l'aide d'un polarimètre Perkin Elmer Model 341 à la longueur d'onde de la raie D du sodium (598 nm) et à une température de 25°C. Ce pouvoir rotatoire est ensuite déterminé à partir de la formule ci-dessous :

$$[\alpha_D^{20}] = [\alpha_D^{20}]_{\text{mesuré}} / (l \times C)$$

Avec l : longueur de la cuve en dm ; C : concentration de la solution en g/mL ; $[\alpha_D^{20}]$: en $\text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^3$

f. Tests biologiques

Les propriétés cytotoxiques des fractions et des composés ont été déterminées par un test au MTT standard. Les lignées cellulaires B16 (6000 cellules/puits) et HaCaT (10,000 cellules/puits) ont été ensemencées dans du milieu RPMI 1640 avec 5% de sérum de veau fœtal (FCS) et un antibiotique (pénicilline/streptomycine 1%) au jour 0 en plaque 96-puits. Elles ont ensuite été incubées à 37 °C dans une atmosphère à 5% de CO_2 . Après 24h d'incubation, les fractions et les composés ont été ajoutés à différentes concentrations (1, 10, 50, 100, et 200 $\mu\text{g/mL}$), et la plaque a été incubée 48 h de plus (37 °C, 5% CO_2). La croissance cellulaire et la viabilité ont été mesurées à 540 nm, en utilisant un test au MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Chaque expérience a été répétée au moins trois fois et un témoin positif est toujours ajouté sur la plaque en parallèle (doxorubicine, 5-Fluouracile...).

B. Optimisation de culture de souches bactériennes

1. Souche bactérienne

La souche utilisée pour ces travaux a été isolée à partir du lichen *Collema auriforme*. Le lichen a été récolté à Kesselfallklamm en Autriche (47°12'21.26" N, 15°23'57.27" E) en Novembre 2012. Le lichen a été identifié par Martin Grube. Après un rinçage sur le terrain à l'eau stérile, il a été lavé à plusieurs reprises par une solution de NaCl 0,85 % / peptones issus de caséine 1 % stérile. Il a ensuite été broyé et associé à la même solution (homogénat). Ces solutions ont ensuite été ensemencées sur du milieu ISP2 en boîte de Pétri supplémenté en acide nalidixique et amphotéricine B puis des repiquages ont été effectués jusqu'à l'obtention de colonies pures. La souche a été référencée sous le nom **DP94** au sein de la collection du laboratoire. Une première identification en 2013 par extraction de l'ARN 16S et comparaison avec les données du serveur EzTaxon a montré 98,59% de similarité avec la souche *Nocardia ignorata* DQ659907. Une seconde identification réalisée en 2017 par Laurent Intertaglia de l'observatoire océanologique de Banyuls-sur-mer a permis une extraction d'un plus grand nombre de paires de bases d'ARN 16S et une nouvelle identification à 100% d'identité avec les espèces *Nocardia soli*, *N. cummidelens* et *N. salmonicida*. La souche a été conservée dans le milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) avec 50% v/v de glycérol ou 5% v/v de DMSO à -80 °C et référencée comme **DP94** (collection CORINT).

2. Milieux de culture

Quatre milieux de culture ont été utilisés pour l'étude de la souche **DP94** :

- ISP2 (International Streptomyces Project 2) : extrait de levure 4 g/L, extrait de malt 10 g/L et glucose 4 g/L. Pour la préparation des boîtes de Pétri 20 g/L d'agar ont été ajoutés.
- TY (Tryptone Yeast) : tryptone 16 g/L, extrait de levure 10 g/L et chlorure de sodium 5 g/L. Pour les boîtes de Pétri 15 g/L d'agar sont ajoutés.
- LB (Lysogeny Broth) : peptone 5 g/L, chlorure de sodium 5 g/L et extrait de levure 3 g/L. Pour obtenir de la gélose 15 g/L sont ajoutés.
- MB (Marine Broth) : 37,4 g/L d'un milieu déshydraté commercialement disponible, le marine broth (Difco ® 2216, ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

Les poudres sont pesées puis diluées dans le volume adéquat d'eau ultra-pure et le tout est stérilisé à 121°C pendant 20 min à l'autoclave (Advantage Lab®, modèle AL02-03-100).

3. Préparation des pré-cultures et ensemencement

Les pré-cultures sont réalisées par ensemencement de 30 mL de milieu avec soit :

- 3 µL de culture cryoconservée dans un mélange milieu + DMSO ou milieu + glycérol
- 2 ou 3 colonies pures récupérées sur une boîte de Pétriensemencée avec la souche
- 300 µL d'une culture déjà existante

Après 3 jours d'incubation à 25 °C à 110 rpm, les pré-cultures sont utilisées pour ensemencler les cultures à 1% v/v. Les cultures en tubes ou en erlenmeyer sont ensuite incubées dans un incubateur à agitation orbitale New Brunswick Innova 42® (130 rpm). Dans le cas des cultures en bioréacteur le milieu de culture est versé dans le bioréacteur BioFlo 115® (7,5 L, New Brunswick, Edison, NJ, USA) et après calibration de la sonde de pH, le tout est stérilisé à 121 °C en autoclave (Numecan, Inserm, Rennes 1). Lorsque la température du milieu est redescendue, la sonde de OD (oxygène dissous) est elle aussi calibrée, le pH du milieu est ajusté puis la pré-culture est ajoutée par le septum.

4. *Suivi des cultures*

La croissance bactérienne est suivie régulièrement par prélèvement de 200 µL de milieu et dépôt en plaque 96-puits puis mesure de la densité optique à 620 nm. Les cultures peuvent également être suivies par test au MTT : 200 µL de milieu sont déposés en plaque 96-puits puis 10 µL de MTT sont ajoutés. Après 4h d'incubation à 37 °C, le milieu est retiré et 200 µL de DMSO sont ajoutés pour dissoudre les cristaux de formazan. Ceux-ci sont obtenus par transformation du MTT par les bactéries vivantes en formazan, la proportion de ce dernier est donc proportionnelle au nombre de bactéries vivantes présentes. L'absorbance est mesurée à 540 nm.

La croissance bactérienne est représentée graphiquement par le log de la densité optique en fonction du temps.

Régulièrement des prélèvements de culture sont également réalisés et déposés sur boîte de Pétri pour contrôler la pureté de la culture.

5. *Extraction des milieux*

Au moment de l'arrêt de culture, pour les gros volumes de culture, le milieu est transvasé sous hotte à flux laminaire dans des flacons à embout coniques de 500 mL (Falcon BD, ThermoFisher). Le milieu est centrifugé à 3500 rpm à 4°C pendant 15 min (Thermo scientific Sorvall ST40R, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) puis le surnageant est récupéré et 40 g de résine XAD-7HP préalablement stérilisés sont ajoutés par litre de culture. Le culot bactérien est congelé.

Après 4 h d'agitation (130 rpm) du milieu avec la résine, le surnageant est enlevé par filtration et 600 mL d'un mélange méthanol/acétone (50/50, v/v) est ajouté sur la résine pour désorption puis le tout est mis sous agitation pendant 15 min. L'opération est répétée 3 fois, et l'extrait acétone/méthanol est évaporé sous vide puis il est repris avec 300 mL d'eau distillée et contre-extrait par 4 x 300 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée par du sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide menant ainsi à l'extrait de résine.

Le surnageant est contre-extrait par de l'acétate d'éthyle avec 500 mL de solvant pour 1 L de surnageant. La phase organique est séchée par sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide pour mener à l'extrait surnageant.

C. Isolement de composés issus de culture bactérienne

1. Séparation et purification des composés

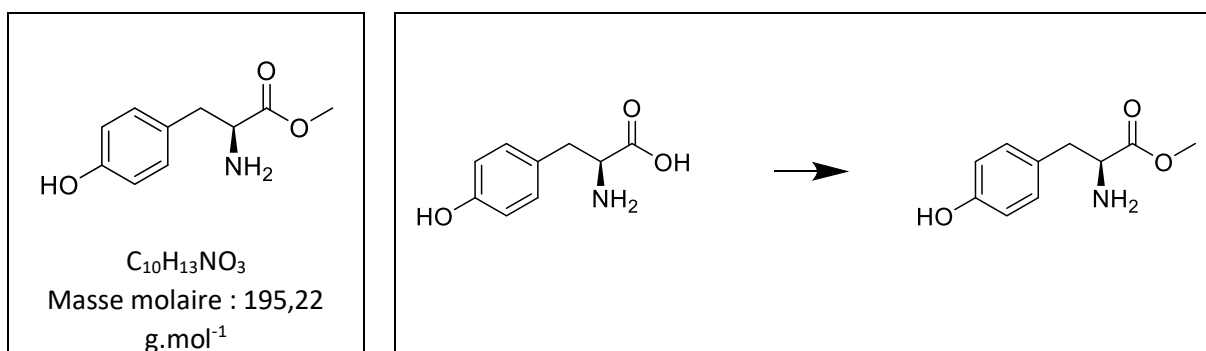
Les fractions ont été séparées par chromatographie Flash ou HPLC semi-préparative dans les conditions décrites précédemment. Les gradients ont été adaptés à la polarité des composés et sont précisés dans les résultats. La séparation des composés a été suivie à l'aide d'un détecteur UV aux longueurs d'onde de 220 et 254 nm. Les fractions collectées ont été séchées et contrôlées par HPLC analytique selon la méthode décrite précédemment.

Des étapes de purification par cartouche SPE ont été utilisées pour certaines fractions (fraction 18 → sous-fraction 1 → composé **10**). La sous-fraction 1 (3 mg) est dissoute dans 200 µL d'eau ultra-pure. La cartouche SPE est activée par 1 mL d'eau puis l'échantillon est déposé. L'élution est ensuite réalisée par différents solvants : 500 µL d'eau, 1 mL d'un mélange eau/méthanol (50/50, v/v), 1 mL de méthanol, 1 mL d'acétate d'éthyle puis 1 mL de dichlorométhane. Le composé **10** pur est récupéré dans la fraction eau/méthanol (1,1 mg).

2. Synthèse des dicétopipérazines

a. Synthèse de la cyclo (L-Tyr-L-Tpn)

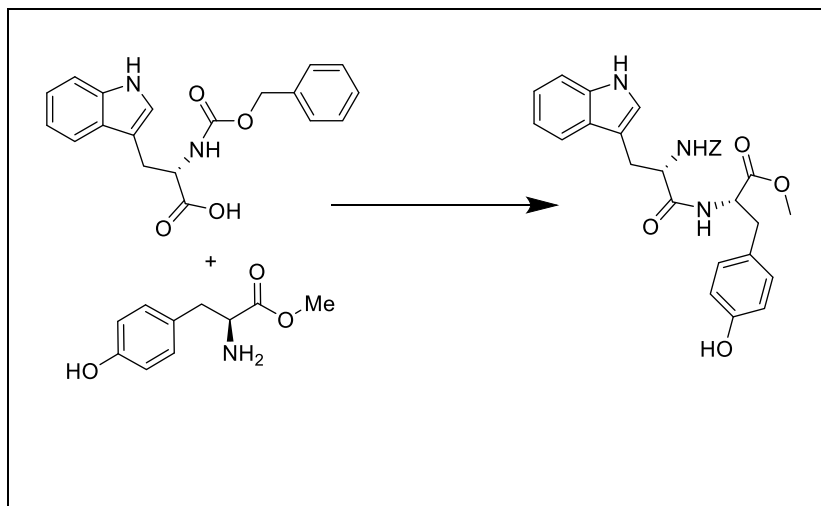
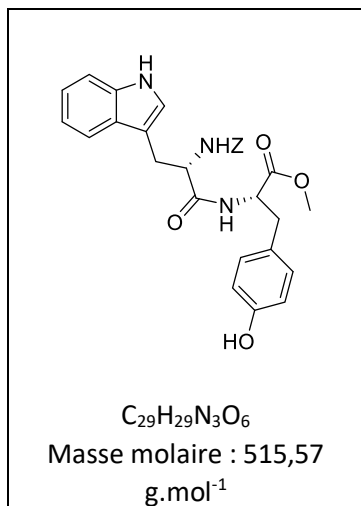
L-tyrosine, méthyl ester



La L-Tyrosine a été méthylée par dissolution de 1 g (5,5 mmol) de produit dans 20 mL de MeOH qualité HPLC à température ambiante. L'air a été chassé du ballon par injection d'azote puis le milieu a été refroidi à 0 °C à l'aide d'un bain de glace. Le chlorure de thionyle a ensuite été ajouté (1,18 g, 0,72 mL, 9,9 mmol, 1,8 eq) au goutte à goutte et le mélange réactionnel est laissé sous agitation durant une nuit. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le brut réactionnel est lavé par 2 x 10 mL de MeOH. L'ester de la tyrosine est obtenu de façon quantitative (1,29 g).

RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) δ = 3.12 (qd, J = 14.7, 6.6 Hz, 2 H), 3.74 (s, 3 H), 4.28 (dd, J = 7.4, 5.8 Hz 1 H), 6.80 (d, J = 8.6 Hz, 2 H), 7.06 (d, J = 8.6 Hz, 2 H) ppm.

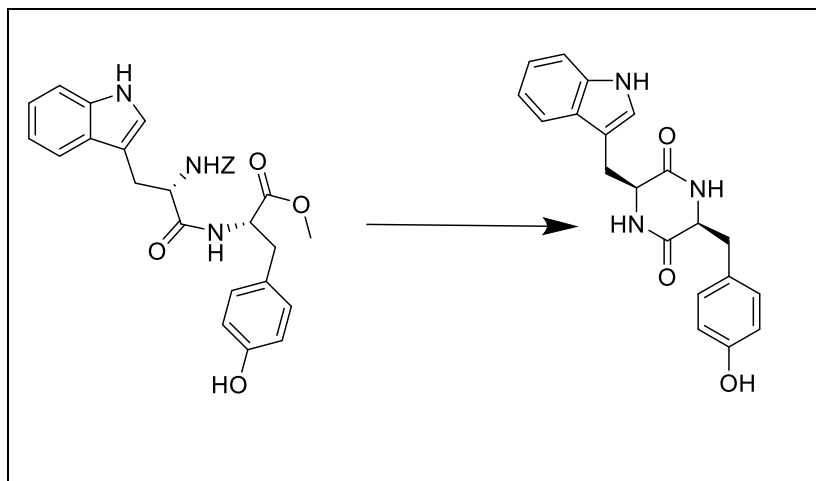
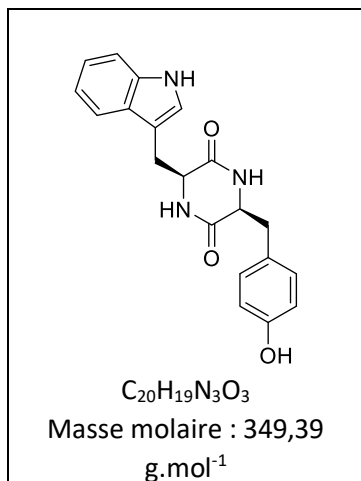
méthyl ((benzyloxy)carbonyl)-L-tryptophyl-L-tyrosinate



L'ester de tyrosine (0,58 g, 3,0 mmol) est dissoute dans 30 mL de DCM/ACN (9/1) et 1 eq (1 g, 3,0 eq) de L-tryptophane protégée par un groupement Cbz (Z-Tpn) est ajouté ainsi que 1,2 eq (1,14 g, 3,5 mmol) de TBTU et 2,2 eq de DIPEA (0,84 g, 1,13 mL, 6,5 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 h puis la réaction est stoppée par l'ajout de 10 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium et 10 mL d'eau. Après extraction liquide/liquide la phase organique est lavée par 10 mL d'une solution de carbonate de sodium puis 10 mL d'une solution saturée de chlorure de sodium et enfin 2 x 20 mL d'eau. La phase organique est ensuite séchée par du sulfate de sodium anhydre puis le solvant est évaporé sous pression réduite pour mener au produit provenant de la condensation des deux acides aminés (1,39 g, 75 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 2.77 – 2.97 (m, 2 H), 3.12 (dd, J = 14.6, 7.4 Hz, 1 H), 3.31 (dd, J = 14.5, 4.8 Hz, 1 H), 3.63 (s, 3 H), 4.52 (s, large, 1 H), 4.72 (dd, J = 13.2, 5.9 Hz, 1 H), 5.11 (dd, J = 16.1, 12.4 Hz, 2 H), 5.52 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 6.27 (d, J = 7.8 Hz, 1 H), 6.55–6.70 (m, 4 H), 6.87 (s, 1 H), 7.09 (t, J = 7.3 Hz, 1 H), 7.19 (ddd, J = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1 H), 7.29 – 7.42 (m, 6H), 7.64 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 8.22 (s, 1 H) ppm.

**(3S,6S)-3-((1H-indol-3-yl)méthyl)-6-(4-hydroxybenzyl)piperazine-2,5-dione :
Cyclo (L-Tyr-L-Tpn)**



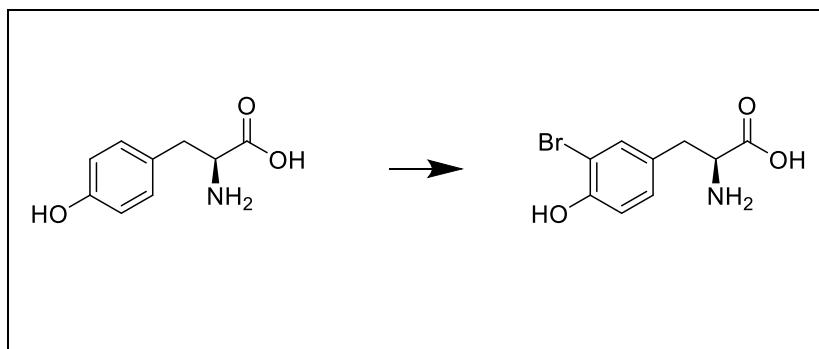
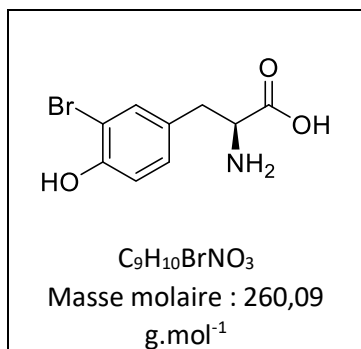
Dans un ballon bi-col équipé d'un tube réfrigérant, 0,20 g (0,56 mmol) de L-TyrOMe-L-ZTpn sont versés avec 500 μ L de cyclohexène (excès) et 8,2 mg de palladium sur charbon. Le ballon est ensuite placé sous atmosphère d'azote, 1 mL de MeOH est alors ajouté et le mélange est chauffé à reflux. Après 12 h de chauffage le brut réactionnel est filtré sur célite pour retirer le charbon et le gâteau de célite est lavé avec 2 x 1 mL de méthanol chaud. Le filtrat est évaporé et le résidu est lavé par du 2-butanone (1 mL) et de l'éther de pétrole (1 mL), le tout est mis sous agitation pendant 30 min puis le précipité est récupéré par filtration et lavé par 1 mL de 2-butanone/éther de pétrole (2:1). Enfin le produit est solubilisé dans le MeOH et séché par évaporateur rotatif pour donner la cyclo (L-Tyr-L-Tpn) avec un rendement de 43% (0,90 g).

RMN 1H (CD_3OD , 300 MHz) δ = 1.50 (dd, J = 13.6, 8.4 Hz, 1 H), 2.59 (dd, J = 13.6, 3.9 Hz, 1 H), 2.77 (dd, J = 14.5, 6.0 Hz, 1 H), 3.06 (ddd, J = 14.5, 4.0, 0.7 Hz, 1 H), 3.89 (ddd, J = 8.4, 3.9, 1.2 Hz, 1 H), 4.17 (ddd, J = 5.4, 4.0, 1.2 Hz, 1 H), 6.47 (d, J = 8.5 Hz, 2 H), 6.65 (d, J = 8.5 Hz, 2 H), 7.05 (s, 1 H), 7.08 (ddd, J = 8.1, 7.0, 1.3 Hz, 1 H), 7.15 (ddd, J = 8.1, 7.0, 1.3 Hz, 1 H), 7.37 (dt, J = 8.1, 1.0 Hz, 1 H), 7.61 (dt, J = 7.7, 1.1 Hz, 1 H) ppm.

RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) δ = 40.2, 40.3, 57.3, 57.6, 109.2, 112.2, 116.3, 119.6, 120.1, 120.2, 121.4, 127.1, 128.5, 131.9, 137.6, 157.8, 169.1, 169.2 ppm.

b. Synthèse des dicétopipérazines bromées (**13** et **14**)

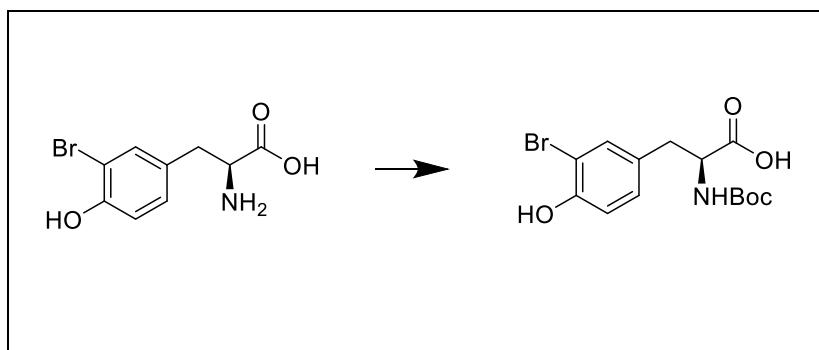
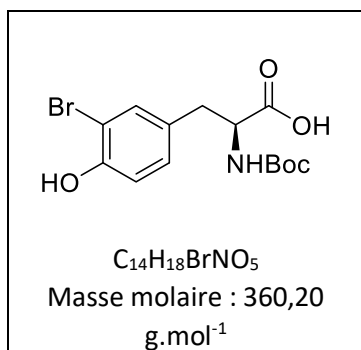
L-bromo-tyrosine : 16



La bromation de la L-tyrosine est réalisée par dissolution de 1 g (5,52 mmol) de produit dans 3 mL d'acide acétique puis ajout de 1 eq de dibrome au goutte à goutte (0,86 g, 0,27 mL, 0,55 mmol), environ deux tiers sont ajoutés dès le début puis après décoloration du milieu le tiers restant est ajouté. Après 4 h d'agitation à température ambiante le milieu réactionnel est filtré et le précipité est rincé à l'éther diéthylique et séché pour mener à 1,63 g de tyrosine bromée **16** (86,5%).

RMN 1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ = 2.99 (dd, J = 6.3, 3.0 Hz, 2 H), 4.14 (t, J = 6.3 Hz, 1 H), 6.90 (d, J = 8.3 Hz, 1 H), 7.05 (dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 1 H), 7.37 (d, J = 2.2 Hz, 1 H), 8.11–8.30 (s, large, 2 H), 10.24 (s, 1 H) ppm.

Acide (S)-3-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoïque : 17

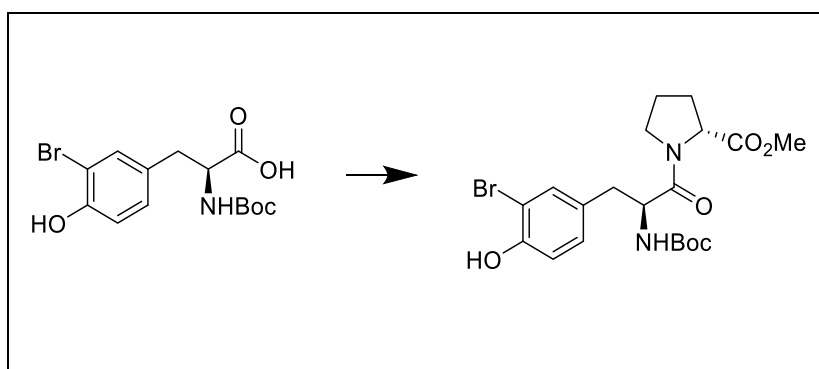
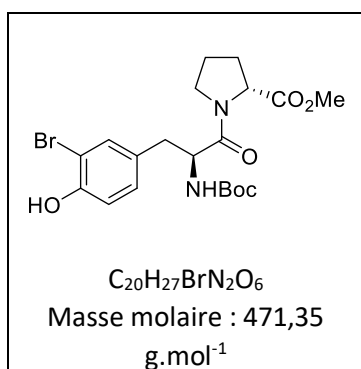


La tyrosine bromée **16** (0,81 g, 2,38 mmol) est dissoute dans 15 mL de MeOH en présence de 2,2 eq de bicarbonate de sodium (0,43 g, 5,15 mmol) et de 1,5 eq de dicarbonate de di-tert-butyle (Boc₂O)

(0,77 g, 3,53 mmol) avec 10 mL d'eau. Après 4 h d'agitation à température ambiante, le méthanol est évaporé et 15 mL d'eau sont ajoutés. Le mélange est lavé par 2 x 20 mL de cyclohexane puis la phase aqueuse est acidifiée par l'addition d'acide citrique jusqu'à ce que le pH atteigne 2. L'extraction du produit est réalisée par 3 x 30 mL d'acétate d'éthyle, puis la phase organique est séchée par du sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé par évaporateur rotatif pour mener à 0,83 g de tyrosine protégée **17** (97%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 1.45 (s, 9 H), 2.93–3.23 (m, 2 H), 4.57 (dd, J = 12.9, 5.8 Hz, 1 H), 5.03 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 6.94 (d, J = 8.3 Hz, 1 H), 7.05 (dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 1 H), 7.30 (s, 1 H) ppm.

Méthyl ((S)-3-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)-D-prolinate : 19a



Le couplage des acides aminés est réalisé par dissolution de 0,76 g (2,11 mmol) de bromo-tyrosine protégée dans 20 mL de mélange DCM/ACN (9/1) puis 1 équivalent de D-proline méthylée (0,35 g, 2,11 mmol) est ajouté avec 2,2 eq de diisopropyléthylamine (0,60 g, 0,80 mL, 4,64 mmol) et 1,2 eq de *N,N,N',N'*-tetraméthyl-O-(benzotriazol-1-yl)uronium tétrafluoroborate (0,81 g, 2,53 mmol). Après 4 h d'agitation à température ambiante la réaction est stoppée par l'ajout de 10 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium et d'eau. La phase organique est ensuite lavée par de l'eau puis elle est séchée par sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé à sec. Le brut réactionnel est déposé sur une colonne de gel de silice (20 g) est élué par un mélange de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (60/40, v/v) et le produit est obtenu avec un rendement de 60% (0,59 g).

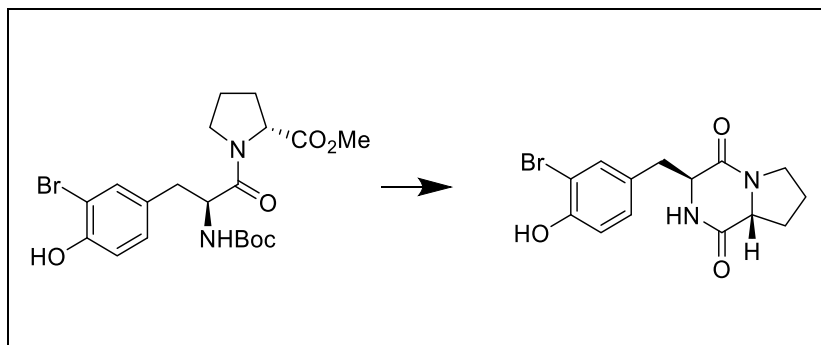
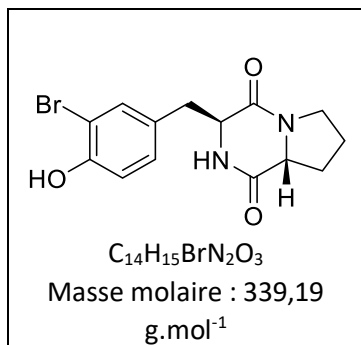
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.28 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-3), 7.04 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H, H-5), 6.86 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-6), 5.42 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH-Boc), 4.56 (dd, J = 7.3, 6.3 Hz, 1H, H-8), 4.33 (dd, J = 8.0, 3.8 Hz, 1H, H-14), 3.71 (s, 3H, O-CH₃), 3.55–3.65 (m, 1H, H-11a), 3.03–2.71 (m, 3H, H-11b, H-7a, H-7b), 2.01–1.79 (m, 3H, H12a, H-12b, H-13a), 1.63 (m, 1H, H-13b), 1.41 (s, 9H, Boc C-(CH₃)₃).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 172.2 (C-15), 170.1 (C-9), 155.0 (Boc C=O), 151.3 (C-1), 132.8 (C-3), 130.4 (C-4), 130.2 (C-5), 115.9 (C-6), 109.8 (C-2), 79.9 (Boc C-(CH₃)₃), 58.8 (C-14), 53.5 (C-8), 52.3 (C-16), 46.9 (C-11), 38.9 (C-7), 29.0 (C-12), 28.3 (Boc C-(CH₃)₃), 24.5 (C-13).

HRESIMS m/z 493.0945 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₀H₂₇BrN₂O₆Na, 493.0945)

$[\alpha]_D^{20} : -0,11$ (c 0,77, CHCl_3)

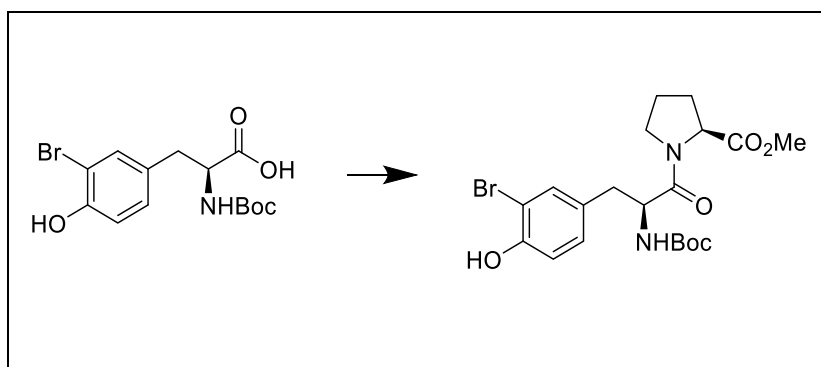
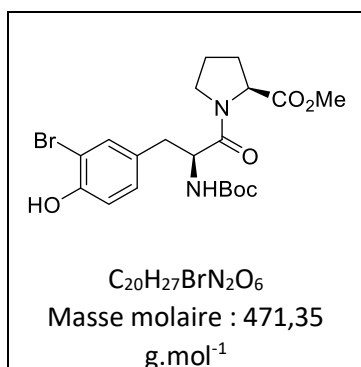
Cyclo (L-Bromo-tyrosine-D-Proline) : 13



Le produit de condensation des acides aminés **19a** (0,44 g, 0,94 mmol) est dissous dans 10 mL d'eau dans un réacteur. Celui-ci est ensuite chauffé à 130 °C pendant 4 h puis après 1 h de refroidissement le contenu du réacteur est extrait par 3 x 15 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite séchée par sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé. Le brut réactionnel est déposé sur colonne de gel de silice et est élué par de l'acétate d'éthyle pour mener à 0,20 g de cyclo (L-BrTyr-L-Pro) (64%).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) et RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : cf tableau 17 scène 3. Page 72.

méthyl ((S)-3-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)-L-prolinate : 19b



Le couplage des acides aminés est réalisé par dissolution de 1,8 g (5,00 mmol) de bromo-tyrosine protégée dans 50 mL de mélange DCM/ACN (9/1) puis 1 équivalent de L-proline méthylée (0,83 g, 5,00 mmol) est ajouté avec 2,2 eq de diisopropyléthylamine (1,42 g, 1,90 mL, 11,01 mmol) et 1,2 eq de *N,N,N',N'*-Tetraméthyl-O-(benzotriazol-1-yl)uronium tétrafluoroborate (1,90 g, 5,92 mmol). Après 4 h

d'agitation à température ambiante la réaction est stoppée par l'ajout de 50 mL d'une solution saturée de chlorure d'ammonium et d'eau. La phase organique est ensuite lavée par de l'eau puis elle est séchée par sulfate de sodium anhydre et le solvant est évaporé à sec. Le brut réactionnel est déposé sur une colonne de gel de silice (20 g) est élué par un mélange de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle (60/40, v/v) et le produit est obtenu avec un rendement de 20% (0,50 g).

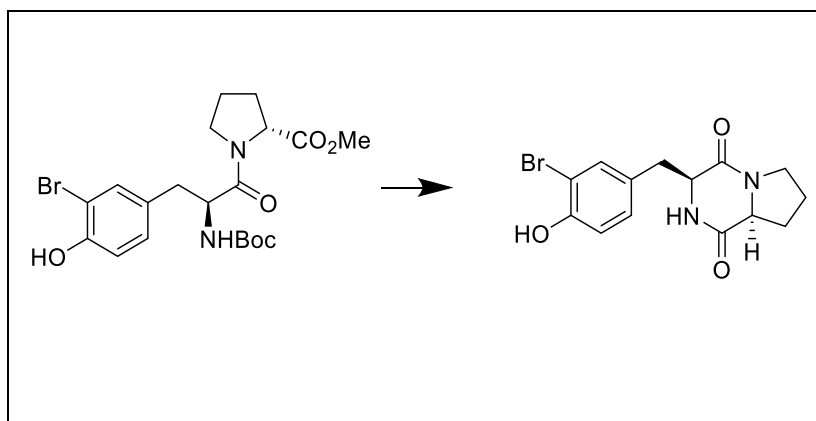
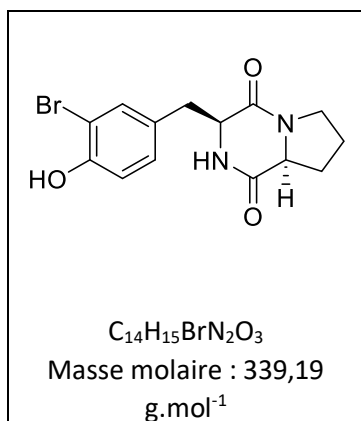
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) : mélange de rotamères δ 7.55 and 7.37 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-3), 7.25 and 7.10 (dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 1H, H-5), 7.04 and 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-6), 4.82 et 4.60 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-8), 4.40 et 4.50 (dd, $J = 8.4, 4.1$ Hz, 1H, H-14), 3.62 et 3.75 (s, 3H, O-CH₃), 3.40, 3.21 et 3.67–3.55 (m, 2H, H-11a and H-11b), 3.35 et 3.02 (dd, $J = 13.9, 6.7$ Hz, 1H, H-7a), 3.17 et 2.82 (dd, $J = 13.9, 5.9$ Hz, 1H, H-7b), 2.18 and 2.05 (m, 1H, H-12a), 1.96 et 1.81 (m, 1H, H-12b), 2.02–1.88 et 1.74 (m, 2H, H-13a et H-13b), 1.39 (s, 9H, Boc C-(CH₃)₃).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : δ 172.5 et 172.2 (C-15), 170.2 et 170.1 (C-9), 155.2 (Boc C=O), 148.5 et 148.2 (C-1), 134.7 et 133.1 (C-3), 129.7 (C-4), 130.3 et 130.1 (C-5), 123.3 et 116.4 (C-6), 109.8 et 109.7 (C-2), 80.1 (Boc C-(CH₃)₃), 59.2 et 53.1 (C-14), 54.6 et 52.8 (C-8), 52.5 et 52.4 (C-16), 47.2 (C-11), 38.3 et 37.3 (C-7), 30.7 et 29.2 (C-12), 28.4 (Boc C-(CH₃)₃), 25.0 et 22.4 (C-13).

HRESIMS m/z 493.0941 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ (calcd for C₂₀H₂₇BrN₂O₆Na, 493.0945).

$[\alpha]_D^{20}$: +0,39 (c 0,77, CHCl₃)

Cyclo (L-Bromo-tyrosine-L-Proline) : 14



Le produit de condensation des acides aminés **19b** (0,23 g, 0,49 mmol) est dissous dans 3 mL d'acide acétique dans un réacteur. Celui-ci est ensuite chauffé à 130°C pendant 4 h puis après 1 h de refroidissement le contenu du réacteur est évaporé à sec. Le brut réactionnel est déposé sur colonne de gel de silice et est élué par un mélange DCM/AcOEt (60/40 v/v) pour mener à 0,60 g de cyclo (L-BrTyr-L-Pro) (36%).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) et RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) : cf tableau 17 scène 3. Page 72.

D. Ciblage des composés actifs

1. *Obtention des données pour réseaux moléculaires*

Les fractions ont été analysées par LC-MS/MS à la plateforme P2M2 de l'INRA comme décrit précédemment. Les données ont ensuite été entrées dans la plateforme GNPS (Global Natural Products Social Networking) pour établir les réseaux moléculaires. Les réseaux formés sont visualisés par le logiciel Cytoscape 3.5.1.

2. *Traitement des données par MZmine et analyse statistique*

Les données utilisées pour cette étude ont été obtenues par HPLC/MS basse résolution comme précédemment décrit. Les données sont traitées par le logiciel MZmine 2, les ions sont extraits des spectres puis la déconvolution des pics est effectuée par la méthode Wavelet XCMS. Après alignement des pics, le tableau obtenu est entré dans le logiciel Rstudio et une analyse par PLS-DA est effectuée pour comparer les fractions actives et inactives.

E. Fractionnement bioguidé par CPC

1. *Obtention de l'extrait*

L'expérience 3 du plan d'expérience a été répétée selon les mêmes conditions de culture. 2,5 L de milieu TY ont été versés dans le bioréacteur etensemencés avec une pré-culture à hauteur de 5%. Le pH a été ajusté à 6, l'agitation réglée à 250 rpm minimum et 400 rpm maximum en cascade avec le pourcentage d'oxygène dissous (min 40%). Des solutions de soude (5 M) et d'acide sulfurique (0,5 M) ont été connectées à la pompe de la cuve pour ajuster le pH au cours de la culture. Au bout de 4 jours de culture le milieu a été récupéré et traité comme précédemment décrit pour mener à l'extrait de résine et l'extrait surnageant.

2. *Bioguidage*

Le bioguidage a été réalisé par mesure de l'activité cytotoxique de chaque extrait et fraction obtenu. L'activité a été évaluée par détermination de la CI_{50} comme précédemment décrit. Les fractions les plus actives ont été sélectionnées pour poursuivre le fractionnement.

3. Fractionnement par CPC

La CPC (chromatographie par partage centrifuge) utilisée est un appareil de FCPC (Fast Centrifugal Partition Chromatography) de chez Kromaton (Annonay, France). Le volume de colonne est de 57 mL, l'appareil est relié à une pompe à solvant en amont et à un collecteur de fractions en aval. Après optimisation des conditions opératoires par mesure de la fraction d'éjection, les paramètres ont été fixés à une vitesse de rotation de 1200 rpm, 2 mL/min de débit en mode ascendant et un système éluant constitué d'eau distillée et d'acétate d'éthyle de qualité analytique. La collecte a été réglée sur une minute par tube soit 2 mL par tube.

Les fractions ont été déposées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice (SiO_2) avec indicateur de fluorescence (10 – 12 μm , Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck 5554) en phase normale. Après dépôt de quelques microlitres de chaque fraction, les plaques sont mises à migrer dans une cuve contenant le système éluant (DCM/MeOH, 95/5, v/v). Elles sont ensuite observées sous UV à 254 nm, 312 nm et 365 nm. Enfin elles sont révélées par une solution d'anhydride sulfurique (ANS : 0,5 mg de méthoxybenzaldéhyde dissous dans 85 mL de méthanol en 10 mL d'acide acétique glacial. Puis 2% d'acide sulfurique concentré sont rajoutés extemporanément). Après pulvérisation la plaque est chauffée à 100 °C.

Les fractions sont rassemblées selon leurs principaux constituants et sont séchées à sec par évaporateur rotatif. 5 fractions sont ainsi obtenues.

Après éjection de la majorité des composants de l'extrait, la FCPC est passée en mode descendant et de la phase supérieure (AcOEt) est injectée pour pousser la phase inférieure (eau). La phase aqueuse récupérée est également séchée pour mener à la fraction « eau ».

4. Fractionnement de la fraction CPC eau

La fraction CPC eau (20,4 mg) a été dissoute dans un mélange eau/MeOH (50/50, v/v) puis filtrée sur filtre à 0,45 μm et injectée en HPLC semi-préparative sur une colonne Prevail C₁₈ (5 μm , 250 x 10 mm, Grace, Columbia, MD, USA). Le système éluant est constitué d'eau ultra pure et d'acétonitrile de qualité HPLC selon le gradient décrit ci-dessous. Les 4 fractions obtenues ainsi que la poubelle en sortie de colonne ont été évaporés à sec par évaporateur rotatif.

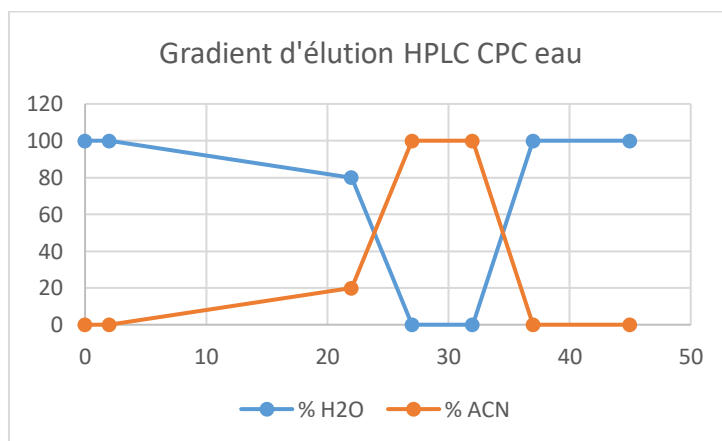
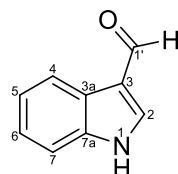


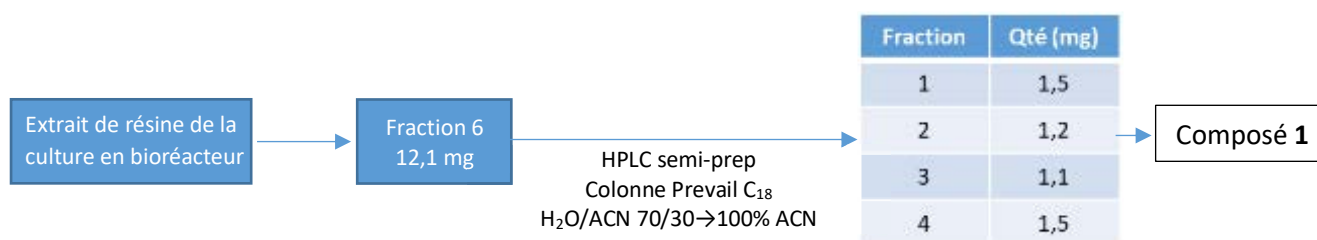
Figure 66 : Gradient d'élution utilisé pour le fractionnement de la fraction CPC eau

F. Description des composés isolés à partir des cultures de la souche DP94

1. Indole-3-carboxaldéhyde (1)



Isolement :



Temps de rétention : 26,4 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

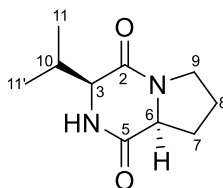
Formule brute : C₉H₇NO (MM : 145 g.mol⁻¹)

HRESIMS : [M+H]⁺ *m/z* trouvé : 146,0599 , calculé : 146,0600

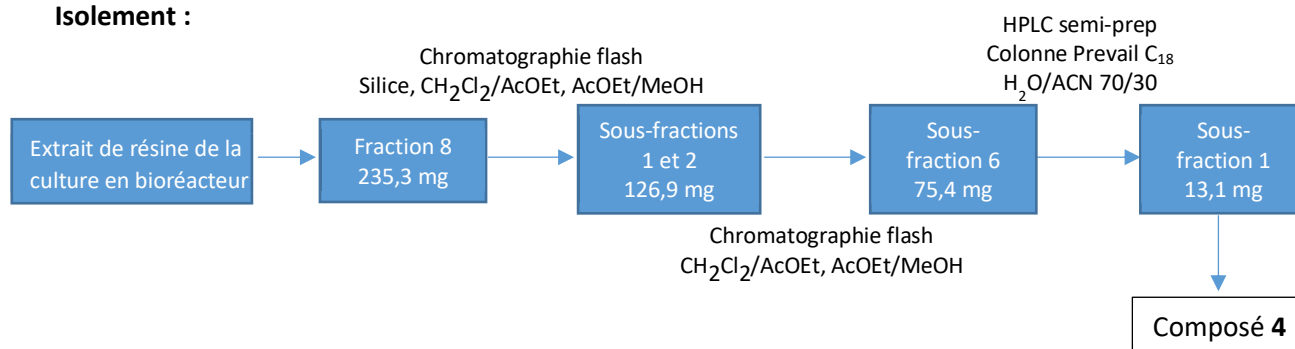
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD [125]

Position	δ _c	δ _H (J en Hertz)
1-NH	-	-
2-CH	139.7	8.10 (s)
3	120.1	-
3a	125.6	-
4-CH	122.3	8.16 (dt, 7.6, 0.9 Hz)
5-CH	123.6	7.25 (dt, 7.6, 1.2 Hz)
6-CH	125.0	7.28 (td, 7.6, 7.8, 1.2 Hz)
7-CH	113.1	7.48 (dt, 8.0, 0.8 Hz)
7a	139.1	-
1'-CHO	187.2	9.89 (s)

2. *Cyclo (L-Val-L-Pro) (4)*



Isolement :



Temps de rétention : 21,9 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

Formule brute : C₁₀H₁₆N₂O₂ (MM : 196 g.mol⁻¹)

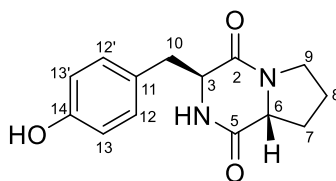
[α]_D²⁰ : – 23,0 (c 1, CHCl₃)

HRESIMS : [M+H]⁺ *m/z* trouvé : 197,1282 , calculé : 197,1285

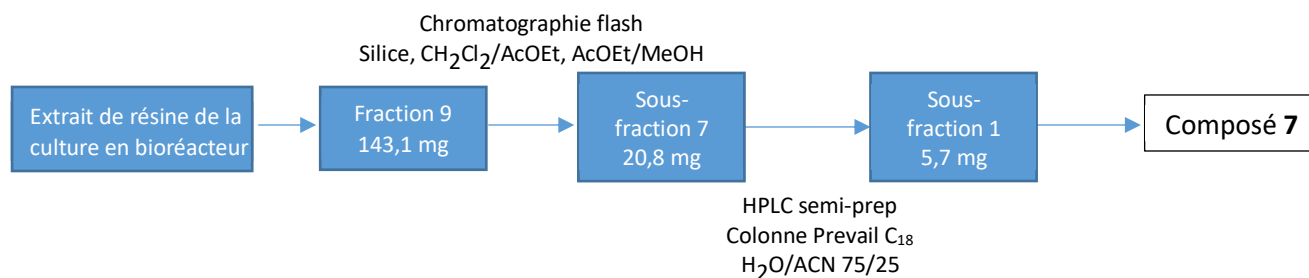
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD [127]

Position	δ _H (J en Hertz)
2	-
3-CH	4.03 (m)
5	-
6-CH	4.15 – 4.25 (m)
7-CH ₂	2.29 – 2.37 (m) 2.00 – 2.07 (m)
8-CH ₂	1.86 – 1.99 (m)
9-CH ₂	3.47 – 3.68 (m)
10-CH	2.49 (qd, 7.1, 2.6 Hz)
11-CH ₃	0.94 (d, 6.9 Hz)
11'-CH ₃	1.09 (d, 7.2 Hz)

3. Cyclo (L-Tyr-D-Pro) (7)



Isolement :



Temps de rétention : 20,7 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

Formule brute : C₁₄H₁₆N₂O₃ (MM : 260 g.mol⁻¹)

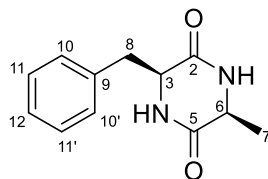
[α]_D²⁰ : – 38,2 (c 1, MeOH)

HRESIMS : [M+H]⁺ *m/z* trouvé : 261,1226, calculé : 261,1234

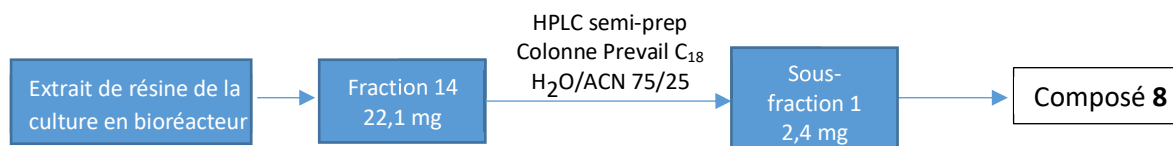
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD [128]

Position	δ _C	δ _H (J en Hertz)
2	167.6	-
3-CH	59.9	4.13 (td, 4.3, 1.0 Hz)
5	171.4	-
6-CH	59.1	2.57 (dd, 10.4, 6.3 Hz)
7-CH ₂	29.8	1.56 – 1.71 (m) 1.98 – 2.10 (m)
8-CH ₂	22.3	1.56 – 1.71 (m) 1.84 – 1.95 (m)
9-CH ₂	46.0	3.25 – 3.36 (m) 3.45 – 3.59 (m)
10-CH ₂	40.2	2.84 (dd, 13.8, 4.3 Hz) 3.10 (dd, 13.8, 4.3 Hz)
11	125.5	-
12-CH 12'-CH	132.2	6.92 (d, 8.5 Hz)
13-CH 13'-CH	117.0	6.67 (d, 8.5 Hz)
14	160.1	-

4. *Cyclo (L-Ala-L-Phe)* (**8**)



Isolement :



Temps de rétention : 22,8 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

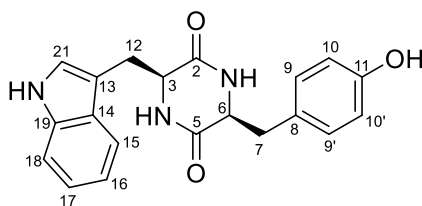
Formule brute : C₁₂H₁₄N₂O₂ (MM : 218 g.mol⁻¹)

HRESIMS : [M+Na]⁺ *m/z* trouvé : 241,0953, calculée : 241,0947

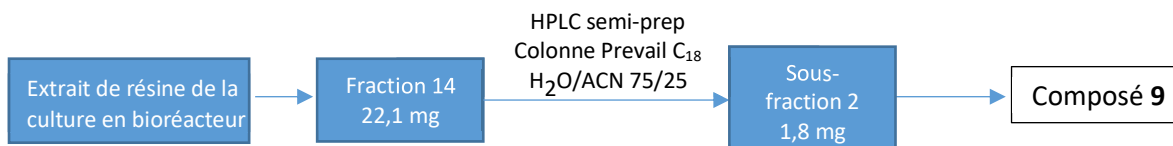
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le DMSO-*d*₆ [157]

Position	δ _H (J en Hertz)
1-NH	8.12 (bs)
2	-
3-CH	3.58 – 3.63 (m)
4-NH	8.02 (bs)
5	-
6-CH	4.14 – 4.20 (m)
7-CH ₃	0.45 (d, 7.0 Hz)
8-CH ₂	2.85 (dd, 14.0, 5.1 Hz) 3.10 (dd, 13.0, 4.0 Hz)
9	-
10-CH 10'-CH	7.20 – 7.32 (m)
11-CH 11'-CH	
12	

5. *Cyclo (L-Tyr-L-Tpn) (9)*



Isolement :



Temps de rétention : 24,4 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

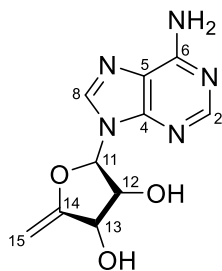
Formule brute : C₂₀H₁₉N₃O₃ (MM : 349 g.mol⁻¹)

HRESIMS : [M+Na]⁺ *m/z* trouvé : 372,1324, calculé : 372,1319

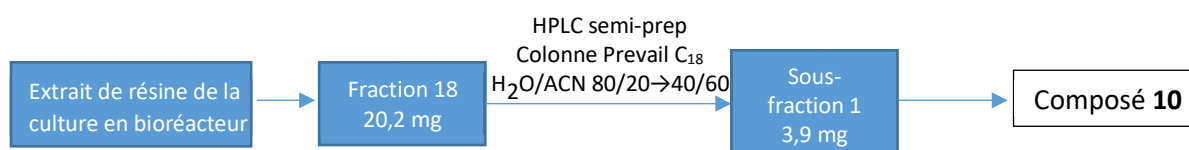
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD [130]

Position	δ _c	δ _H (J en Hertz)
2	169.1	-
3-CH	57.6	3.89 (ddd, 8.4, 3.9, 1.2 Hz)
5	169.2	-
6-CH	57.3	4.17 (ddd, 5.4, 4.0, 1.2 Hz)
7-CH₂	40.2	2.77 (dd, 14.5, 6.0 Hz) 3.06 (ddd, 14.5, 4.0, 0.7 Hz)
8	127.1	-
9-CH 9'-CH	131.9	6.47 (d, 8.5 Hz)
10-CH 10'-CH	116.3	6.65 (d, 8.5 Hz)
11	157.8	-
12-CH₂	40.3	2.59 (dd, 13.6, 3.9 Hz) 1.50 (dd, 13.6, 8.4 Hz)
13	109.2	-
14	128.5	-
15-CH	112.2	7.37 (dt, 8.1, 1.0 Hz)
16-CH	121.4	7.15 (ddd, 8.1, 7.0, 1.3 Hz)
17-CH	120.1	7.08 (ddd, 8.1, 7.0, 1.3 Hz)
18-CH	119.6	7.61 (dt, 7.7, 1.1 Hz)
19	137.6	-
21-CH	120.2	7.05 (s)

6. 1-(5-Deoxy- β -D-erythro-pent-4-enofuranosyl) (**10**)



Isolement :



Temps de rétention : 20,4 min (Prevail[®] C₁₈, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

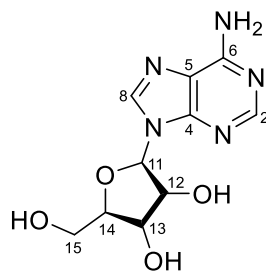
Formule brute : C₁₀H₁₁N₅O₃ (MM : 249 g.mol⁻¹)

HRESIMS : [M+H]⁺ *m/z* trouvé : 250,0940, calculé : 250,0935

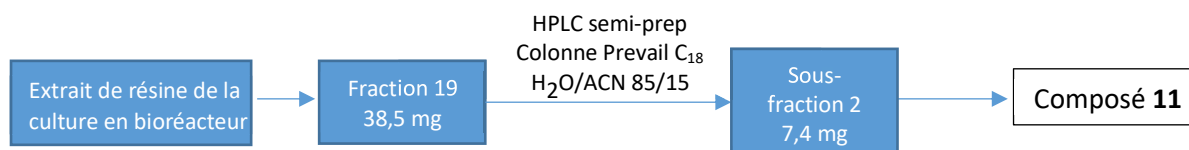
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD [131]

Position	δ_c	δ_H (J en Hertz)
2-CH	154.0	8.21 (s)
4	149.6	-
5	119.4	-
6	156.3	-
8-CH	140.7	8.25 (s)
11-CH	89.9	6.22 (d, 5.3 Hz)
12-CH	74.3	4.85 (m)
13-CH	70.0	4.78 (d, 5.3 Hz)
14	161.7	-
15-CH₂	86.1	4.35 (s) 4.48 (s)

7. Adénosine (11)



Isolement :



Temps de rétention : 19,1 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

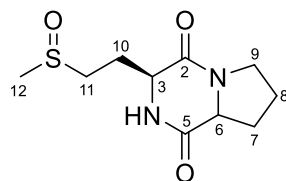
Formule brute : C₁₀H₁₃N₅O₄ (MM : 267 g.mol⁻¹)

HRESIMS : [M+H]⁺ *m/z* trouvé : 268,1046, calculé : 268,1041

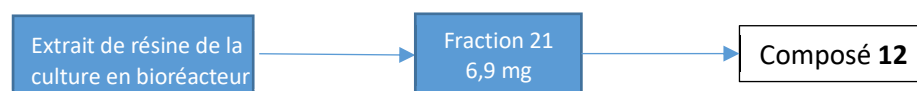
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le D₂O comparé à un standard

Position	δ _c	δ _H (J en Hertz)
2-CH	152.5	8.21 (s)
4	148.5	-
5	118.9	-
6	155.6	-
8-CH	140.3	8.30 (s)
10-NH₂	-	
11-CH	88.2	6.04 (d, 6.2 Hz)
12-CH	73.5	4.77 (m)
13-CH	70.7	4.40 (dd, 5.2, 3.3 Hz)
14-CH	85.8	4.27 (dd, 6.3, 3.3 Hz)
15-CH₂	61.4	3.80 (dd, 12.9, 3.5 Hz) 3.89 (dd, 12.9, 2.8 Hz)

8. *Cyclo (L-OMet-L-Pro)* (**12**)



Isolement :



Temps de rétention : 18,8 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

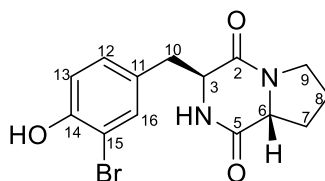
Formule brute : C₁₀H₁₆N₂O₃S (MM : 244 g.mol⁻¹)

[α]_D²⁰ : -4,0 (c 1, MeOH)

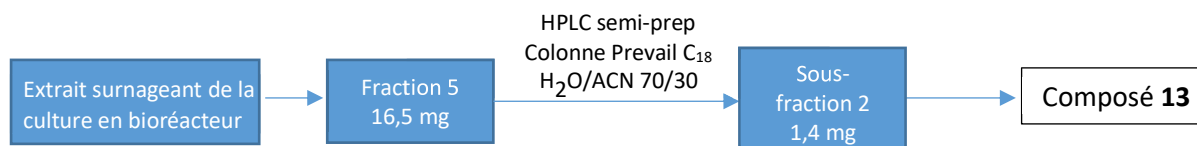
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD [133]

Position	δ _c	δ _H (J en Hertz)
2	167.1	-
3-CH	55.1	4.33 – 4.40 (m)
5	172.6	-
6-CH	30.4	4.23 – 4.31 (m)
7-CH₂	29.3	1.93 – 2.08 (m) 2.24 – 2.37 (m)
8-CH₂	23.5	1.93 – 2.08 (m)
9-CH₂	46.5	3.53 (dd, 7.7, 4.2 Hz)
10-CH₂	23.8	2.24 – 2.37 (m)
11-CH₂	49.8	2.80 – 3.06 (m)
12-CH₃	38.2	2.67 (s)

9. Cyclo (L-Br-Tyr-D-Pro) (13)



Isolement :



Temps de rétention : 23,4 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

Formule brute : C₁₄H₁₅BrN₂O₃ (MM : 339 g.mol⁻¹)

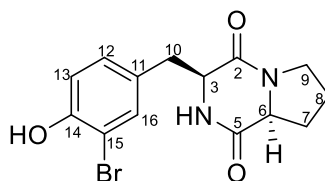
[α]_D²⁰ : + 38,4 (c 0,77, MeOH)

HRESIMS : [M+H]⁺ *m/z* trouvé : 339,0329, calculé : 339,0339

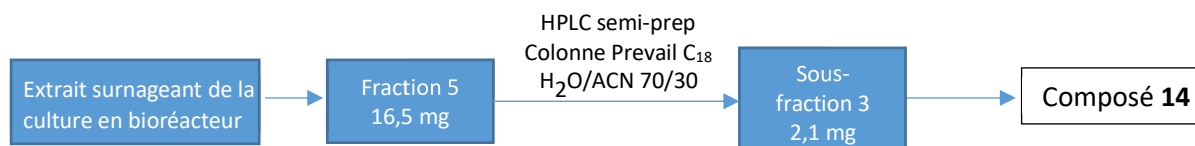
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD

Position	δ _c	δ _H (J en Hertz)
2	167.3	-
3-CH	59.8	4.14 (t, 4.7 Hz)
5	171.1	-
6-CH	59.3	2.82 (m)
7-CH₂	29.9	1.70 (m) 2.12 (m)
8-CH₂	22.5	1.95 (m) 1.70 (m)
9-CH₂	46.2	3.36 (m) 3.56 (m)
10-CH₂	39.7	2.88 (dd, 13.9, 4.9 Hz) 3.09 (dd, 13.9, 4.9 Hz)
11	128.9	-
12-CH	131.3	6.98 (dd, 8.2, 2.1 Hz)
13-CH	117.2	6.83 (d, 8.2 Hz)
14	110.8	-
15	155.0	-
16-CH	135.5	7.29 (d, 2.1 Hz)

10. Cyclo (L-Br-Tyr-L-Pro) (**14**)



Isolement :



Temps de rétention : 23,9 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

Formule brute : C₁₄H₁₅BrN₂O₃ (MM : 339 g.mol⁻¹)

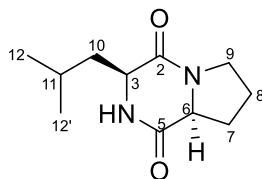
[α]_D²⁰ : - 29,4 (c 0,77, MeOH)

HRESIMS : [M+H]⁺ *m/z* trouvé : 339,0329, calculé : 339,0339

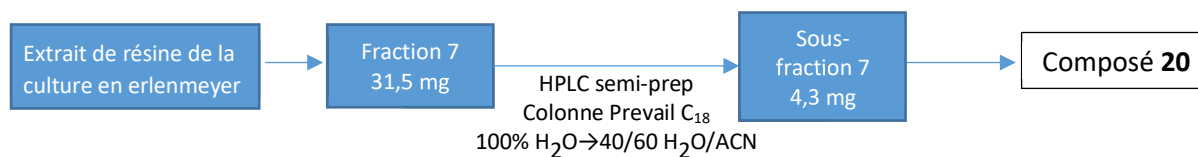
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD

Position	δ _C	δ _H (J en Hertz)
2	166.7	-
3-CH	57.7	4.38 (td, 4.7, 2.0 Hz)
5	170.7	-
6-CH	60.0	4.07 (ddd, 10.9, 6.3, 2.0 Hz)
7-CH₂	29.5	1.25 (m) 2.13 (m)
8-CH₂	22.6	1.84 (m)
9-CH₂	45.9	3.38 (m) 3.57 (m)
10-CH₂	37.1	2.99 (dd, 14.2, 4.7 Hz) 3.13 (dd, 14.2, 4.7 Hz)
11	129.6	-
12-CH	131.4	7.03 (dd, 8.3, 2.2 Hz)
13-CH	116.9	6.81 (d, 8.3 Hz)
14	110.6	-
15	154.5	-
16-CH	135.4	7.35 (d, 2.2 Hz)

11. Cyclo (L-Leu-L-Pro) (20)



Isolement :



Temps de rétention : 24,1 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

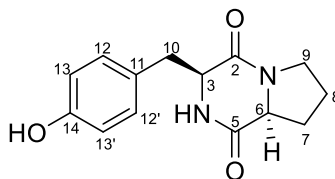
Formule brute : C₁₁H₁₈N₂O₂ (MM : 210 g.mol⁻¹)

[α]_D²⁰ : – 27,4 (c 1, MeOH)

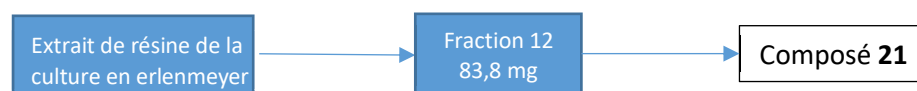
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CDCl₃ [126]

Position	δ _H (J en Hertz)
2	-
3-CH	4.04 (dd, 9.6, 3.9 Hz)
5	-
6-CH	4.14 (t, 8.2 Hz)
7-CH₂	2.30 – 2.45 (m)
8-CH₂	1.98 – 2.20 (m)
9-CH₂	3.49 – 3.69 (m)
10-CH₂	1.55 (ddd, 14.5, 9.6, 5.0 Hz) 1.62 – 1.82 (m)
11-CH	1.85 – 1.98 (m)
12-CH₃	0.97 (d, 6.5 Hz)
12'-CH₃	1.02 (d, 6.5 Hz)

12. Cyclo (L-Tyr-L-Pro) (21)



Isolement :



Temps de rétention : 21,1 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

Formule brute : C₁₄H₁₆N₂O₃ (MM : 260 g.mol⁻¹)

[α]_D²⁰ : + 15,7 (c 1, MeOH)

HRESIMS : [M+H]⁺ *m/z* trouvé : 261,1226, calculée : 261,1234

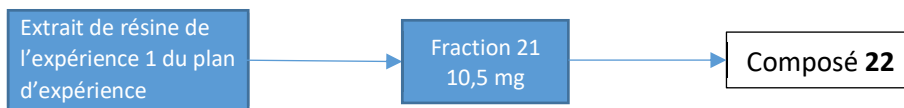
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD [135]

Position	δ _H (J en Hertz)
2	-
3-CH	4.36 (td, 4.8, 1.8 Hz)
5	-
6-CH	4.05 (ddd, 10.9, 6.3, 1.8 Hz)
7-CH₂	1.16 – 1.26 (m) 2.02 – 2.16 (m)
8-CH₂	1.74 – 1.87 (m)
9-CH₂	3.32 – 3.43 (m) 3.48 – 3.61 (m)
10-CH₂	3.08 (m)
11	-
12-CH 12'-CH	7.04 (d, 8.5 Hz)
13-CH 13'-CH	6.70 (d, 8.5 Hz)

13. Adénine (22)



Isolement :



Temps de rétention : 19,5 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

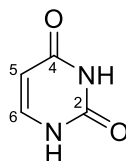
Formule brute : C₅H₅N₅ (MM : 135 g.mol⁻¹)

HRESIMS : [M+Na]⁺ *m/z* trouvé : 158,0443, calculé : 158,0435

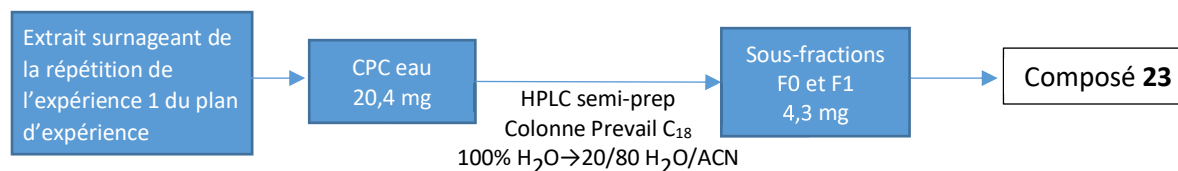
RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le CD₃OD comparé à un standard

Position	δ _H (J en Hertz)
2-CH	8.09 (d, 3.6 Hz)
4	-
5	-
6	-
8-CH	7.08 (s)

14. Uracile (24)



Isolement :



Temps de rétention : 10,1 min (Prevail[®] C₁₈, 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient d'analyse classique décrit précédemment)

Formule brute : C₄H₄N₂O₂ (MM : 112 g.mol⁻¹)

HRESIMS : [M-H]⁻ *m/z* trouvé : 111,0200, calculé : 158,0200

RMN : Déplacements chimiques observés en RMN, dans le DMSO-*d*₆

Position	δ _H (J en Hertz)
2	-
4	-
5-CH	5.44 (d, 7.6 Hz)
6-CH	7.38 (d, 7.6 Hz)

ACTE II : Etude de la relation lichen-bactérie

Scène 1 : Etat de l'art

L'étude de la relation bactérie-lichen dans ces travaux sera réalisée par le biais de l'étude de la communication chimique. Quel type d'interaction existe-t-il entre ces différents organismes ? Comment communiquent-ils entre eux ? Ces problématiques seront abordées par l'étude de l'effet de composés lichéniques sur des souches bactériennes associées aux lichens et par des essais de biotransformation de composés lichéniques par ces bactéries.

A. La bactérie au sein d'un écosystème complexe

Les bactéries sont des organismes ubiquitaires, retrouvés dans tous types d'écosystèmes, des profondeurs marines colonisées par des bactéries piézopsychrophiles aux plus hauts sommets dont les glaciers renferment des souches psychrophiles. Sans oublier tous les organismes vivants : animaux, végétaux, champignons... Au sein de tous ces écosystèmes, des capacités de défense, de communication et d'autres types d'échanges se sont développés.

1. Les types d'interactions

a. Les interactions conflictuelles

Ce type d'interaction, peut être délétère pour l'un des organismes.

- Il peut s'agir d'une simple **compétition** entre plusieurs organismes situés au même niveau trophique ou sur des niveaux différents. Ils utilisent la même ressource, généralement limitante, ou bien se partagent le même abri. Cette mise en compétition peut avoir lieu entre différentes espèces on parle de compétition interspécifique mais elle existe également entre des individus de la même espèce on parle alors de compétition intraspécifique. Ce type d'interaction peut amener au développement de stratégies par un organisme pour prendre le dessus. Dans le cas de nos bactéries, cela peut aboutir à la production et à la diffusion dans le milieu de composés toxiques tels que des antibiotiques, il s'agit alors d'une **compétition par interférence**. Il existe également une **compétition par exploitation** où l'un des organismes consomme la majorité des nutriments empêchant ainsi le second de se développer [22,158]. Plusieurs exemples de compétition par exploitation sont décrits par Ghoul *et al.* comme par exemple la capacité de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Escherichia coli* à passer du mode anaérobie en mode aérobie. La consommation d'oxygène devient alors possible pour ces organismes et leur permet ainsi un développement important de la culture et donc une consommation rapide des ressources. Certains micro-organismes peuvent également développer la capacité de production de composés qui permettent une exploitation intense des ressources comme les sidérophores ou des enzymes capables de dégrader des nutriments complexes [159]. La compétition peut également avoir lieu pour l'occupation d'un endroit, certaines souches ont alors mis en place des stratégies pour tuer leurs compétiteurs ou pour les délocaliser. On peut citer comme exemple la production de surfactants, les rhamnolipides dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* qui confèrent aux bactéries une mobilité en surface [160].

- Dans le cas où il n'existe pas de réelle compétition entre deux organismes mais que la simple présence de l'un exerce un effet délétère sur l'autre, sans que le premier ne tire avantage de cet effet,

on parle alors d'**amensalisme** ou d'**antagonisme**. Cette situation est généralement liée à une allélopathie, ce qui signifie qu'au cours du métabolisme d'une bactérie un composé toxique ou répulsif pour une autre espèce est produit et excrété [161].

- Le plus manifeste de ce type d'interaction est probablement la **prédation**. Dans cette situation une espèce d'un écosystème se nourrit avec une ou plusieurs autres espèces, de façon parfois obligatoire. L'organisme nuisible est appelé prédateur et l'autre est une proie. Ce type d'interaction ne mène généralement pas à une éradication totale de l'espèce proie de l'écosystème car sa présence est nécessaire pour le prédateur. Certaines bactéries sont prédatrices telle que *Agromyces ramosus*. Cette dernière est une bactérie présente dans le sol et qui détruit de nombreuses souches gram-positif et même certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae*. C'est un prédateur non-obligatoire qui se fixe à sa proie, l'enlace avec son mycélium puis la détruit (Figure 67) [162].

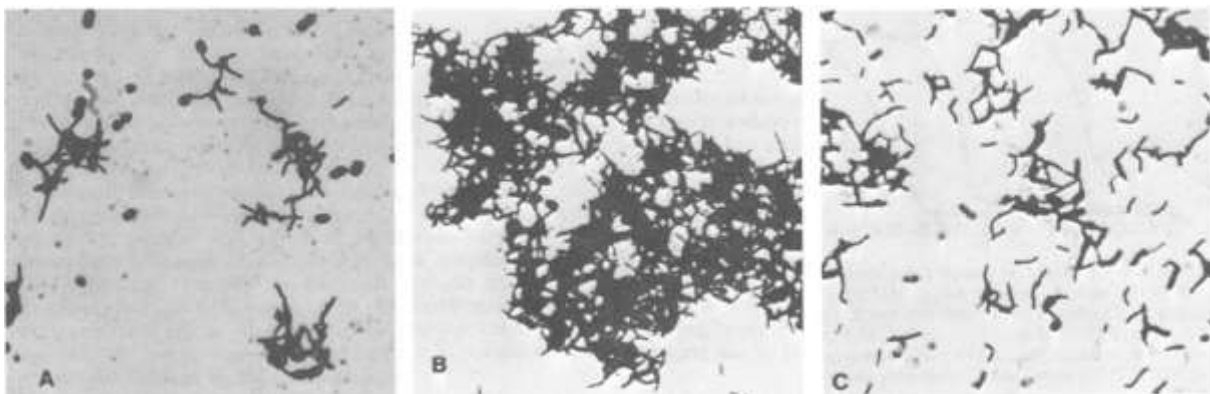


Figure 67 : Interactions entre *Agromyces ramosus* ATCC 25173 et *Azotobacter vinelandii*. A) Extension des hyphes de *A. ramosus* vers *A. vinelandii* à 29 h, B) Cellules de *A. vinelandii* recouvertes par le mycelium de *A. ramosus* à 53 h, C) Mycelium fragmenté de *A. ramosus* à 161 h, il ne reste que quelques cellules de *A. vinelandii* [162].

Micavibrio spp, quant à elle, a un cycle prédateur obligatoire où elle se fixe à sa proie, en absorbe le contenu tout en se développant autour jusqu'à la mort de la bactérie hôte (Figure 68-A) [163]. Un autre exemple est *Bdellovibrio* spp. qui s'accroche à une bactérie proie, pénètre à l'intérieur et s'y développe en tuant la bactérie hôte (Figure 68-B) [164]. Elle est parfois considérée comme une bactérie prédatrice et parfois comme une bactérie parasite car elle reste un certain temps à l'intérieur de l'organisme hôte, répondant ainsi à la définition du parasitisme mais elle aboutit à la mort de celui-ci. Le terme le plus approprié semble être parasitoïde (parasite qui induit la mort de l'hôte). Ces deux genres bactériens sont de plus en plus étudiés pour leur éventuelle utilisation en thérapeutique [165].

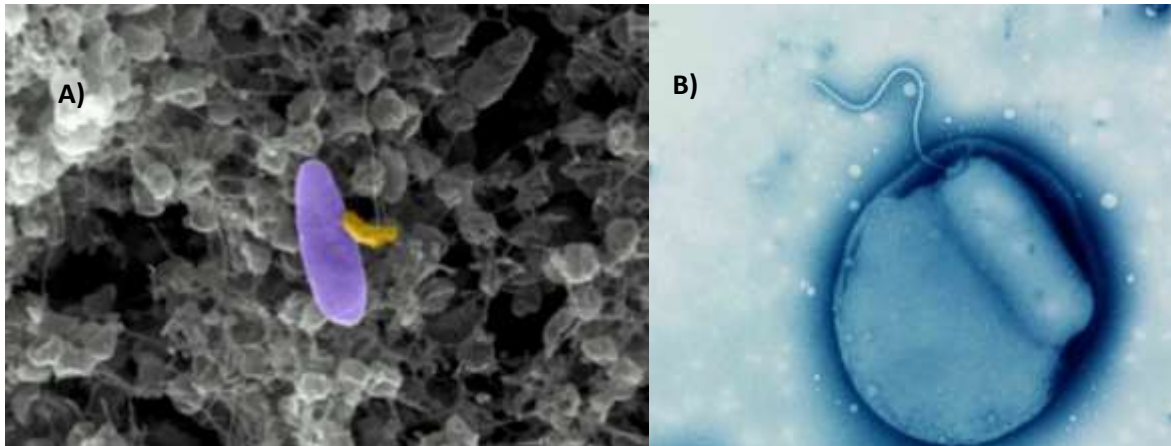


Figure 68: A) *Micavibrio* sp (en jaune) attachée à sa proie : *Pseudomonas aeruginosa* (en violet) (<https://blogs.scientificamerican.com/lab-rat/living-antibiotics-bacteria-that-suck-the-life-out-of-their-prey/>), B) *Bdellovibrio* sp. envahissant une bactérie proie (<https://hbsciu.com/2015/01/01/this-family-preyed-together-didnt-stay-together-4/>).

- La dernière interaction avec des conséquences néfastes pour l'un des organismes est le **parasitisme**. Ce type de relation est directe, prolongée et parfois obligatoire pour l'espèce parasite. On distingue les endoparasites qui vivent à l'intérieur de l'hôte et les ectoparasites qui se développent à sa surface. Dans ce type d'interaction le parasite nuit à l'hôte mais sans le tuer car sa propre survie en dépend. Les bactéries sont impliquées dans de nombreux cas de parasitisme. Les infections bactériennes appartiennent au registre du parasitisme car les bactéries pathogènes vivent à l'intérieur de leur hôte en provoquant des désagréments. Récemment, une souche bactérienne nommée TM7x, obtenue à partir de la cavité buccale humaine, a montré un caractère parasite obligatoire envers une souche d'*Actinomyces odontolyticus*. Une analyse génomique de cette souche a mis en évidence son incapacité à biosynthétiser les acides aminés, expliquant cette nécessité de vivre aux dépens d'une autre espèce (Figure 69-A) [166]. La bactérie *Wolbachia* peut également être considérée comme parasite dans le cadre de l'infection du cloporte. En tant que parasite de la reproduction elle induit entre autre la féminisation des mâles génétiques et l'arrêt du développement larvaire des mâles (Figure 69-B) [22]. Comme dans le cas de *Bdellovibrio*, cette interaction peut être attribuée à différents registres, celui du parasitisme et celui des symbioses car l'effet induit par *Wolbachia* n'est pas directement délétère sur l'organisme hôte mais sur le sexe ratio de l'espèce.

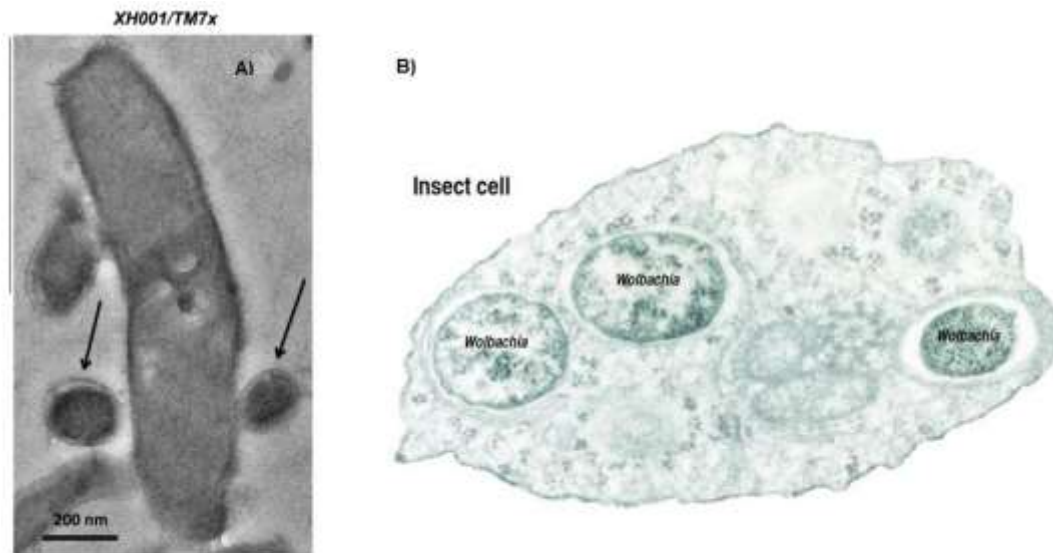


Figure 69 : A) Cellules de TMX7x fixées sur la membrane d'une *Actinomyces odontolyticus*, image obtenue par microscopie électronique en transmission [166] ; B) Cellule d'insecte infectée par *Wolbachia* (<http://babec.org/wolbachia-pcr/>)

b. Les interactions bénéfiques

Les interactions entre organismes peuvent également être de nature bénéfique pour les deux espèces concernées. Elles sont différenciées par le degré d'implication et de dépendance de chaque organisme dans l'interaction.

- On retrouve tout d'abord le pendant bénéfique de l'amensalisme qui est le **commensalisme**. Dans cette situation un des organismes tire profit de la relation mais cela n'a aucune incidence sur le second. Il peut s'agir simplement de l'apport d'un abri à un autre organisme ou d'un partage de nutriments. La présence de la flore intestinale humaine peut par exemple être considérée comme une relation commensale. Plus particulièrement on peut citer *Escherichia coli* qui a la particularité de pouvoir se développer en milieu aérobie et anaérobie. Elles vont donc consommer l'oxygène au niveau du bol alimentaire le rendant ainsi anaérobie pour des souches anaérobies strictes comme les *Bacteroides* [22].

- Les relations apportant un bénéfice réciproque aux deux organismes impliqués sont appelées **mutualisme**. Elles peuvent être de nature facultative dans ce cas on parle de **coopération**. Ce type de relation est très répandu, par exemple les bactéries cellulolytiques comme *Fibrobacter succinogenes*, qui vivent à l'intérieur du rumen des vaches permettent la dégradation de la cellulose rendant ainsi disponible les nutriments pour la vache [167]. En contrepartie elles profitent d'un abri tempéré et d'un approvisionnement régulier en nutriments. La bactérie *Syntrophus aciditrophicus* vit également en coopération avec des souches hydrogénotrophes comme l'archée *Methanospirillum hungatei*. La première bactérie est capable de réaliser la dégradation anaérobie d'acides gras saturés en absence d'accepteur terminal d'électrons, ce qui nécessite un milieu sous basse pression d'hydrogène. Ces conditions sont fournies par la deuxième bactérie (*M. hungatei*) [22,168].

- Lorsque le mutualisme entre deux organismes est obligatoire on parle alors de **symbiose**, les partenaires ne peuvent se développer qu'en présence de l'autre. Un exemple bien connu est la relation entre les rhizobiums, des α -protéobactéries présentes dans le sol avec les plantes appartenant à la famille des Fabacées. La bactérie se développe au niveau des racines de la plante et forme des nodules qui sont constitués de tissus racinaires et de rhizobium différenciés appelé bactéroïdes (Figure 70). Ces dernières sont capables de fixer l'azote atmosphérique et de le métaboliser en azote organique, le rendant ainsi disponible pour la plante. En échange la plante fournit des nutriments nécessaires au développement bactérien [169].

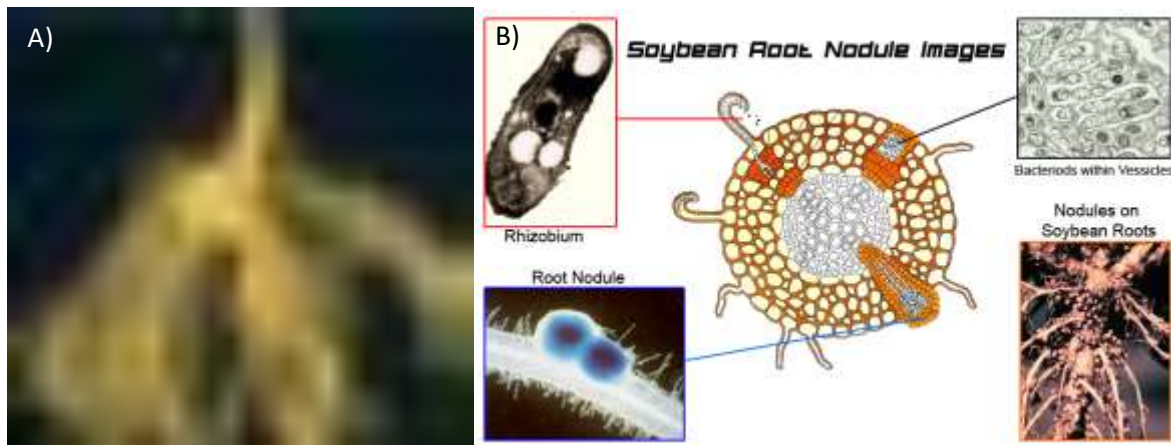


Figure 70 : A) Nodules de rhizobium sur des racines de Fabacées ([http://www.reed.edu/biology/Nitrogen/Nfix1\(legumes\).html](http://www.reed.edu/biology/Nitrogen/Nfix1(legumes).html)), B) représentation schématique d'un nodule de rhizobium sur les racines de Fabacées (<https://www.slideshare.net/snehaljikamade/rhizobium-65788703>).

Le lichen est bien évidemment un autre exemple de symbiose comme décrit dans l'ACTE I – Scène 1 de ce manuscrit. En effet, celui-ci résulte d'une association entre une algue ou une cyanobactérie apportant certains nutriments grâce à la photosynthèse avec un champignon qui fournit la protection du photobiotte ainsi que l'apport en nutriments et en eau.

De nombreuses preuves penchent également en faveur d'une origine symbiotique de certains organites cellulaires comme les mitochondries, responsables de la production d'énergie au sein de la cellule, ou les chloroplastes, responsables de la photosynthèse. Ces symbioses sont à l'origine de l'apparition des eucaryotes [170].

- Le dernier type d'interaction qui vient compléter ce tableau est le **neutralisme** où les organismes vivent dans le même environnement sans n'entretenir aucune relation.

Toutes ces relations, quelles qu'elles soient, impliquent la mise en place de nombreux échanges entre les organismes, dans un but d'attraction, de répulsion, de protection, de transmission d'informations ou bien de destruction.

2. Les échanges entre les personnages

a. Echange de nutriments

Peu importe le type de relation existant entre deux micro-organismes, l'échange le plus courant est l'échange de nutriments. Ce transfert peut être réalisé de façon pacifique généralement par la diffusion par l'un des organismes de substances dans le milieu qui seront récupérées par l'autre organisme pour être réutilisées. Dans le cas des relations symbiotiques, on peut assister à la formation de structures dédiées à ces échanges de nutriments. C'est notamment le cas dans le cadre de la symbiose entre les rhizobiums et les fabacées où la bactérie rejette de l'azote organique sous forme d'ammonium dans le milieu qui sera récupéré par les cellules de la plante. La plante quant à elle libère des substances telles que des sucres qui seront absorbés par la bactérie et consommés en tant que source de carbone. Dans ce cas particulier ce sont des nodules constituées de cellules végétales et de bactéries qui se sont développés sur la surface des racines des fabacées. Le même type d'échange est retrouvé entre les mycorhizes et de nombreuses plantes. Ce champignon aide la plante en lui fournissant de l'eau et des minéraux en échange de glucides. Ici les cellules fongiques et végétales s'entremêlent pour réaliser l'échange directement au niveau de la paroi de la racine de la plante (ectomycorhizes) mais les cellules fongiques peuvent également être à l'intérieur des cellules végétales (endomycorhizes) et former une structure appelée arbuscule où va se dérouler l'échange de nutriments (Figure 71).

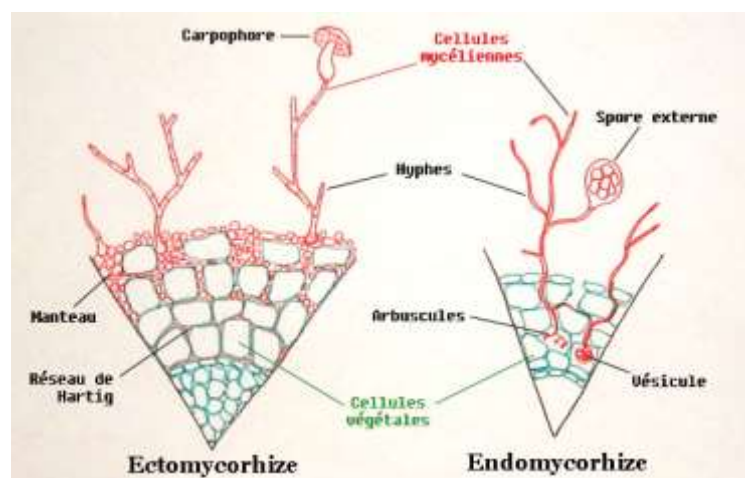


Figure 71 : Schéma représentant les endomycorhizes et les ectomycorhizes (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Mycorhize>)

Certains micro-organismes ont développé des techniques pour récupérer les nutriments directement dans les organismes producteurs en excréant par exemple des toxines qui vont lyser la paroi de l'organisme proie. C'est le cas par exemple de certains champignons qui développent un hyphes différencié appelé haustorium. Celui-ci va pénétrer entre les cellules de l'hôte, se fixer sur celles-ci et en absorber le contenu par l'intermédiaire de diverses enzymes protéolytiques (Figure 72) [171]. Ce type de structure est également présent au sein du thalle lichénique entre les hyphes du mycobiotte et les cellules algales.

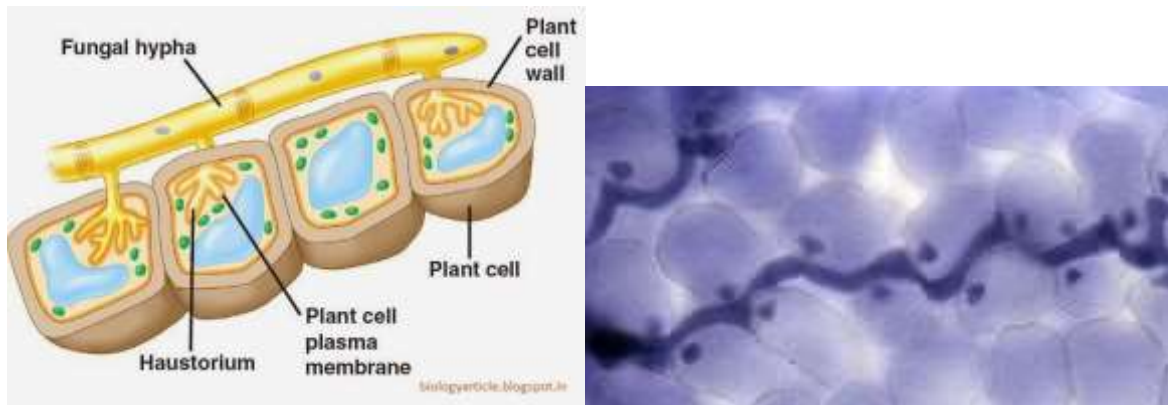


Figure 72 : A) Représentation schématique d'haustorium (<http://biologywriteup.blogspot.fr/2012/03/haustorium.html>), B) Filament mycélien de *Hyaloperonospora parasitica*, un des agents responsables du mildiou parasitant *Arabidopsis thaliana* et ses haustorium (tâches sombres) (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Haustorium>)

Enfin lors de la prédation, la consommation de nutriments provenant d'un autre organisme se fait par la destruction de celui-ci ou son ingestion. C'est notamment le cas avec *Micovibrio* précédemment décrit.

b. Transfert d'informations génétiques

Les nutriments ne sont pas les seuls échanges dans le monde des micro-organismes, on retrouve aussi couramment des transferts de matériel génétique. Ces procédés sont appelés transferts horizontaux de gènes par opposition aux transferts verticaux qui sont les transferts à la descendance directe. Il existe trois modes de transferts de gènes différents.

Lorsque de l'ADN nu est présent dans l'environnement suite à une lyse cellulaire ou à une excrétion active, il peut pénétrer à l'intérieur des bactéries, c'est ce qu'on appelle la **transformation** (Figure 73). L'ADN peut être consommé comme apport de nutriments (phosphore, carbone, azote) ou être intégré comme matériel génétique. Dans le cas d'espèces proches, l'ADN peut être utilisé dans un but de réparation de brins d'ADN lésés, sinon il sert pour l'acquisition de nouvelles compétences. Griffith a découvert ce mode de transfert en réalisant une étude sur des souris auxquelles il a injecté différentes souches de *Streptococcus pneumoniae*. Il s'est rendu compte qu'en leur injectant dans un premier temps des souches virulentes préalablement détruites par la chaleur et dans un deuxième temps des souches non virulentes, les souris mouraient et les souches non virulentes avaient acquis les gènes porteurs de la virulence [172]. Cette technique est aujourd'hui couramment utilisée en laboratoire pour la modification génétique de souches bactériennes. Elle nécessite toutefois que la bactérie soit dans un « état de compétence » qui peut être obtenu en laboratoire.

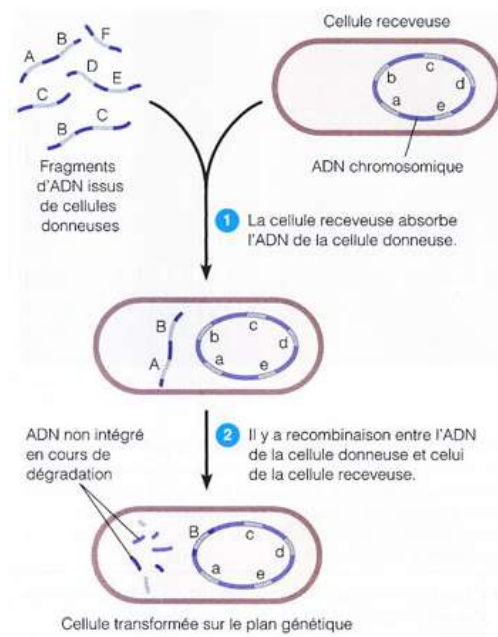


Figure 73 : Schéma du transfert de gènes par transformation (<http://pages.infinit.net/p1nchtr3/mecanismes.htm>)

Le second mode de transfert de gènes est la **conjugaison**, dans ce cas les bactéries doivent être en contact. Il y a émission d'un pilus de la bactérie donneuse qui possède un plasmide conjugatif vers la bactérie receveuse. Le pilus va ensuite se rétracter de façon à rapprocher les bactéries jusqu'à ce qu'elles entrent en contact. Un pore va alors se former à ce niveau et le plasmide de la bactérie donneuse va être répliqué dans la bactérie receveuse (Figure 74) [173]. De façon plus rare, l'ADN chromosomique peut également être transféré par ce mécanisme, cela a lieu lorsque le plasmide s'est intégré au chromosome, la bactérie est alors appelée HFR (Haute Fréquence de Recombinaison) [174]. Le transfert de plasmide par conjugaison peut avoir lieu entre bactéries d'espèces différentes voire même entre bactéries et levures.

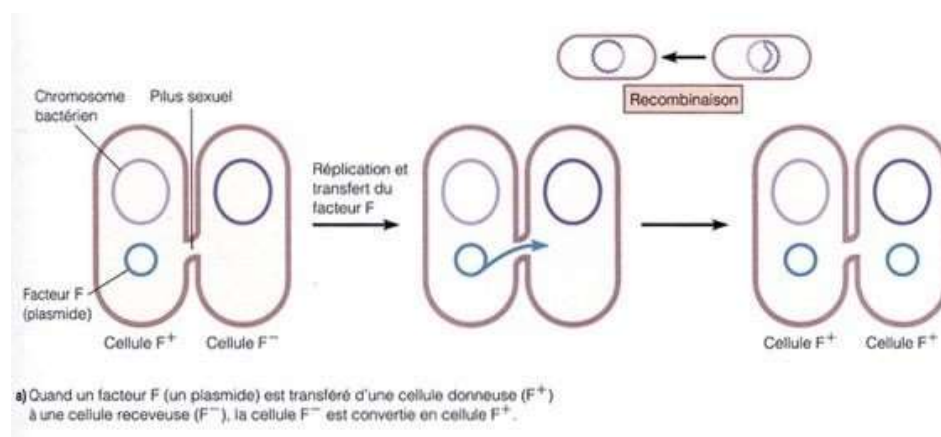


Figure 74 : Schéma de transfert de gènes par conjugaison (<http://www.ipboseret.eu/biologie/index.php/microbiologie/80-transformation-conjugaison-et-transduction>)

Le dernier mode de transfert de gènes a lieu par l'intermédiaire des bactériophages et est appelé la **transduction**. Ces micro-organismes sont des virus des bactéries, ils se fixent sur une bactérie et délivrent leur ADN viral à l'intérieur. Celui-ci est ensuite répliqué par la cellule hôte et induit la production de nouvelles capsules. L'ADN viral répliqué est ensuite encapsulé et libéré sous la forme de nouveaux phages lors de la lyse de la cellule. Pendant ce processus, l'ADN bactérien est dégradé et fragmenté. Au cours de l'encapsidation, il arrive que de l'ADN bactérien soit intégré à la place de l'ADN viral (1%). Ces phages porteurs de l'ADN bactérien vont de nouveau se fixer sur un organisme hôte et libèrent leur génome, sans la présence d'ADN viral ce nouvel hôte ne sera pas lysé et pourra exprimer le nouvel ADN acquis (Figure 75).

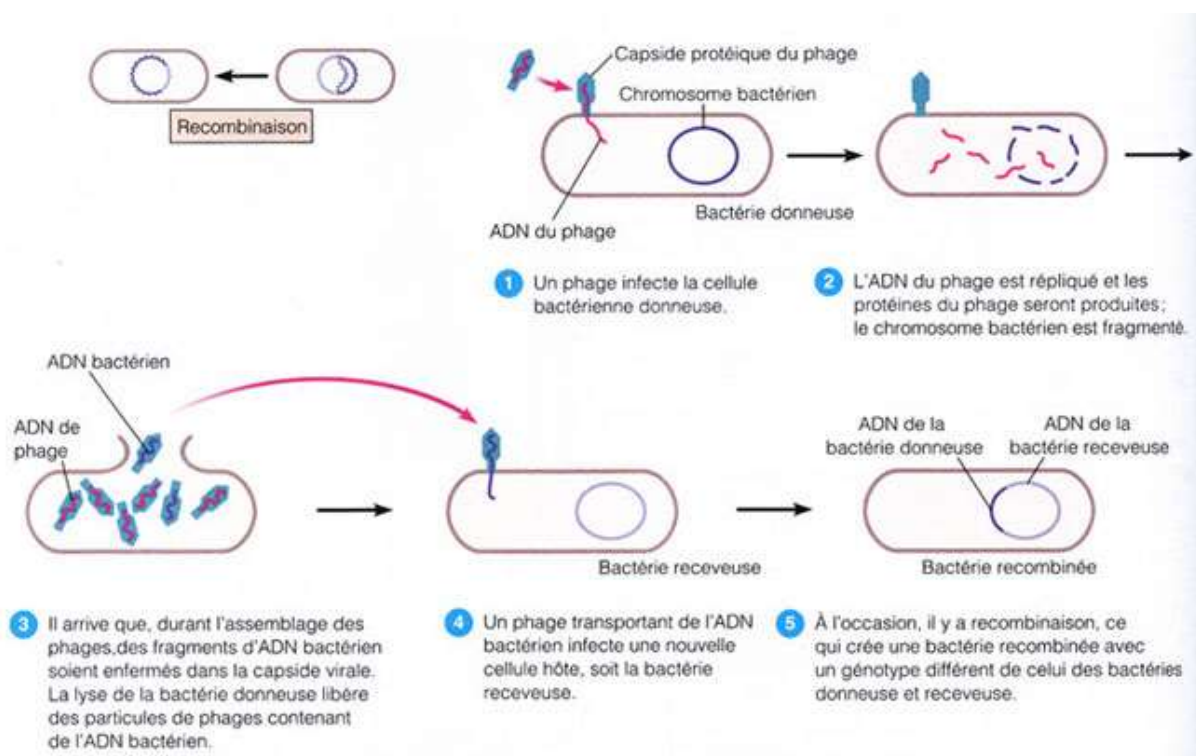


Figure 75 : Schéma de transfert de gènes par transduction (<http://pages.infinit.net/p1nchr3/mecanismes.htm>)

c. Communication chimique

Le contenu des échanges entre micro-organismes peut également relever de l'information et on parle alors de communication. Dans le règne animal les modes de communication sont très variés et visibles, il peut s'agir de signaux visuels, acoustiques, vibratoires, tactiles, chimiques voire électriques. Dans le monde des micro-organismes la méthode de communication la plus développée est la communication chimique. Par le biais de molécules chimiques, ils peuvent intoxiquer d'autres micro-organismes prêts à coloniser leur habitat ou bien les repousser, c'est l'**antibiose** et les composés produits sont des composés antibiotiques. Par exemple, au sein du thalle lichénique, la diversité bactérienne est importante et la régulation de la population bactérienne peut être effectuée par antibiose. La détection de substances chimiques peut également permettre la mise en place d'une coopération ou d'une symbiose en trouvant ainsi le partenaire associé, c'est le **chimiotactisme**. Dans le cas de la symbiose rhizobium-fabacées, la racine de la plante exsude des composés phénoliques pour attirer le

rhizobium, la bactérie reconnaît ces composés grâce à un facteur de transmission qui va ensuite déclencher l'expression de différents gènes. Un de ces gènes provoque la production de facteurs Nod, des lipo-chito-oligosaccharides (Figure 76) dont les différents substituants présents sur ces composés vont caractériser la spécificité du rhizobium pour un type de légumineuse [175].

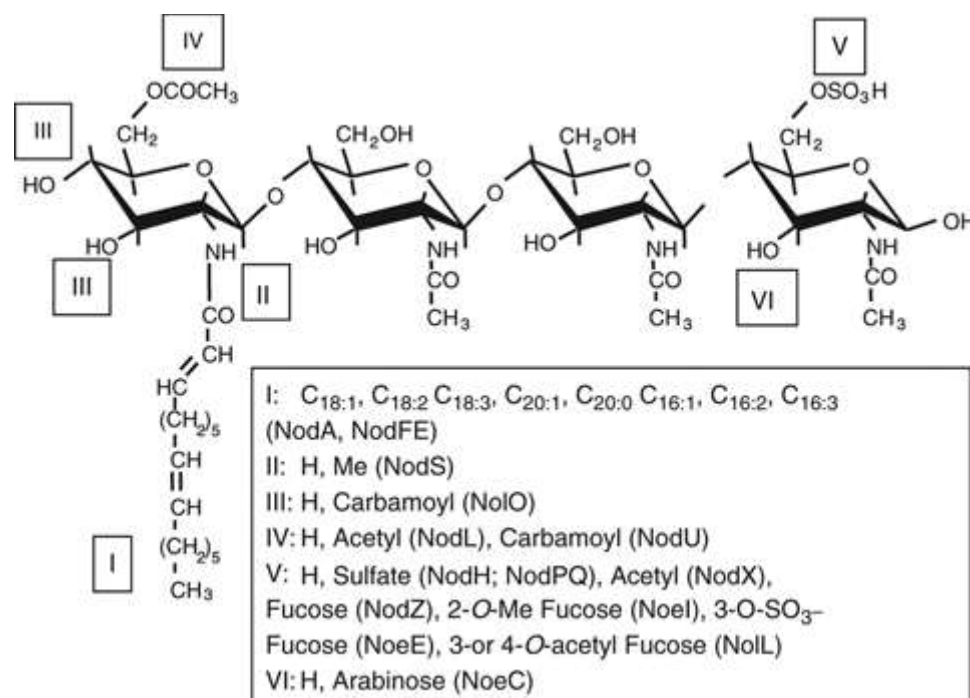


Figure 76 : Diversité structurale des facteurs Nod, constitués de 4 à 5 unités N-acetyl-glucosamine liées en β -1,4, les sites de substitution sont indiqués par I-VI et la nature des substituants est indiquée dans l'encadré.

Il y a quelques temps, il a été découvert que les bactéries étaient capables de mesurer la concentration de certaines petites molécules leur indiquant ainsi le nombre d'organismes présents dans leur environnement. C'est le « quorum-sensing ». Ce système a été découvert par le biais de la bactérie *Vibrio fischeri*, une bactérie bioluminescente vivant en symbiose avec le calamar *Euprymna scolopes*. Cette bioluminescence n'a lieu qu'en présence d'une forte densité de population bactérienne. Un composé extra-cellulaire auto-inducteur a été isolé et identifié comme étant responsable du déclenchement de la luminescence : une N-acylhomosérinelactone [176]. Cette substance a ensuite été identifiée chez plusieurs autres bactéries mettant ainsi en place le concept de quorum-sensing. Les bactéries d'un environnement sécrètent ces autoinducteurs. Une fois que la concentration dans le milieu a atteint un certain palier, ces molécules provoquent le déclenchement d'un comportement de l'ensemble de la colonie bactérienne. Dans le cas de *Vibrio fischeri* l'effet produit est la bioluminescence mais cela peut également être la mise en place d'un facteur de virulence ou d'une symbiose [177]. Par la suite de nombreux composés ont été identifiés comme des autoinducteurs ayant un rôle dans le quorum-sensing. En plus des dérivés N-acylhomosérinelactone (AHL), on retrouve des oligopeptides notamment produits par des bactéries Gram-positif [178], des γ -butyrolactones produits par des Streptomyces aussi appelés facteurs A, des quinolones cycliques, des esters d'acides gras et des dérivés furanoses appelés AI-2 (autoinducer-2) (Figure 77) [177,179].

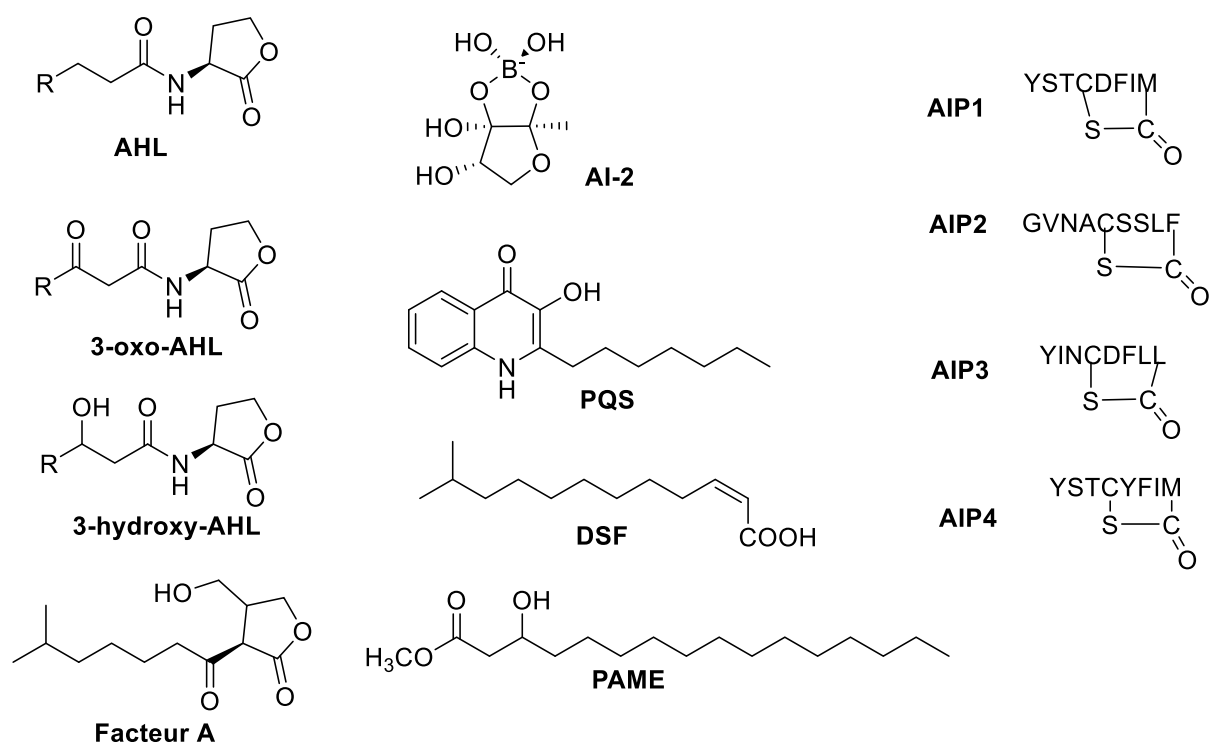


Figure 77 : Structures de composés ayant un rôle autoinducteur dans le quorum-sensing, AHL : N-acylhomosérine lactone, 3-oxo-AHL : 3-(oxoacyl)homosérine lactone, 3-hydroxy-AHL : 3-(hydroxyacyl)homosérine lactone, avec R : chaîne hydrocarbonée avec 1 à 15 carbones et une ou plusieurs insaturations ; Facteur A : 2-isocaproyl-3-hydroxy-méthyl-γ-butyrolactone ; AI-2 : forme ester furanosyl de l'acide borique ; PQS : « Pseudomonas Quinolone Signal », 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone ; DSF : « Diffusible Factor », acide méthyl-dodécénoïque ; PAME : Ester méthylique de l'acide hydroxypalmitique ; AIP1 à AIP4 : « AutoInducer Peptide » de *Staphylococcus aureus*. [22]

Plus récemment, il a été démontré que les dicétopipérazines jouent un rôle dans le quorum-sensing en interagissant avec les récepteurs LuxR qui sont associés aux dérivés AHL [139]. Lors de nos travaux, nous avons isolé de nombreuses dicétopipérazines qui pourraient avoir un rôle dans la communication entre les bactéries au sein du lichen.

Enfin ce type de communication n'est pas réservé qu'aux bactéries. De nombreuses études montrent un effet des autoinducteurs sur les eucaryotes, les organismes les plus étudiés dans ce cadre appartiennent au règne végétal. De nombreux effets des homosérines lactones sur les plantes sont répertoriés par Kan *et al.* [180]. Ces signaux induisent principalement la défense et l'immunité de la plante ainsi que le développement de certaines structures comme les nodules dans le cas de *Medicago truncatula*. Il a également été démontré que lors des co-infections à *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa*, une régulation était effectuée entre ces deux organismes témoignant d'un effet de communication entre la bactérie et la levure. La production d'une homosérine lactone (3-oxo C12 HSL) par *P. aeruginosa* inhibe la transformation de *C. albicans* de levure à champignon filamenteux, diminuant ainsi sa virulence. La levure a elle aussi un système de quorum-sensing régulé par le farnésol et le tyrosol. Le farnésol agit également sur la bactérie en inhibant la production de pyocyanine (régulée par la PQS) et donc sa virulence (Figure 78) [181]. Ces informations montrent que la communication chimique entre bactéries et champignons et bactéries et plantes est possible. Par conséquent, elle doit être présente au sein du lichen.

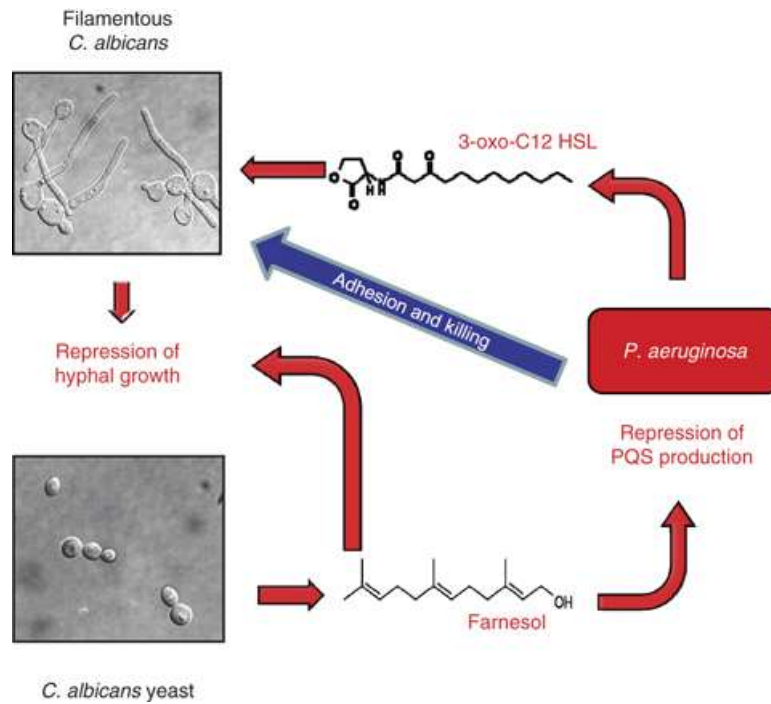


Figure 78 : Représentation schématique de la régulation « interkingdom » entre *P. aeruginosa* et *C. albicans*. [181]

Tous ces composés chimiques excrétés dans le milieu au sein de micro-écosystèmes complexes, régulant les interactions entre les différents organismes, sont absorbés par d'autres espèces présentes. Pour utiliser ces composés comme ressources ou les éliminer en cas de toxicité les organismes sont amenés à les modifier chimiquement.

B. Un mode de dialogue particulier : la biotransformation bactérienne

1. Qu'est-ce que la biotransformation ?

La biotransformation ou bioconversion enzymatique et microbienne est le processus par lequel des substances sont transformées en une autre par des voies biologiques. Elle peut être réalisée par des enzymes purifiées libres ou fixées, ou par des cellules entières elles aussi libres ou fixées. Cette méthode est utilisée par l'homme depuis la nuit des temps, notamment par l'utilisation de la fermentation lactique et des sucres. La découverte de la réaction de 11 α -hydroxylation de la progestérone en 11 α -hydroxyprogestérone par *Rhizopus nigricans* (Figure 79) a notamment permis de grandes avancées dans la synthèse des stéroïdes mais a également accru le nombre de travaux sur la biotransformation.

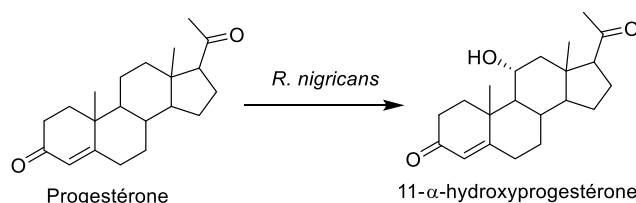


Figure 79 : Biotransformation de la progestérone en 11- α -hydroxyprogestérone par *Rhizopus nigricans* [182]

La biotransformation présente de nombreux intérêts face à la synthèse classique comme le fait qu'elle se déroule dans des conditions douces de pH (5-8) et de température (20-40°C), qu'elle est efficace sur le plan écologique et économique et surtout que les réactions enzymatiques sont généralement régiosélectives et énantiosélectives. Aujourd'hui cette technique est utilisée comme étape de synthèse pour obtenir des composés à l'échelle industrielle à moindre coût, pour augmenter la chimiodiversité ou encore pour la transformation de déchets industriels en ressources énergétiques.

2. Les différents types de biotransformation

a. Les réactions enzymatiques mises en jeu

La biotransformation repose sur les différentes réactions enzymatiques que les micro-organismes sont capables de réaliser. Les principales enzymes sont répertoriées dans le tableau 33 ci-dessous suivant le classement EC (Enzyme Commission number).

Tableau 33 : Différentes enzymes et leur réaction, ^a : réaction réversible, ^b : réaction réversible en retirant l'eau du milieu.

Type	Enzyme	Réaction
Lyases	Aldolase ^a	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{OH}}{\underset{*}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}$
	Hydroxynitrile lyase ^a	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}' + \text{HCN} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{HO}}{\underset{*}{\text{C}}}(\text{CN})-\text{R}'$
	Décarboxylase	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{C}(\text{OH})=\text{O} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{H}$
	Nitrile hydratase	$\text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{\text{CN}}{\text{C}}} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{NH}_2$
Transférases	Aminotransférase ^a Transaminase	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}' + \text{R}''-\overset{\text{NH}_2}{\underset{*}{\text{C}}}-\text{R}''' \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{NH}_2}{\underset{*}{\text{C}}}-\text{R}' + \text{R}''-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}'''$
	Méthyltransférase	$\text{R}-\overset{\text{H}}{\underset{*}{\text{C}}}-\text{R}' + \text{S-adénosylméthionine} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{*}{\text{C}}}-\text{R}'$
	Acyltransférase	$\text{R}-\text{OH} \longrightarrow \text{R}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}'$
	Glycosyltransférase	$\text{R}-\text{OH} \longrightarrow \text{R}-\text{O-glucose}$
	Phosphotransférase Kinase	$\text{R}-\text{OH} \longrightarrow \text{R}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{P}(\text{OH})_2$
	Sulfotransférase	$\text{R}-\text{OH} \longrightarrow \text{R}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{S}(\text{O})_2\text{O}^-$
Hydrolases	Aminoacylase ^a	$\text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{*}{\text{C}}}(\text{NH})-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}'' + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{*}{\text{C}}}-\text{NH}_2 + \text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}''$
	Lipase ^b	$\text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{*}{\text{C}}}(\text{O})-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}'' + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{*}{\text{C}}}-\text{OH} + \text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{R}''$
	Amidase	$\text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{*}{\text{C}}}(\text{O})-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{R}'}{\underset{*}{\text{C}}}(\text{O})-\text{OH}$

	Lactamase	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{R} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$
	Carbamoylase	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$
	Epoxyde hydrolase	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}' + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} + \text{R}'-\text{OH}$
	Hydantoinase Dihydropyrimidinase	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$
	Hydrolase	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{S}-\text{R}' + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{R}'-\text{OH}$
	Lactonase	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}' + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{R}'-\text{OH}$
	Nitrilase	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{CN} + 2 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$
	Phosphatase	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{OH} + \text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$
Isomérase	Isomérase	$\text{R}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CHO} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-$
	Racémase	$\text{R}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2 \rightleftharpoons \text{R}'-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$
Oxydases	Baeyer-Villiger monooxygénase	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}' \longrightarrow \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}'$

	Cytochrome P450 ^a	
	Aryl dioxygénase	
Réductases	Réductase ^a	
	Alcool déshydrogénase ^a	

b. Biotransformation des métabolites primaires

La méthode de biotransformation la plus utilisée est probablement l'hydrolyse enzymatique de l'amidon de blé ou de maïs (Figure 80-A). Elle mène à l'obtention de différents produits sucrants tels que le saccharose ou le fructose. Ce dernier peut également être obtenu grâce à l'utilisation d'une autre enzyme qui est une xylose-isomérase permettant d'isomériser le glucose en fructose (Figure 80-B) [183]. Ces sucres obtenus par hydrolyse de l'amidon peuvent également subir une fermentation par le biais de levures menant ainsi à la production de bioéthanol. Celui-ci est utilisé comme carburant et est considéré comme une énergie renouvelable (Figure 80-C) [184].

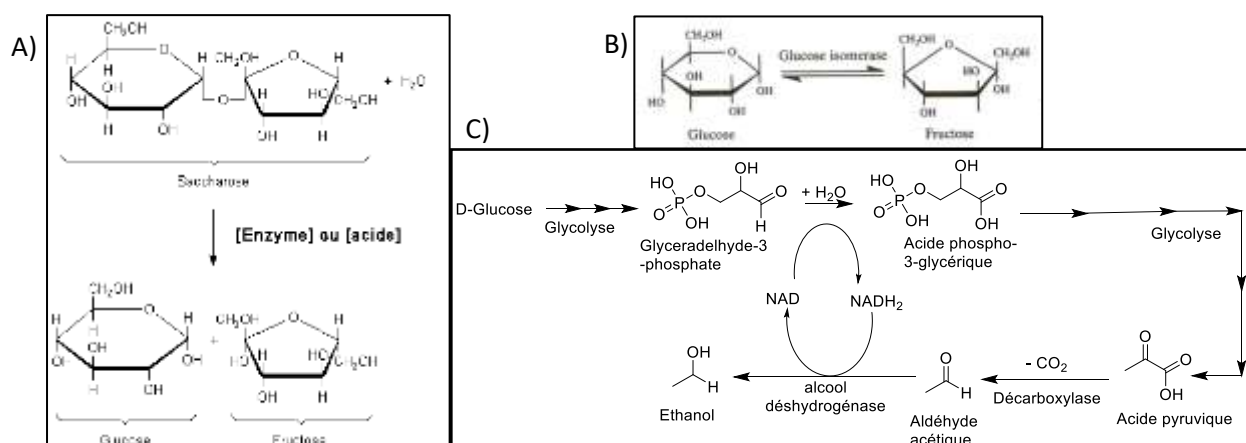


Figure 80 : Réactions enzymatiques impliquées dans la production des produits sucrés (glucose, fructose,...) et du bioéthanol. A) Hydrolyse enzymatique du sucrose issu de l'amidon en glucose et fructose, B) Isomérisation enzymatique du glucose en fructose, C) Fermentation alcoolique du glucose conduisant à la production d'éthanol.

On peut également citer en exemple la biotransformation de glucose et de fructose par la bactérie *Zymomonas mobilis* qui fournit du sorbitol et de l'acide gluconique (Figure 81) [185].

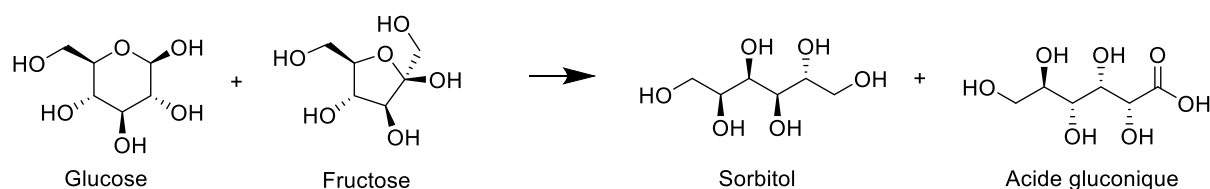


Figure 81 : Biotransformation du glucose et du fructose en sorbitol et acide gluconique par la bactérie *Zymomonas mobilis*

La biotransformation des acides gras est moins utilisée à l'échelle industrielle mais elle est néanmoins très étudiée pour l'obtention de nouveaux lipides bioactifs. Par exemple, lors de l'étude de bactéries saprophytiques isolées à partir d'un compost en formation, 12 % des souches isolées ont montré une capacité à bioconvertir l'acide oléique en acide 10-cétostéarique ou en acide 10-hydrostéarique. Les souches ont été identifiées comme étant des souches de *Sphingobacterium thalpophilum* et d'*Acinetobacter spp.* Plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont également montré une capacité à bioconvertir l'acide ricinoléique en acide 7,10,12-trihydroxy-8(E)-octadécénoïque. Enfin l'acide linoléique a été bioconverti par des souches d'*Enterobacter agglomerans* en dérivés hexadécadiénoïque et tétradécadiénoïque (Figure 82) [186].

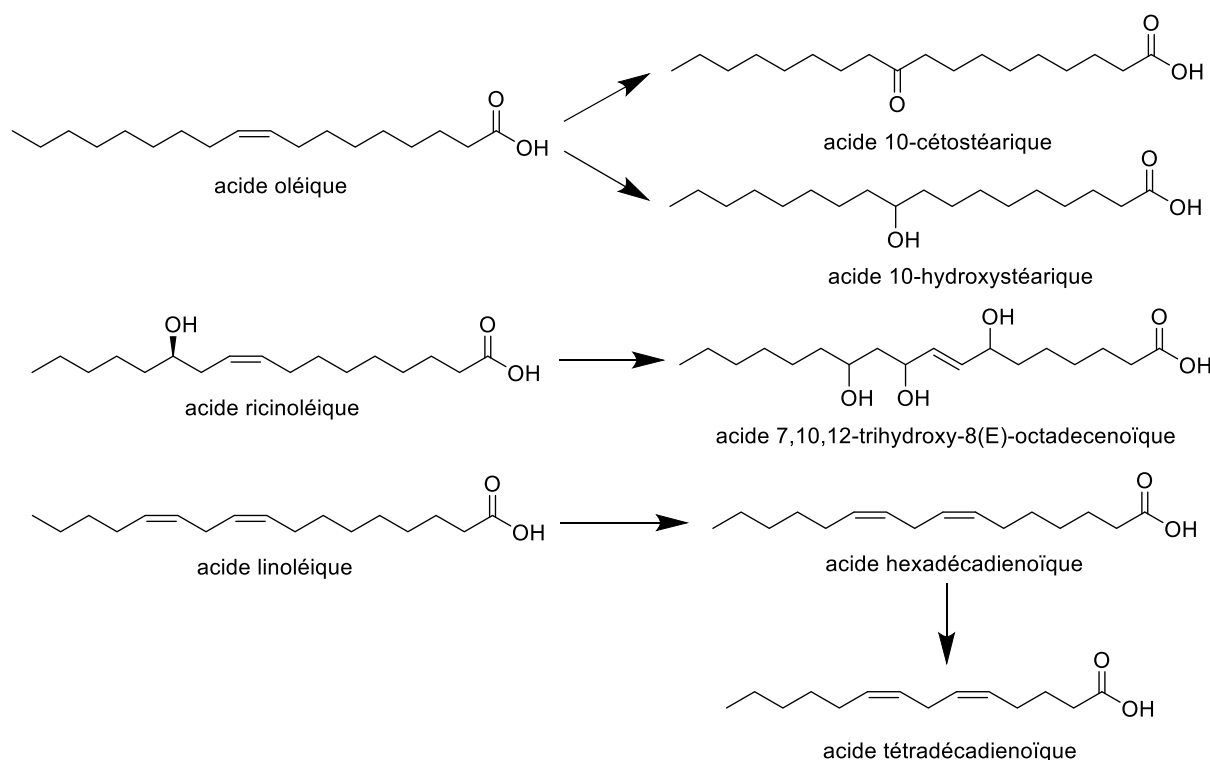


Figure 82 : Biotransformation d'acides gras essentiels par des souches bactériennes isolées à partir de compost.

La bactérie *Clavibacter sp.* reclassifiée comme étant *Bacillus megaterium* a elle aussi démontré ses capacités de biotransformation en transformant l'acide linoléique en acide 12,13,17-trihydroxy-9(Z)-octadécénoïque (12,13,17-THOA) et 12,13,16-THOA. Elle est également capable de convertir les acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) en acides 15,18-dihydroxy-14,17-époxy-5(Z),8(Z),11(Z)-eicosatriénoïque et 17,20-dihydroxy-16,19-époxy-4(Z),7(Z),10(Z),13(Z)-docosatétrénoïque (Figure 83) [187].

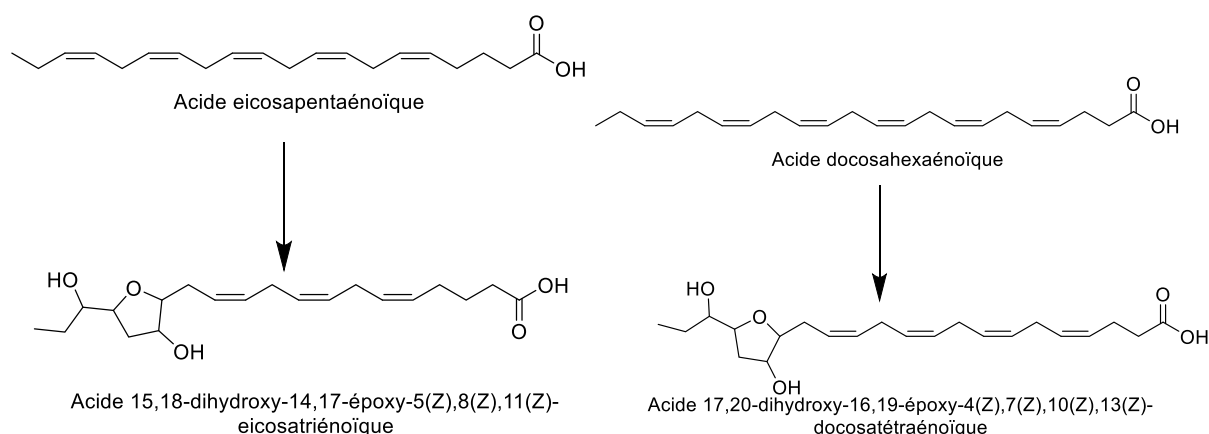


Figure 83 : Conversion de l'EPA et de la DHA par la bactérie *Clavibacter sp*

La biotransformation est une méthode très utilisée pour la production d'acides aminés. Le glutamate est par exemple obtenu par fermentation glutamique de la bactérie *Corynebacterium glutamicum* dans un milieu enrichi en sucres et en sels d'ammonium [188]. La lysine est obtenue par fermentation de cette même souche bactérienne par la voie du diaminopimelate ou de l' α -aminoadipate [189]. L'acide aspartique est lui produit lors de la fermentation de diverses souches bactériennes dont *Pseudomonas sp.* grâce à l'action d'une aspartate ammonium-lyase qui transforme le fumarate en acide aspartique en présence d'ammoniaque (Figure 84-B) [190]. De nombreux autres acides aminés sont obtenus par fermentation comme la leucine qui est produite par des souches de *Brevibacterium* et de *Corynebacterium*, l'isoleucine qui est produite par *Corynebacterium glutamicum* et la phénylalanine produite par une souche recombinante d'*Escherichia coli*. Le tryptophane et la valine sont également produits de cette manière.

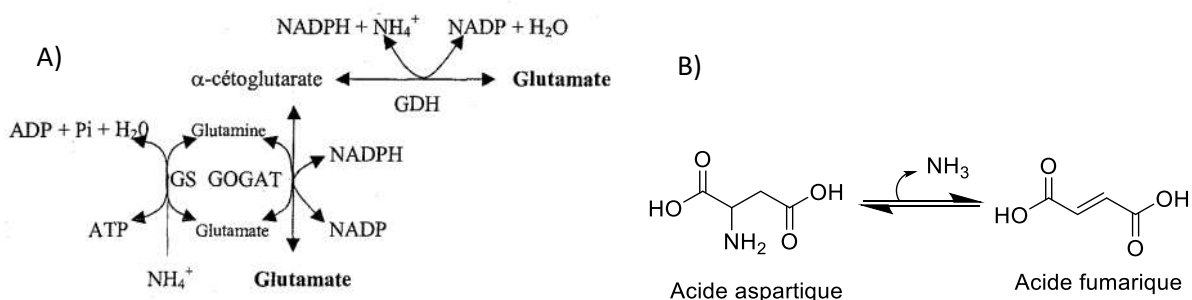


Figure 84 : A) Voie de biosynthèse du glutamate par la glutamate déhydrogénase de *Corynebacterium glutamicum*, GDH : Glutamate déhydrogénase, GS : Glutamine Synthétase, GOGAT : Glutamine amide α -cétooglutarate aminotransférase [188]. B) Transformation de l'acide aspartique par l'aspartate ammonium-lyase.

c. Biotransformation des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont généralement responsables de diverses activités biologiques et pour cela ils sont très étudiés. Cependant lorsqu'un composé naturel bioactif est identifié et qu'il est amené à être produit à grande échelle, le problème de son obtention en grande quantité se pose. La synthèse n'est pas toujours réalisable ou amène à des coûts élevés et de faibles rendements. L'utilisation de micro-organismes pour réaliser cette synthèse totale ou partielle est une solution pour pallier les

inconvenients de la synthèse chimique. Aussi, aujourd'hui, de nombreux composés d'origine naturelle sont synthétisés par le biais de micro-organismes ou d'enzymes.

Comme décrit précédemment, la biotransformation des **stéroïdes** est très étudiée et plusieurs composés utilisés dans le domaine pharmaceutique sont obtenus de cette manière (Figure 85) [44].

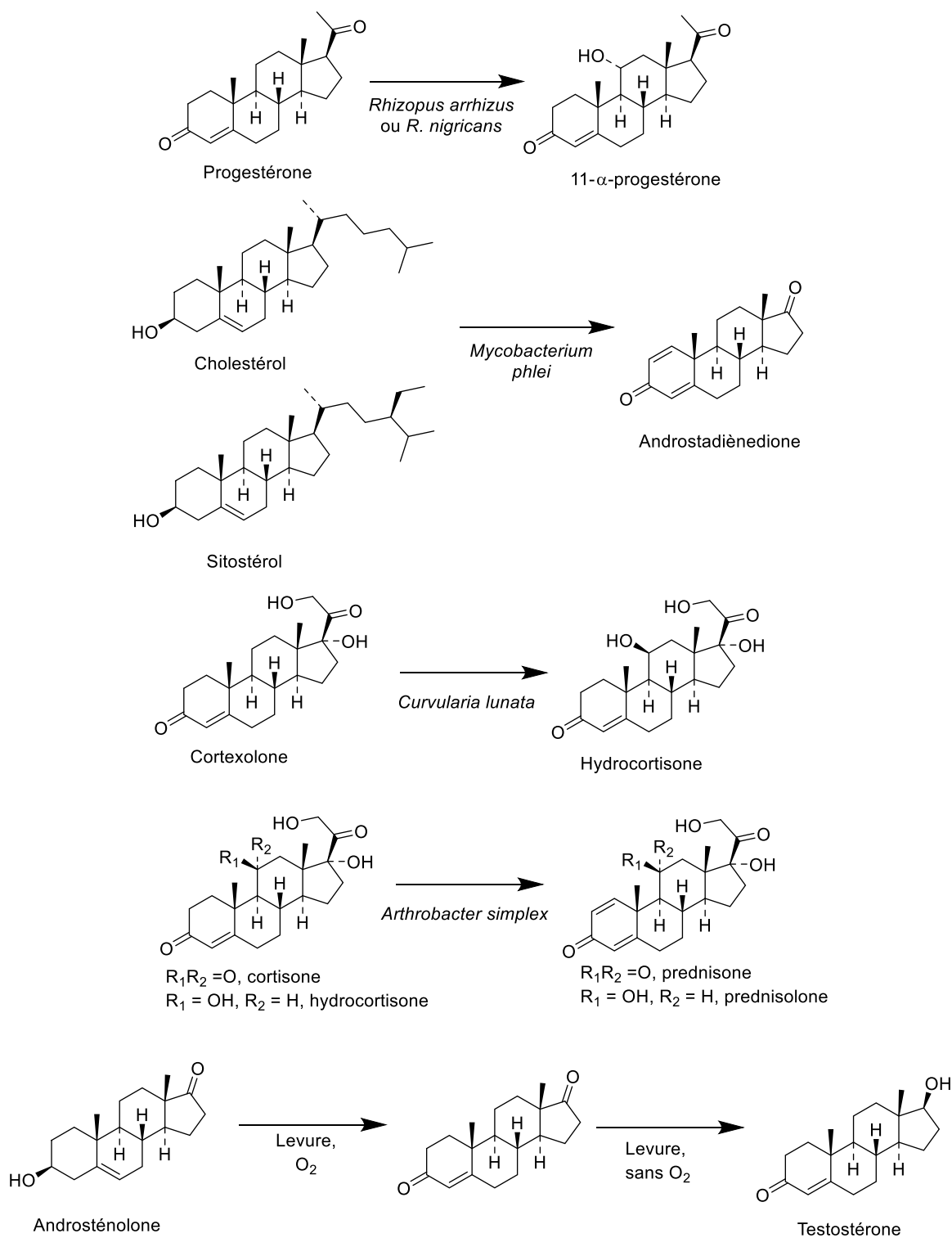


Figure 85 : Stéroïdes obtenus par biotransformation

La **rifamycine B** est un composé macrocyclique obtenu par fermentation d'*Ammycolatopsis mediterranei*, ce composé n'a aucune activité biologique mais après une étape de biotransformation la rifamycine B est transformée en rifamycine SV qui possède une forte activité antibiotique.

L'**hyoscyamine** et la **scopolamine** sont des alcaloïdes tropaniques avec des activités anticholinergiques qui sont isolés à partir de plantes de la famille des Solanacées telles que la Belladone, la Jusquiame ou la Datura. La scopolamine a plus d'intérêt en thérapeutique que l'hyoscyamine, principalement comme antispasmodique, cependant elle est produite en plus petite quantité par les plantes. Aussi des méthodes d'obtention de la scopolamine à partir de l'hyoscyamine ont été étudiées notamment par le biais de micro-organismes. L'enzyme responsable de cette conversion l'hyoscyamine 6 β -hydroxylase a, par exemple, été exprimée par une souche recombinante d'*Escherichia coli*, qui devient ainsi capable de transformer l'hyoscyamine en scopolamine (Figure 86) [191].

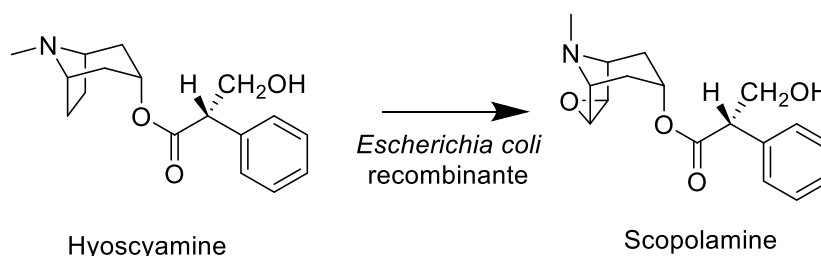


Figure 86 : Biotransformation de l'hyoscyamine en scopolamine par une souche d'E.coli recombinante

Le **cinnamaldéhyde** est un des principaux constituants de l'écorce de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*, famille des Lauracées) et il est utilisé principalement comme agent parfumant ou comme arôme. Les écorces sont récoltées encore humide pour faciliter le traitement, ce qui favorise certains procédés de fermentation par les micro-organismes endophytes. Ainsi, l'écorce fraîche de cannelle contient majoritairement de l'acétate de cinnamyle tandis que l'écorce en fin de processus de traitement contient majoritairement du cinnamaldéhyde. Cette évolution laisse supposer une conversion de l'acétate en aldéhyde par la fermentation [44].

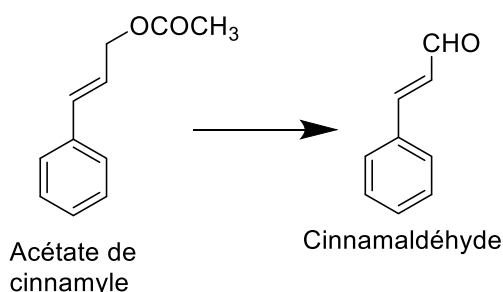


Figure 87 : Biotransformation de l'acétate de cinnamyle en cinnamaldéhyde lors du procédé de traitement de l'écorce de cannelle

L'**éphédrine** est un alcaloïde dérivé de la phénylalanine isolé à partir de diverses plantes appartenant à l'espèce *Ephedra*. Ce composé est utilisé notamment pour le traitement des congestions nasales ou comme bronchodilatateur. Sa production industrielle est globalement effectuée par synthèse. Plusieurs étapes de fermentation sont utilisées pour obtenir l'éphédrine de façon énantiosélective à partir du benzaldéhyde par l'intermédiaire de levures telles que *Saccharomyces* sp (Figure 88) [44].

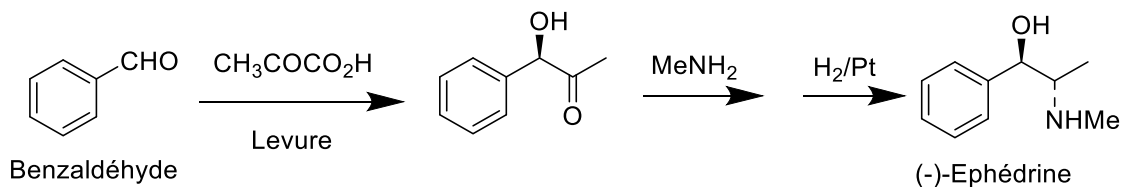


Figure 88 : Obtention de la (-)-éphédrine par biotransformation du benzaldéhyde par une souche de levure

Ce survol de certaines utilisations de méthodes de biotransformation pour l'obtention de composés naturels bioactifs montre bien l'intérêt de cette technique dans le domaine des substances naturelles. Dans un premier temps cela permet un accès simplifié, moins coûteux et parfois plus sélectif (énantiosélectivité, régiosélectivité...) à des composés utiles et difficilement accessibles. Dans un deuxième temps la biotransformation est un outil d'intérêt pour augmenter la diversité chimique.

C. Les personnages mis en scène

Dans ces travaux, nous avons choisi d'étudier les capacités de biotransformation de certaines souches bactériennes associées aux lichens envers des composés lichéniques connus. L'étude des échanges chimiques entre les différents partenaires du réseau symbiotique lichénique apporte des informations quant à la nature des relations existant entre les différents partenaires. Pour cela, nous avons sélectionné trois souches bactériennes représentatives des trois phyla bactériens les plus souvent retrouvés associés aux lichens. L' α -protéobactérie choisie est une souche appartenant à l'ordre des Rhizobiales, identifiée comme étant *Mycoplana ramosa* ou *Chelativorans intermedius*, la Firmicutes est une souche de *Bacillus weihenstephanensis* et l'Actinobactérie est une souche de *Nocardia* possédant 100 % d'identité avec les espèces *N. soli*, *N. salmonicida* et *N. cummidelens* par analyse de l'ARNr 16S.

1. Biotransformation chez les α -protéobactéries

a. Présentation générale

Le phylum des Protéobactéries est divisé en cinq classes : α , β , γ , δ et ϵ . Il rassemble un très grand nombre d'espèces bactériennes gram-négatif et comprend notamment les bactéries pourpres non sulfureuses. Ces dernières sont capables de réaliser la photosynthèse anoxygénique (c'est-à-dire qu'elles ne produisent pas d'oxygène) à partir de sulfures, d'hydrogène ou de fer par exemple. Ici nous nous sommes intéressés aux α -protéobactéries. La plupart de ces bactéries sont mobiles et ce groupe rassemble de nombreuses bactéries impliquées dans des symbioses avec des eucaryotes comme *Rhizobium* ou *Agrobacterium* [22].

Dans le domaine de la biotransformation il y a surtout une espèce de ce groupe qui a été très étudiée c'est *Glucunobacter oxydans*. L'intérêt de cette bactérie est principalement lié à sa capacité à partiellement oxyder les polyols grâce à diverses enzymes de la famille des déhydrogénases. Cette bactérie peut également produire des bio-polymères et possède des enzymes capables de transglycosylation [192].

Elle est utilisée par exemple pour la conversion du D-glucose en D-gluconate, ou encore lors du procédé de synthèse de la vitamine C à partir du glucose. *G. oxydans* est alors utilisée lors d'une étape pour transformer le D-sorbitol en L-sorbose (Figure 89) [192].

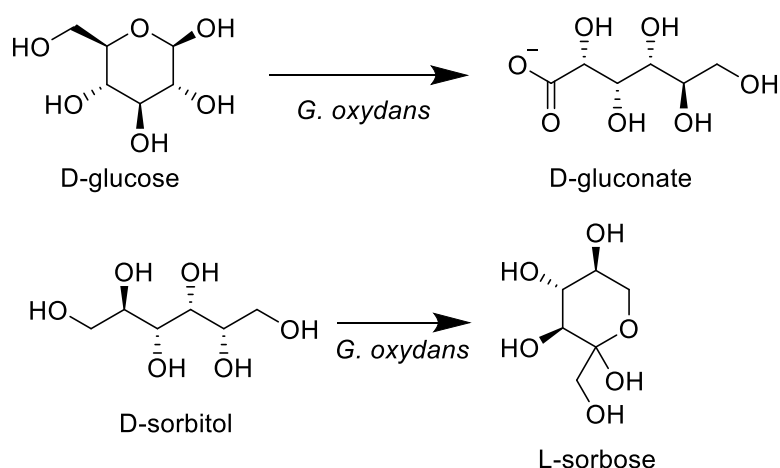


Figure 89 : Biotransformation de sucres par *Glucunobacter oxydans* : D-glucose en D-gluconate et D-sorbitol en L-sorbose

G. oxydans a également montré sa capacité à produire des polymères tels que la cellulose, les lévanes qui sont des polymères de fructose ou les dextranes qui sont des polymères de glucose (Figure 90) [192].

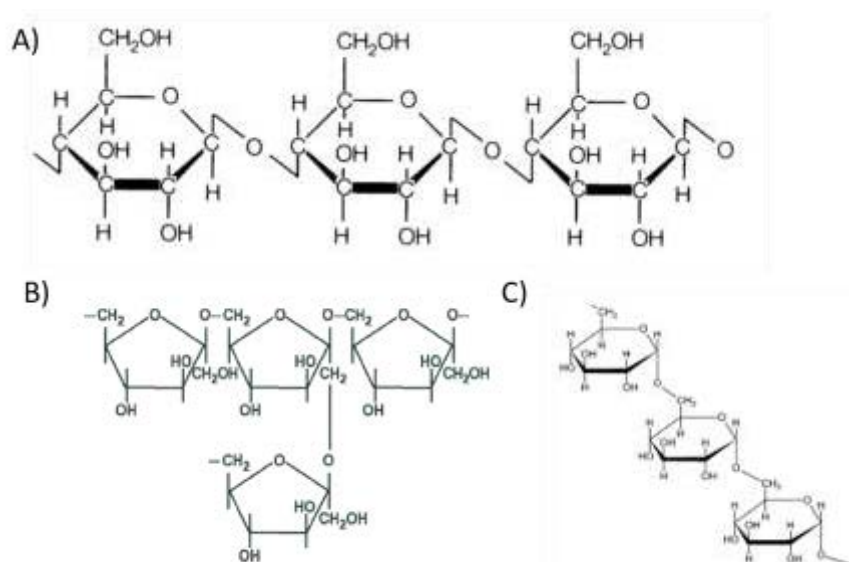


Figure 90 : Polymères produits par *G. oxydans* : A) Cellulose, B) Lévanes, C) Dextranes

D'autres bactéries appartenant aux α -protéobactéries sont très étudiées pour leur capacité de biotransformation comme *Zymomonas mobilis*. Comme précédemment décrit, cette dernière est capable de bioconvertir le glucose et le fructose en acide gluconique et sorbitol. Cette bactérie est également capable de produire de l'éthanol à partir de différents hydrolysats (maïs, levure ou blé) [193].

Agrobacterium tumefaciens est également étudiée pour ses enzymes capables d'oxyder des composés phénoliques [194] et *Caulobacter crescentus* pour son époxyde hydrolase réalisant l'ouverture des époxydes de façon énantiosélective [195].

b. Biotransformation chez les genres *Chelativorans* et *Mycoplana*

Les seules études sur le métabolisme des bactéries appartenant au genre *Chelativorans* décrivent les enzymes monooxygénase (FMNH₂)-dépendante de l'EDTA (EmoA) (reduced flavin mononucleotide) et l'oxidoréductase NADH:FMN (EmoB). Elles permettent l'oxydation de l'EDTA (éthylènediaminetétraacétate) en éthylènediaminediacétate (EDDA) qui est lui-même oxydé en éthylènediamine (ED) par l'EDDA oxydase (IdaA) (Figure 91) [196].

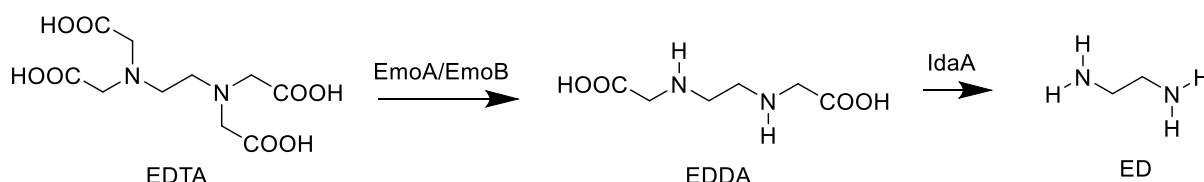


Figure 91 : Dégradation de l'EDTA en éthylène diamine par les oxydases EmoA, EmoB et IdaA de *Chelativorans spp*

Les études sur les bactéries du genre *Mycoplana* ont mis en évidence une enzyme appelée biotiny-CoA synthétase impliquée dans la dégradation de la biotine (Figure 92) [197,198]. La seconde enzyme étudiée chez *Mycoplana sp* est l'acétylpolyamine amidohydrolase (APAH) qui catalyse la désacétylation de diverses polyamines acétylées comme la *N*-acétylputrescine ou la *N*-acétylcadavérine (Figure 93) [199,200].

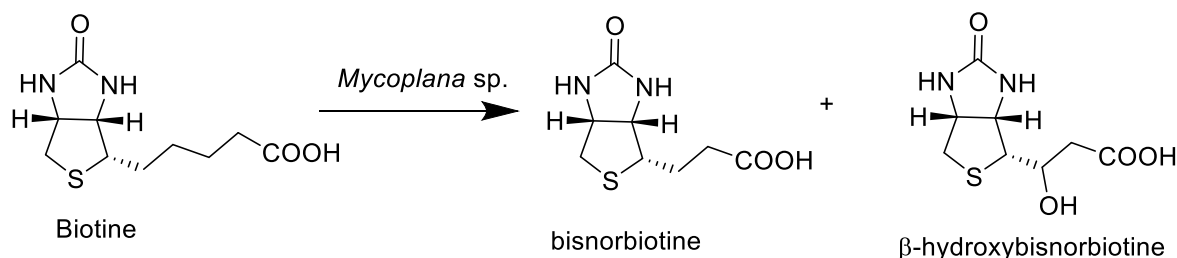


Figure 92 : Dégradation de la biotine par *Mycoplana sp.*

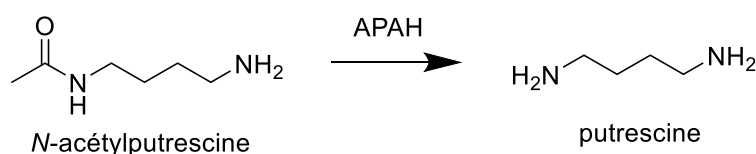


Figure 93 : Désacétylation de la *N*-acétylputrescine par l'acétylpolyamine amidohydrolase de *Mycoplana sp.*

2. Biotransformation chez les Firmicutes

a. Présentation générale

Le phylum des Firmicutes regroupe des bactéries à Gram-positif avec un faible taux en G+C (< 50 % de GC dans l'ADN) sauf pour quelques exceptions. Ils ont la particularité de pouvoir produire des spores thermorésistantes. Ce phylum rassemble de nombreuses bactéries pathogènes par la production de toxines virulentes c'est notamment le cas pour *Clostridium botulinum* et *Bacillus anthracis*.

Le genre *Lactobacillus* est probablement l'un des genres bactériens les plus connus parmi les Firmicutes. Ceci est principalement lié à son utilisation dans le domaine alimentaire mais également pour sa forte présence au sein du microbiote intestinal. Ces bactéries sont généralement anaérobies et sont capables de réaliser la fermentation lactique qui consiste à transformer le glucose en acide lactique (Figure 94). C'est cette étape de conversion qui est recherchée en industrie alimentaire, elle permet par exemple d'obtenir du yaourt à partir du lait. Elle intervient également dans la production des fromages, de la choucroute ou du levain naturel [201].

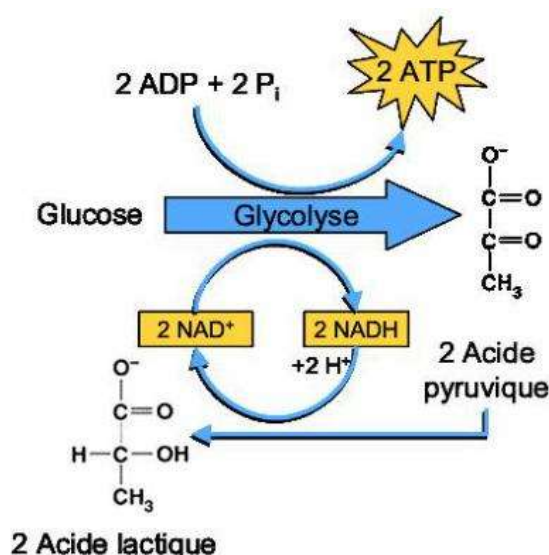


Figure 94 : Equation de la fermentation lactique

Ce genre bactérien est également étudié en recherche pour ses capacités de biotransformation. On peut par exemple citer la transformation des ginsénosides, des isoflavones et d'autres composés phénoliques ainsi que la conversion du glutamate de sodium en GABA (acide γ -aminobutyrique) ou celle de l'oleuropeine en hydroxytyrosol [202].

Un autre genre de Firmicutes très étudié pour ses capacités de biotransformation est le genre *Clostridium* dont la particularité est de pouvoir dégrader la cellulose en glucose, propriété qui est notamment utilisée pour la production de bioéthanol à partir de biomasses. Cette transformation est possible grâce à la présence de cellulosomes chez la plupart des Clostridia. Cette structure est constituée d'un ensemble d'enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose [203]. *Clostridium*

acetobutylicum peut également produire du butanol à partir de molasses ou de graines de céréales (Figure 95) [204].

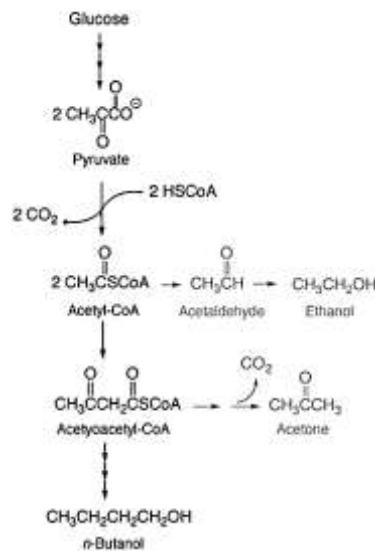
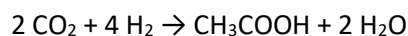
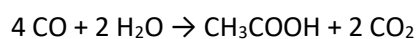
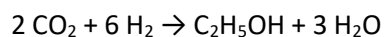
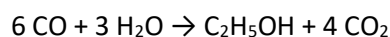


Figure 95 : Production de butanol par fermentation de *Clostridium acetobutylicum* [205]

Une autre méthode pour l'obtention de biofuels tels que le bioéthanol ou le butanol est l'utilisation de gaz de synthèse ou syngas, constitués principalement de monoxyde de carbone et de dihydrogène, et qui sont obtenus par gazéification de biomasse lignocellulosique. Ces syngas sont ensuite fermentés à l'aide de différentes souches bactériennes telles que des *Clostridium* (*Clostridium ljungdahlii*, *Clostridium autoethanogenum* ou *Clostridium carboxidivorans*) fournissant de l'éthanol et de l'acide acétique par la voie de l'acétyl-Coenzyme A [206,207].

Equations impliquées dans la fermentation du syngas [206]:



b. Utilisation du genre *Bacillus* en biotransformation

La souche appartenant au phylum des Firmicutes que nous avons sélectionnée est une souche de *Bacillus*, ce genre bactérien est également l'un des plus étudié chez les Firmicutes. Comme décrit précédemment, *Bacillus megaterium* est capable de transformer l'acide linoléique en un acide gras trihydroxylé insaturé et l'EPA et le DHA en dérivés époxydés [187].

Une cellulase a également été identifiée au sein d'une souche de *Bacillus subtilis* DR impliquant ainsi une capacité de dégradation de la cellulose [203]. Ces bactéries sont utilisées pour leur β -glucosidase dans la production de produits à base de soja pour la déglycosylation des isoflavones (Figure 96) [208].

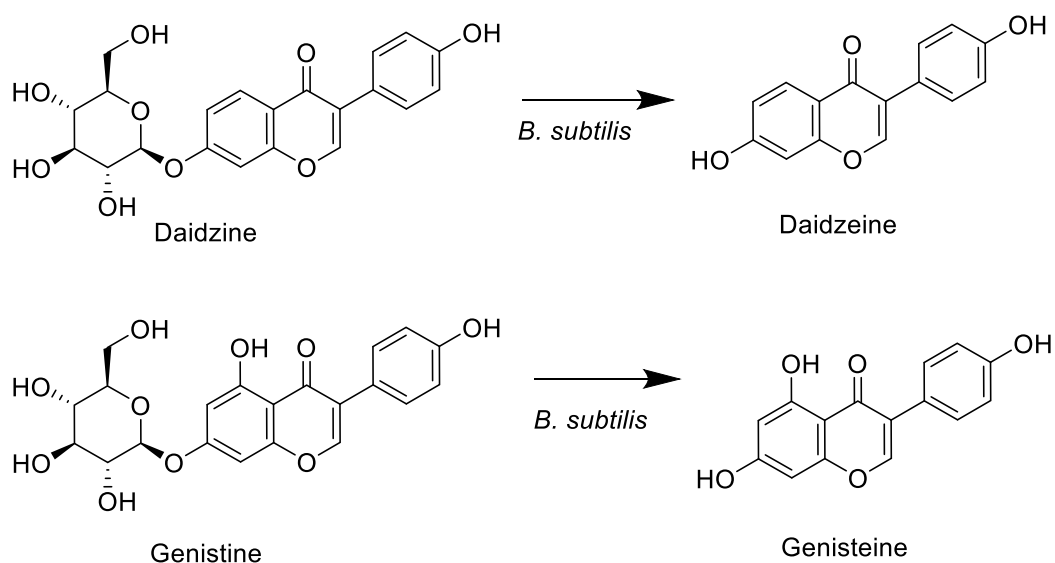


Figure 96 : Déglycosylation des isoflavones du soja par *Bacillus subtilis* [208]

La souche la plus utilisée est probablement *Bacillus megaterium* qui a de nombreuses propriétés industrielles. Elle produit diverses protéines qui sont utilisées en industries comme les β -amylases ou certaines enzymes de la famille des cytochromes P-450 monooxygénases, proche des cytochromes P-450 des eucaryotes [209].

Enfin, quelques travaux ont été réalisés sur l'espèce *B. weihenstephanensis* mettant en évidence une kératinase capable de dégrader complètement une plume de poulet en fournissant ainsi des peptides et acides aminés [210]. Elle possède également une lactonase impliquée dans la dégradation des molécules signales AHL (acyl homosérinelactone) (Figure 97) [211].

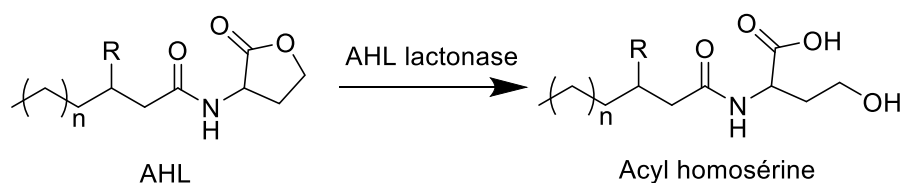


Figure 97 : Dégradation de l'AHL par la lactonase de *B. weihenstephanensis*

Enfin, en association avec d'autres souches bactériennes, *B. weihenstephanensis* est capable de biodégrader le diesel en l'utilisant comme unique source de carbone [212].

3. Biotransformation chez des Actinobactéries

a. Présentation générale

Les Actinobactéries ont déjà été décrites dans la partie précédente. Dans le cadre des travaux de biotransformation le genre *Streptomyces* est le plus étudié. Une souche de *Streptomyces* sp a montré, entre autres, ses capacités de méthoxylation des isoflavones avec pour exemple de composé de départ la génistéine (Figure 98) [213].

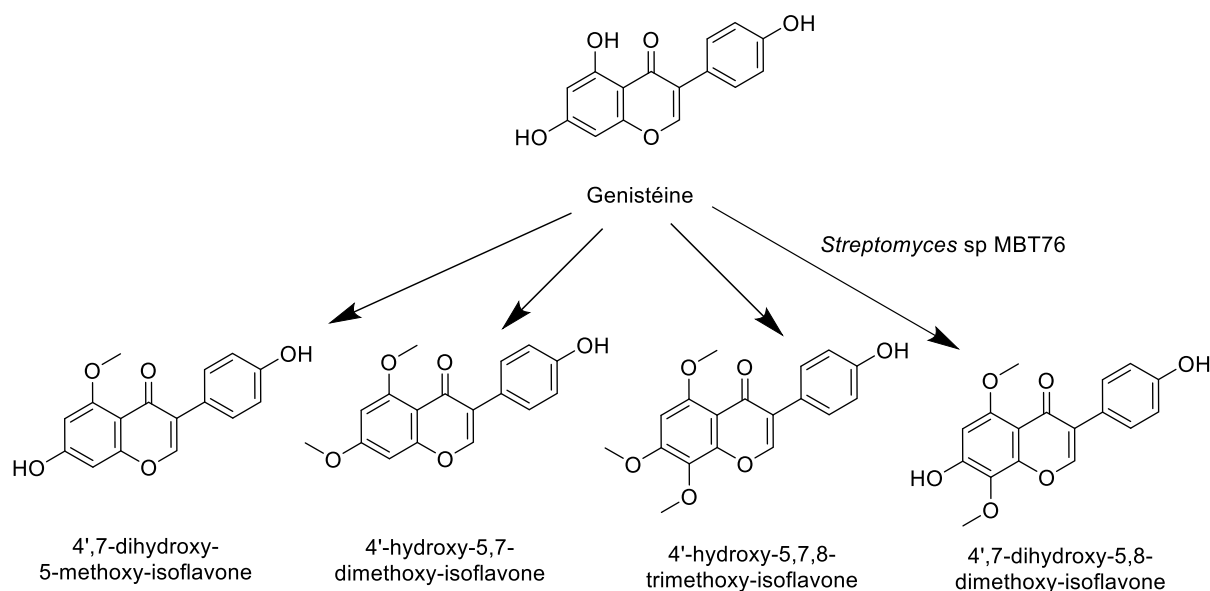


Figure 98 : Biotransformation de la génistéine par *Streptomyces* sp MBT76

Ces bactéries sont également étudiées pour leur capacité à hydroxyler les amides donnant ainsi des hydroxy amides et des amino alcools (Figure 99) [214].

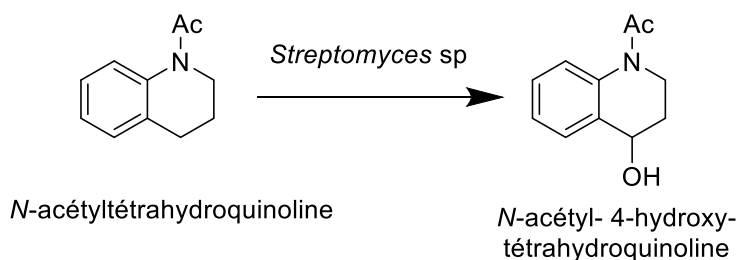


Figure 99 : Hydroxylation de la N-acétyltétrahydroquinoline par *Streptomyces* sp.

Streptomyces avermitilis, bien connue pour sa production de l'ivermectine, a également été étudiée pour ses capacités d'hydroxylation de divers composés (Figure 100) [215].

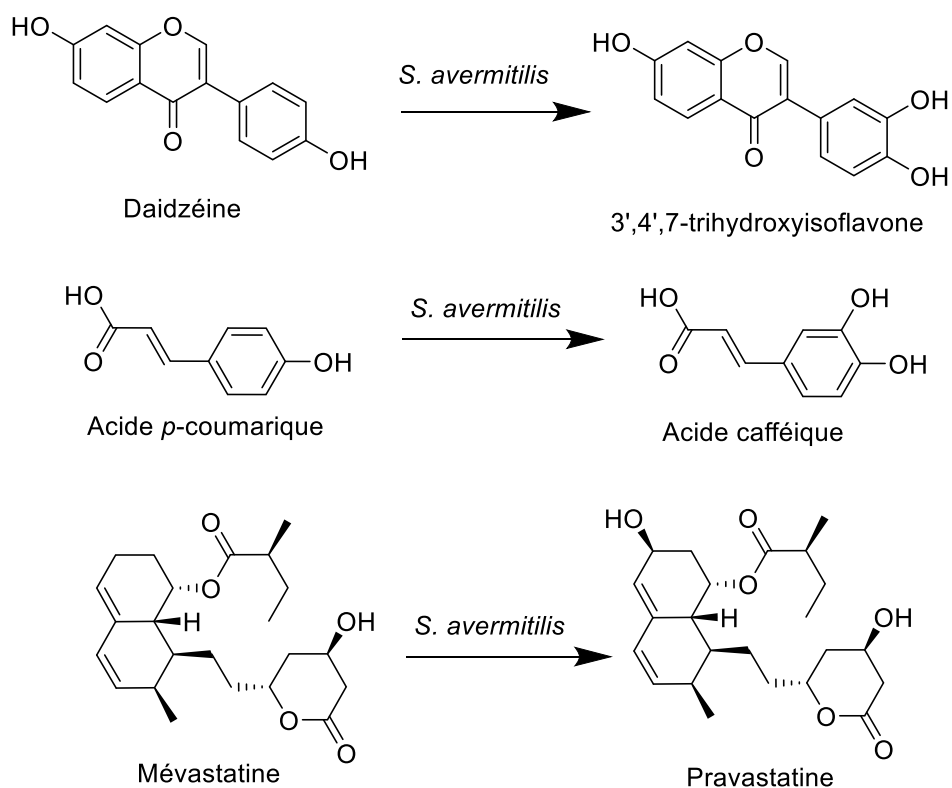


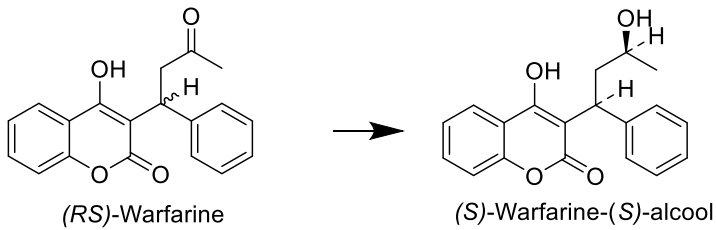
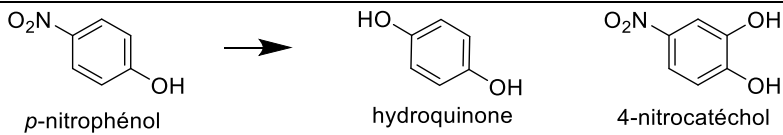
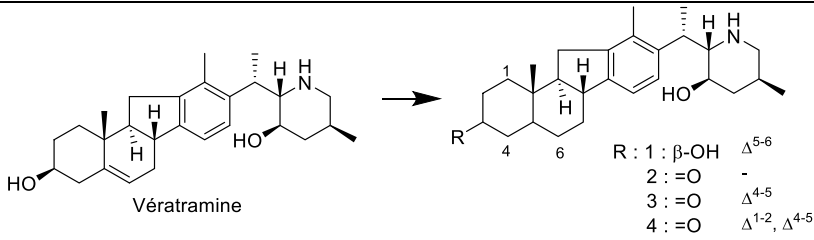
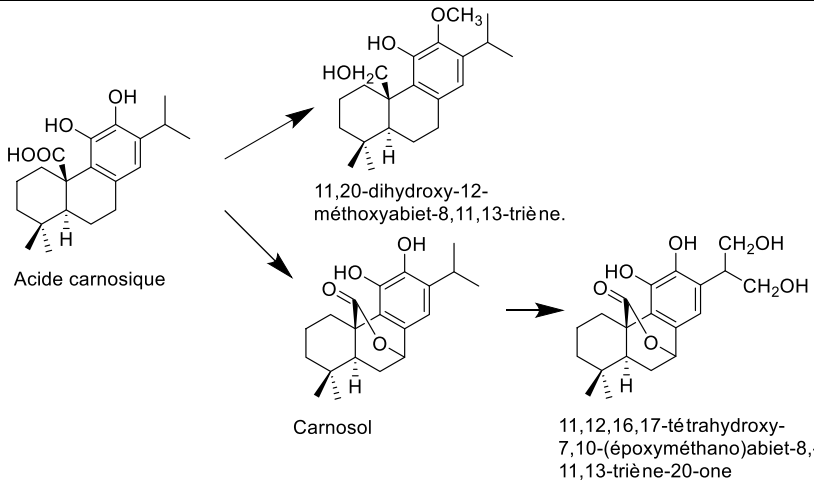
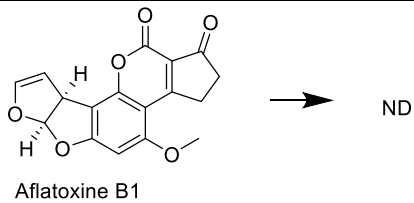
Figure 100 : Hydroxylation de divers composés par *S. avermitilis*

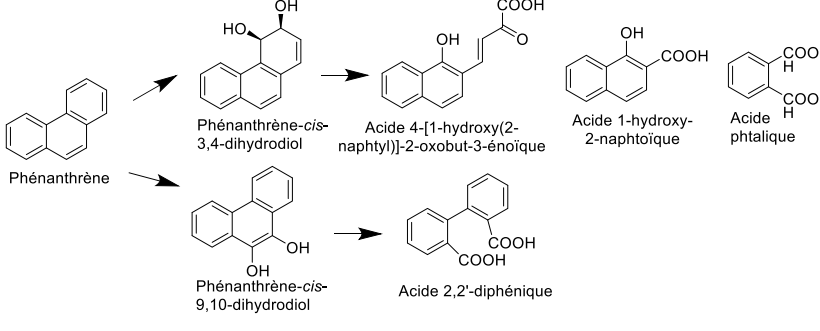
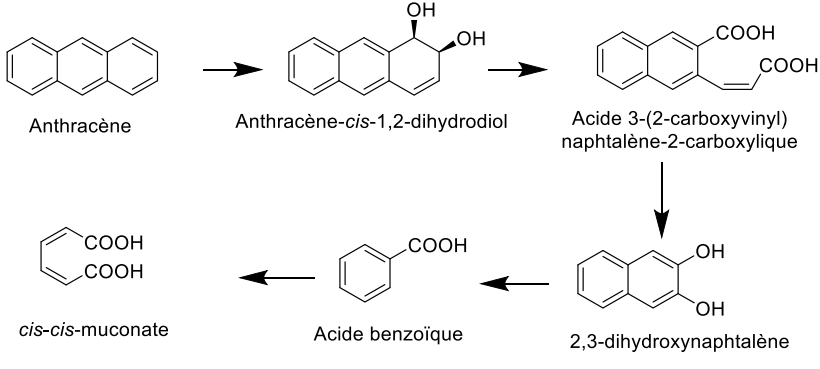
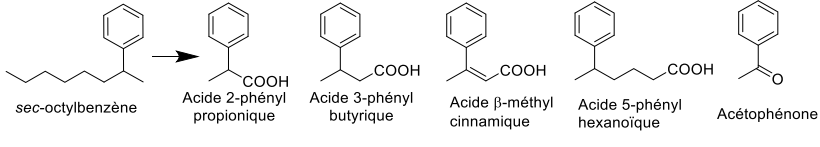
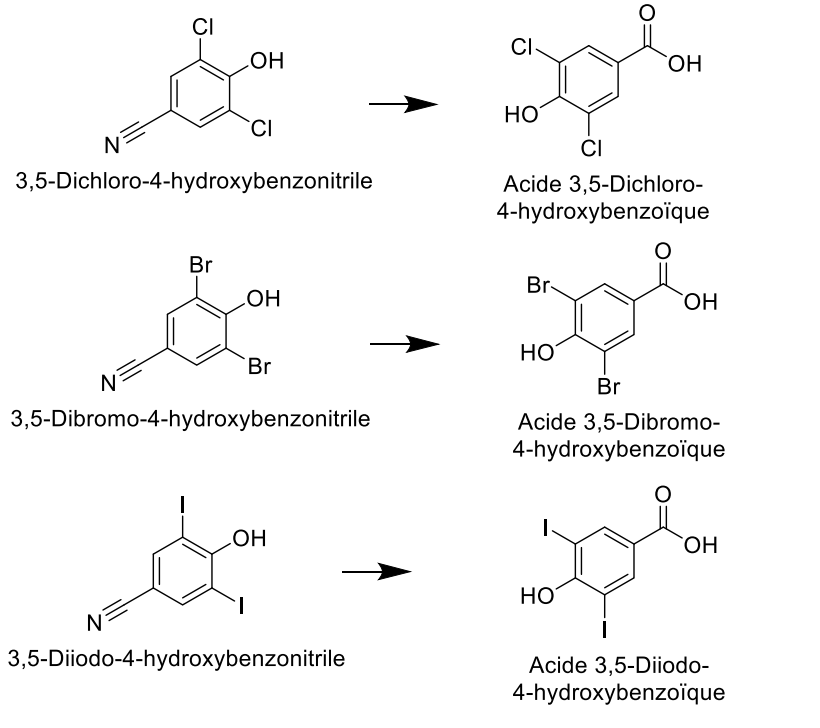
D'autres genres d'Actinobactéries sont utilisés en biotransformation comme les *Micromonospora* ou les *Nocardia*.

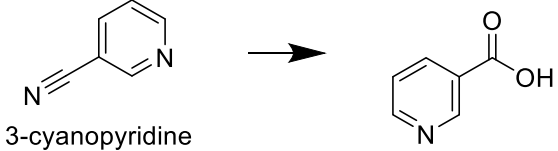
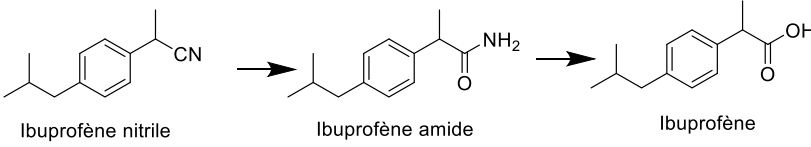
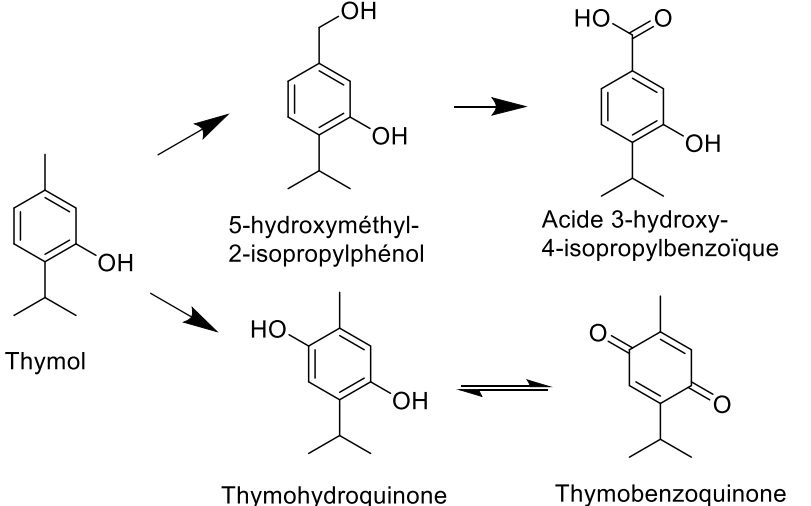
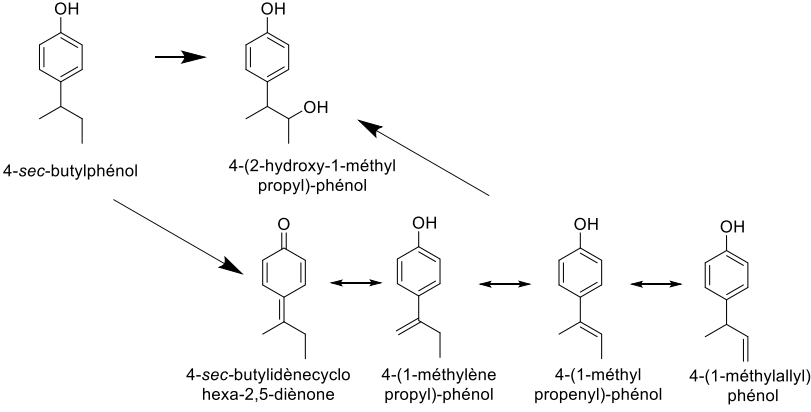
b. Biotransformation chez le genre *Nocardia*

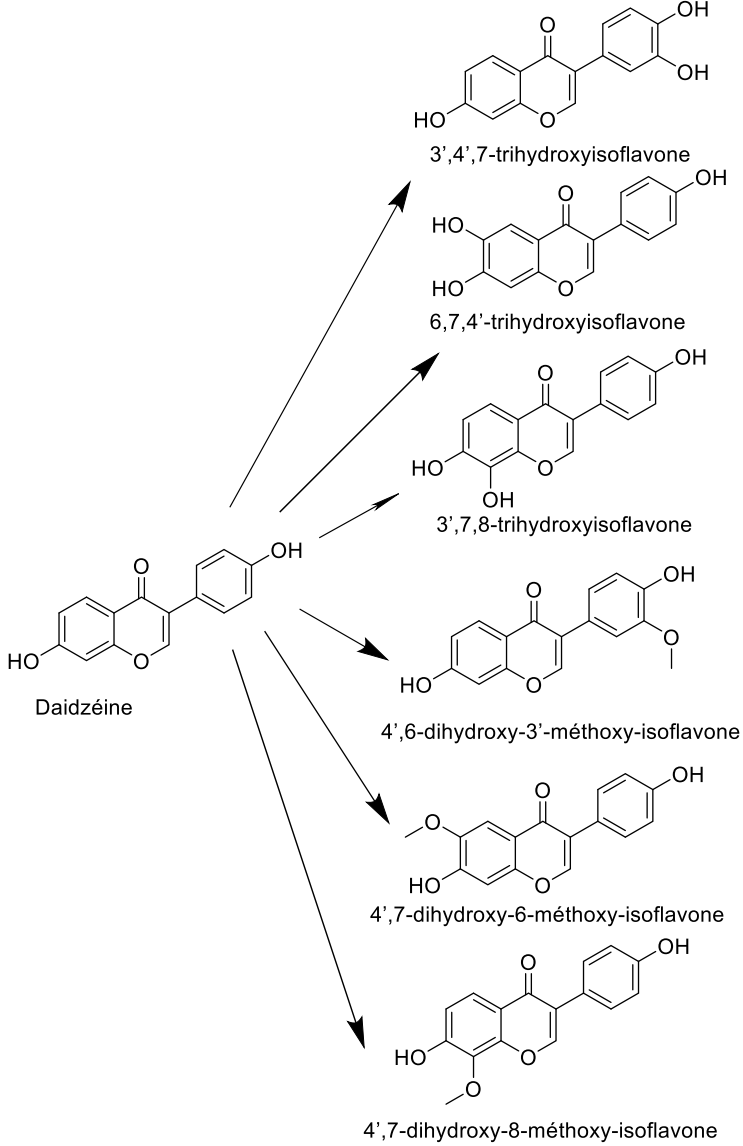
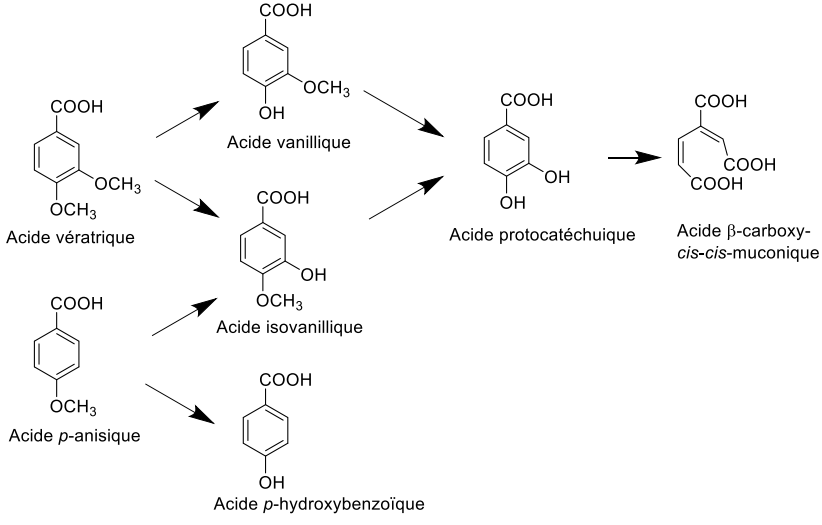
Plusieurs études ont été réalisées sur des souches bactériennes appartenant au genre *Nocardia*. Etant donné que les travaux présentés ici portent sur des composés lichéniques polyphénoliques, seules les études sur des composés phénoliques sont répertoriées dans le tableau 34 ci-dessous.

Tableau 34 : Biotransformation de composés phénoliques par des souches de *Nocardia*

Conversion	Souche utilisée	Référence
 (RS)-Warfarine (S)-Warfarine-(S)-alcool	<i>N. corallina</i>	[216]
 <i>p</i>-nitrophénol hydroquinone 4-nitrocatéchol	<i>Nocardia</i> sp TW2	[217]
 Vétratramine R : 1 : β-OH Δ⁵⁻⁶ 2 : =O - 3 : =O Δ⁴⁻⁵ 4 : =O Δ¹⁻², Δ⁴⁻⁵	<i>Nocardia</i> sp ATCC 21145	[218]
 Acide carnosique 11,20-dihydroxy-12-méthoxyabiet-8,11,13-triène. Carnosol 11,12,16,17-tétrahydroxy-7,10-(époxy-méthano)abiet-8,11,13-triène-20-one	<i>Nocardia</i> sp NRRL 5646	[219]
 Aflatoxine B1 ND	<i>N. corynebacterioides</i> DSM 12676 et DSM 20151	[220]

 Phénanthrène Phénanthrène-cis-3,4-dihydrodiol Acide 4-[1-hydroxy(2-naphthyl)]-2-oxobut-3-énoïque Acide 1-hydroxy-2-naphtoïque Acide phthalique Phénanthrène-cis-9,10-dihydrodiol Acide 2,2'-diphénique	<i>N. otitidiscaviarum</i> TSH1	[221]
 Anthracène Anthracène-cis-1,2-dihydrodiol Acide 3-(2-carboxyvinyl) naphtalène-2-carboxylique cis-cis-muconate Acide benzoïque 2,3-dihydroxynaphtalène	<i>N. otitidiscaviarum</i> TSH1	[221]
 sec-octylbenzène Acide 2-phényl propionique Acide 3-phényl butyrique Acide β-méthyl cinnamique Acide 5-phényl hexanoïque Acétophénone	<i>N. cyaricigeorgica</i>	[222]
 3,5-Dichloro-4-hydroxybenzonitrile Acide 3,5-Dichloro-4-hydroxybenzoïque 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzonitrile Acide 3,5-Dibromo-4-hydroxybenzoïque 3,5-Diiodo-4-hydroxybenzonitrile Acide 3,5-Diiodo-4-hydroxybenzoïque	<i>N. globerula</i> NHB-2	[223]

 3-cyanopyridine Acide nicotinique	<i>N. globerula</i> NHB-2	[224]
 Ibuprofène nitrile Ibuprofène amide Ibuprofène	<i>N. corallina</i> B-276	[225]
 Thymol 5-hydroxyméthyl-2-isopropylphénol Acide 3-hydroxy-4-isopropylbenzoïque Thymohydroquinone Thymobenzoquinone	<i>N. cyriacigeorgica</i>	[226]
 4-sec-butylphénol 4-(2-hydroxy-1-méthyl propyl)-phénol 4-sec-butylidénecyclohexa-2,5-diène 4-(1-méthylène propyl)-phénol 4-(1-méthyl propenyl)-phénol 4-(1-méthylallyl)-phénol	<i>N. cyriacigeorgica</i>	[227]

 Daidzéine 3',4',7-trihydroxyisoflavone 6,7,4'-trihydroxyisoflavone 3',7,8-trihydroxyisoflavone 4',6-dihydroxy-3'-méthoxy-isoflavone 4',7-dihydroxy-6-méthoxy-isoflavone 4',7-dihydroxy-8-méthoxy-isoflavone	<i>N. farcinica</i> IFM10152	[228]
 Acide vératrique Acide p-anisique Acide isovanillique Acide p-hydroxybenzoïque Acide vanillique Acide protocatéchique Acide β-carboxy-cis-cis-muconique	<i>N. corallina</i>	[229]

Ce tableau montre que les principales réactions de biotransformation retrouvées chez le genre *Nocardia* sont les hydroxylations, les méthylations de groupements hydroxyles et diverses réactions

d'oxydation (alcool en cétone, alcool en acide,...) ou de réduction (acide en alcool, doubles liaisons, cétone en alcool...). On retrouve également la formation de cycles intramoléculaires et la transformation de groupements cyano en acides carboxyliques.

D. Conclusion

Toutes ces informations montrent qu'au sein d'un microsysteme complexe de nombreuses interactions existent entre les différents organismes. Ces interactions sont notamment médiées par le biais de composés chimiques. Il est intéressant d'étudier un peu plus en détail la relation bactérie-lichen dans la symbiose lichénique pour déterminer le type de régulation existant entre ces organismes. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'effet des composés lichéniques dont la production est attribuée au partenaire fongique de la symbiose, sur les bactéries associées en observant leur biotransformation.

Scène 2 : Etude de la communication entre bactéries et lichens par le biais de la biotransformation de composés lichéniques

A. Intrigue et exposition de l'étude

Le lichen est un écosystème complexe au sein duquel de nombreux micro-organismes sont retrouvés. Les deux principaux partenaires symbiotiques (photobiotique et mycobiotique) sont les plus étudiés et la nature de leur relation a été classée parmi les symbioses. Cependant le rôle des autres micro-organismes associés (principalement bactéries et levures) n'est pas bien défini. Comme décrit dans la première partie de ce chapitre, les relations entre les organismes dans un écosystème complexe sont médiées par de nombreux composés chimiques.

Pour apporter certaines réponses quant au type de relation existant entre les lichens et le bactériobiotique associé nous avons choisi d'observer dans un premier temps l'effet d'un composé lichénique, l'acide usnique, décrit comme ayant des propriétés antibiotiques, sur la croissance et le métabolisme bactérien. Dans un deuxième temps nous avons observé la biotransformation de certains composés lichéniques par des souches associées aux lichens. Peut-on envisager que ces bactéries utilisent ces composés comme source carbonée ? De quelle manière s'affranchissent-elles de la toxicité des composés lichéniques ?

Les précédents travaux de Delphine Parrot sur l'isolement de souches bactériennes à partir de lichen ont montré que les trois principaux phyla bactériens représentés au sein du thalle lichénique sont les α -Protéobactéries, les Firmicutes et les Actinobactéries [6]. Dans le cadre des travaux de biotransformation nous avons donc sélectionné une souche d'Actinobactérie, une souche de Firmicutes et une souche d' α -Protéobactérie.

B. Effet de l'acide usnique sur la croissance bactérienne et le métabolisme

1. Personnages mis en scène

L'acide usnique, composé lichénique produit par le partenaire fongique, est présent dans de nombreux lichens. Des études ont mis en évidence son activité antibiotique envers les bactéries Gram-positif [4]. Il est donc intéressant dans le contexte de la relation bactérie-lichen d'observer l'effet de ce composé sur diverses souches. Pour cette étude nous avons sélectionné une souche Gram-négatif, la souche **MOLA 1416** dont le profil chimique a été étudié lors des travaux de thèse de Delphine Parrot. Deux souches Gram-positif ont également été choisies : la souche **DP94** précédemment étudiée et **MOLA 1488**, préalablement étudiée par D. Parrot et qui a la particularité de produire de l'acide usnique.

a. Souche DP94

Cette souche a déjà été décrite dans le chapitre 1, c'est une Actinobactérie Gram-positif isolée à partir du lichen *Collema auriforme*. Elle appartient au genre *Nocardia* et possède 100 % de similarité par l'analyse de l'ARNr 16S avec les espèces *N. soli*, *N. cummidelens* et *N. salmonicida*.

b. Souche MOLA 1416

La souche **MOLA1416** a été isolée à partir du lichen *Lichina pygmaea*, récolté en bord de mer à la pointe de la Houssay en Bretagne par Delphine Parrot et Sophie Tomasi. Le lichen a été rincé sur le terrain à l'eau stérile, puis il a été lavé à plusieurs reprises par de l'eau de mer stérile. Ce procédé permet l'obtention d'une première série de bactéries que l'on pourrait caractériser de bactéries épilichéniques. Puis le lichen a été broyé et associé à de l'eau de mer stérile (homogénat) donnant ainsi une nouvelle série de bactéries assimilées comme étant les bactéries endolichéniques. Ces solutions ont ensuite été ensemencées sur deux milieux supplémentés en acide nalidixique et amphotéricine B : MA (Marine Agar) et AIA (Actinomycetes Isolation Agar) en boîte de Pétri et des repiquages ont été effectués jusqu'à l'obtention de colonies pures. Ainsi, la souche **MOLA1416** a été obtenue à partir de l'homogénat (bactérie endolichénique). Elle a ensuite été séquencée et identifiée en 2013 par analyse du gène de l'ARNr 16S par comparaison avec les souches référencées dans la base de données EzTaxon server, comme étant *Hoeflea phototrophica* avec 91,9 % de similarité. Puis elle a été de nouveau identifiée en 2017 par Laurent Intertaglia, responsable de la souchothèque de l'observatoire océanologique de Banyuls-sur-mer, et la souche **MOLA1416** a présenté 93,6 % d'identité avec *Chelativorans intermedius* et *Mycoplana ramosa*.

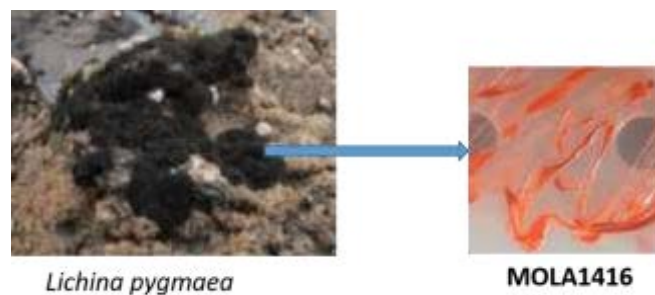


Figure 101 : Isolement de la souche **MOLA1416** à partir du lichen *Lichina pygmaea*

C'est une bactérie Gram négatif et ses colonies sont petites, lisses et colorées en rouge. Le pigment responsable de cette coloration a été isolé et identifié comme étant la de 6-méthoxy,2-méthyl,3-heptylprodiginine (Figure 102). L'étude chimique de cette souche bactérienne a également permis l'isolement de la cyclo (L-Leu-L-Pro) et une analyse du profil chimique par réseaux moléculaires a mis en évidence 25 composés appartenant à diverses familles : des dicétopipérazines, des dérivés polyphénoliques (isoflavones, isocoumarines), des glucocorticoïdes, un stérol, un alcaloïde et un dérivé d'acide aminé [230].

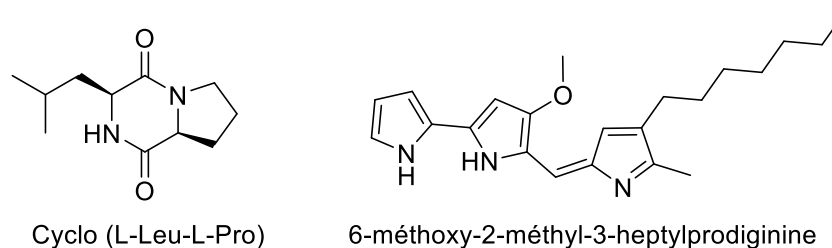


Figure 102 : Composés isolés à partir de culture de la souche **MOLA1416**

c. Souche **MOLA1488**

La souche **MOLA1488** a été isolée à partir du lichen *Lichina confinis* lors des travaux de thèse de Delphine Parrot. Le lichen a été récolté au même endroit que *Lichina pygmaea* et l'isolement des souches bactériennes a été réalisé selon le même protocole que pour la souche **MOLA1416**. L'identification de la souche réalisée par analyse de l'ARNr 16S et comparaison au serveur EzTaxon a donné 100 % de similarité avec l'espèce *Streptomyces cyaneofuscatus*.

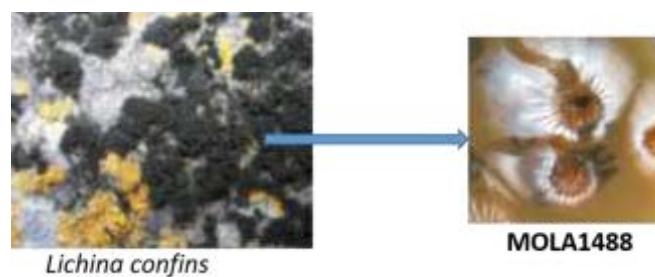


Figure 103 : Isolement de la souche **MOLA1488** à partir du lichen *Lichina confinis*

Cette bactérie est Gram-positif et ces colonies sont convexes, irrégulières et de couleur orangée. Elle produit un filament mycélien aérien blanc. L'étude du profil chimique de la culture de cette souche en milieu liquide a mis en évidence la production d'acide usnique, ainsi que de cyaneodimycine, de cyaneomycine, de (3-hydroxyacétyl)indole, de *N*-acétyl- β -oxotryptamine de *N*-méthyl-dactinomycine et de deux dicétopipérazines : la cyclo-(L-Phe-L-Pro) et la cyclo-(L-Leu-L-Pro) (Figure 104) [231].

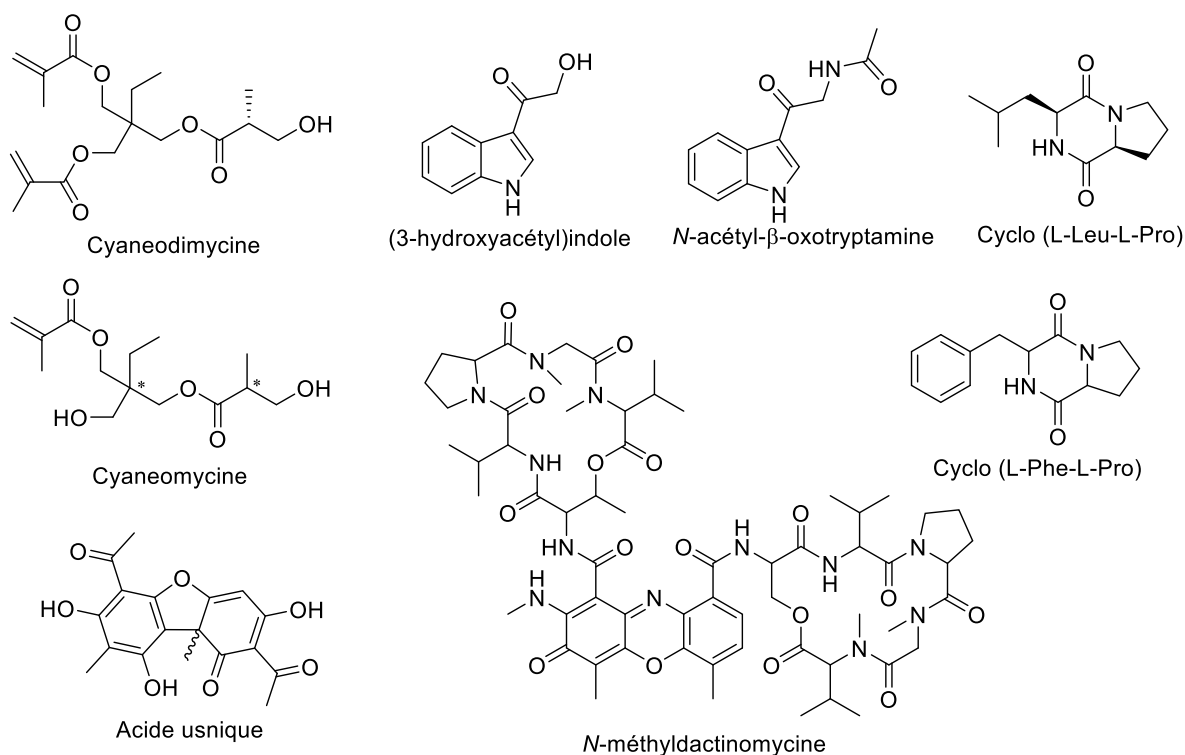


Figure 104 : Composés isolés à partir de culture de la souche **MOLA1488**

2. Effets de l'acide usnique

a. Effets sur la croissance bactérienne

Dans le cadre d'un stage de l'UE recherche, Mélanie Clément a réalisé ces travaux. L'étude a été réalisée sur 30 mL de milieu de cultureensemencés par chacune des trois souches. L'acide usnique dissous dans le DMSO y a été ajouté à une concentration de 0,1 mg/mL dès le début de la période d'incubation. Des témoins de culture des bactéries seules et des bactéries en présence de DMSO ont étéensemencés en même temps pour observer un éventuel effet du DMSO sur la croissance ou le métabolisme. Chaque échantillon a été réalisé en duplicata. La croissance bactérienne a été mesurée quotidiennement jusqu'à 7 jours après le début de la phase stationnaire, par mesure de la densité optique à 620 nm et par test au MTT mesurant la viabilité cellulaire. Pour l'analyse de l'effet de l'acide usnique sur le métabolisme bactérien, les cultures ont été arrêtées soit au début de la phase stationnaire soit après une semaine de phase stationnaire. Les échantillons ont alors été analysés par HPLC/MS pour comparaison des profils chimiques (Figure 105).

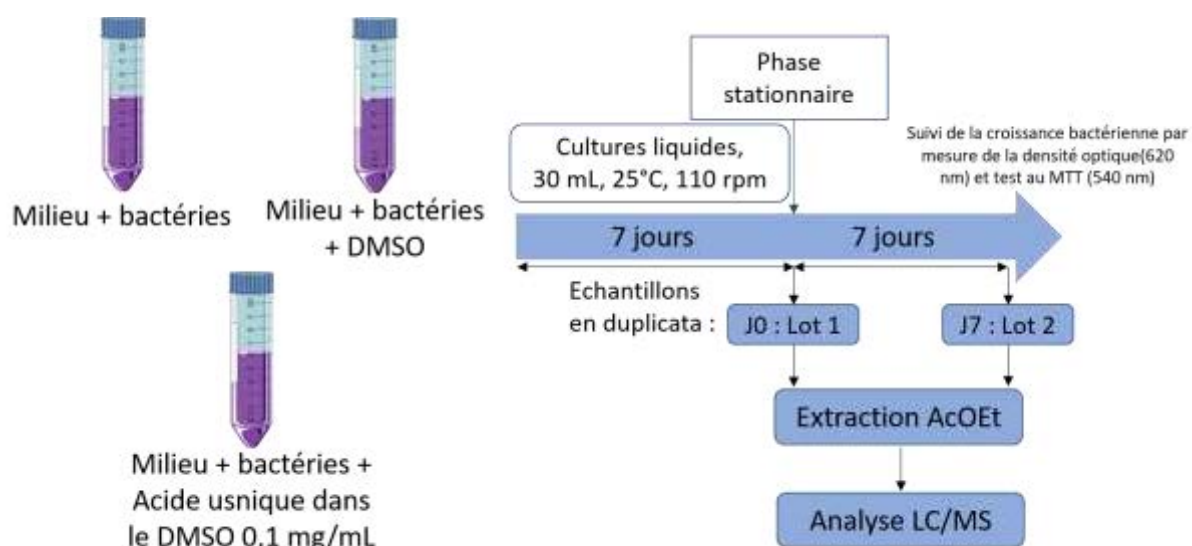


Figure 105 : Schéma récapitulatif de l'étude de l'effet de l'acide usnique sur les bactéries associées aux lichens

Dans le cas de la souche **MOLA1416** on constate que l'ajout d'acide usnique (ou de DMSO) dans le milieu de culture n'a pas d'incidence sur la croissance de cette bactérie. Un simple retard de croissance peut être détecté au début de la courbe. Dans le groupe des témoins bactéries seules ou bactéries + DMSO, la phase de croissance exponentielle débute dès le deuxième jour de culture alors qu'en présence d'acide usnique elle ne débute qu'après le troisième jour de culture (Figure 106).

Les souches **DP94** et **MOLA1488**, quant à elles, sont fortement inhibées par l'acide usnique, aucune croissance n'est observée (Figures 107 et 108).

Ces résultats sont confirmés par le pourcentage de viabilité mesuré à l'aide du test au MTT en comparaison avec les témoins.

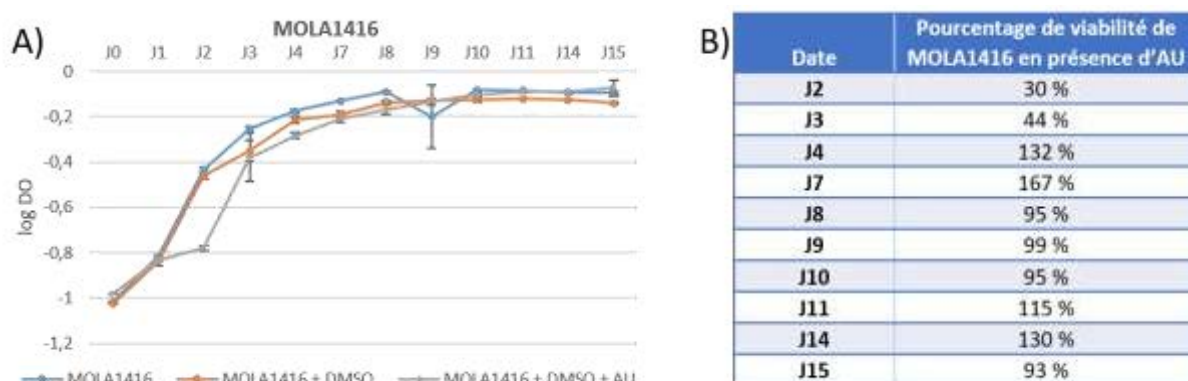


Figure 106 : A) Comparaison des courbes de croissance des échantillons de **MOLA1416** en fonction du temps, B) Pourcentage de viabilité de la souche **MOLA1416** en présence d'acide usnique (AU) mesuré par test au MTT

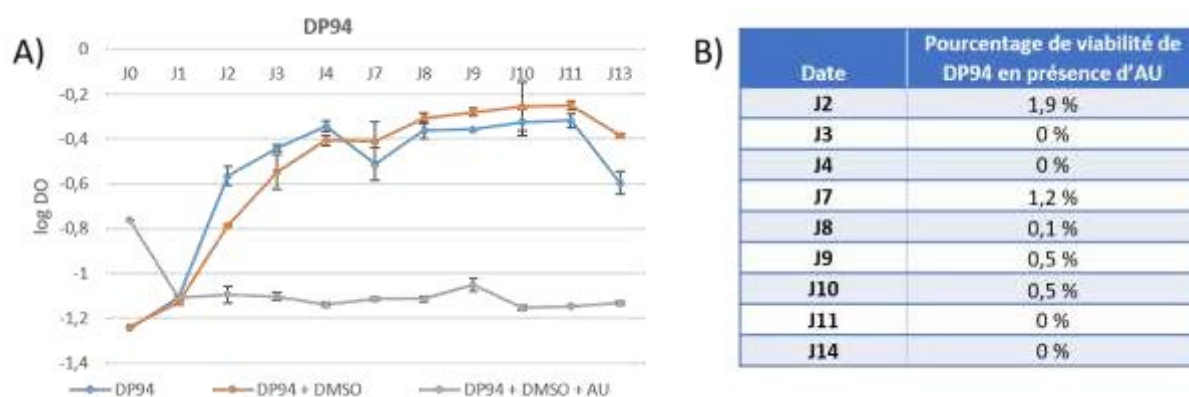


Figure 107 : A) Comparaison des courbes de croissance des échantillons de **DP94** en fonction du temps, B) Pourcentage de viabilité de la souche **DP94** en présence d'acide usnique (AU) mesuré par test au MTT

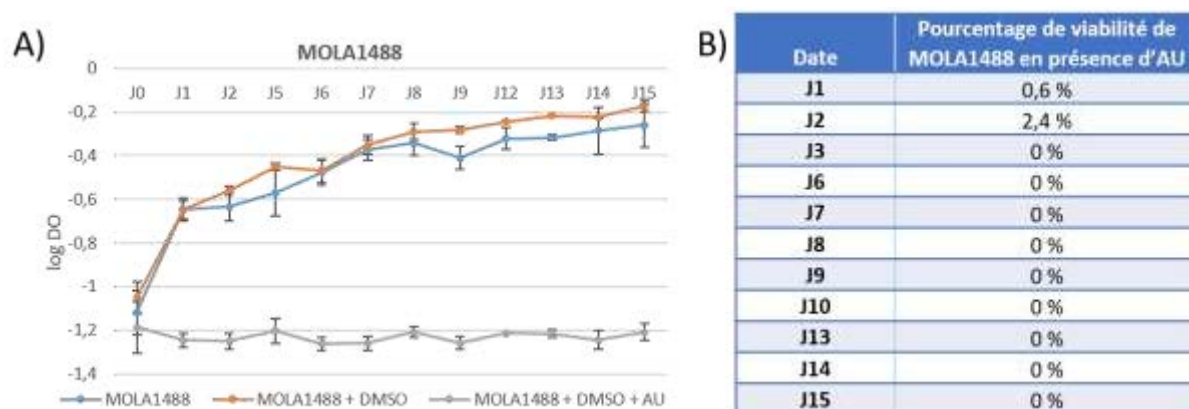


Figure 108 : A) Comparaison des courbes de croissance des échantillons de **DP94** en fonction du temps, B) Pourcentage de viabilité de la souche **DP94** en présence d'acide usnique (AU) mesuré par test au MTT

L'acide usnique est un composé connu pour ses propriétés antibiotiques contre les bactéries à Gram-positif et anaérobies [232,233]. Les résultats obtenus lors de ces travaux correspondent avec ce qui a été préalablement décrit pour l'acide usnique. Il n'a pas d'activité antibiotique sur la souche **MOLA1416** qui est une bactérie Gram-négatif et il inhibe la croissance des souches **MOLA1488** et **DP94** qui sont des bactéries Gram-positif.

Il est à noter que la souche productrice d'acide usnique, **MOLA1488**, est elle-même inhibée par ce composé. On peut supposer qu'elle produit ce métabolite en faible quantité dans un but d'autorégulation de sa prolifération.

b. Effet de l'acide usnique sur le métabolisme bactérien

b-1. Résultats pour la souche **MOLA1416**

Lorsque les cultures ont atteint le début de la phase stationnaire, un premier lot a été arrêté, le deuxième lot étant arrêté après 7 jours de phase stationnaire (Figure 109). Après extraction à l'acétate d'éthyle, les extraits ont été analysés par HPLC/MS pour observer l'effet de l'acide usnique sur la production bactérienne.

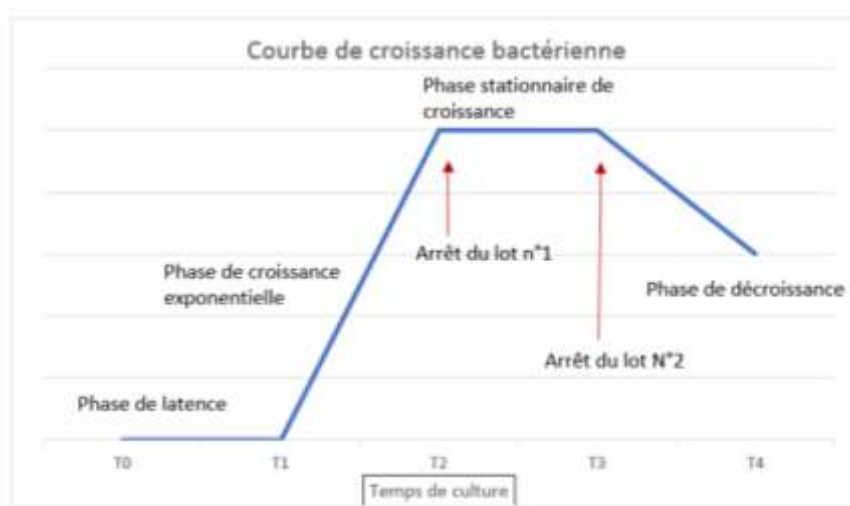


Figure 109 : Courbe de croissance bactérienne

La comparaison des chromatogrammes HPLC des extraits issus de la culture de la souche **MOLA1416** en présence d'acide usnique avec ceux des témoins (Figure 110) montrent dans le premier lot une différence de production bactérienne en présence de DMSO. Dans le deuxième lot, on constate que la production des échantillons témoins a évolué avec le temps, le chromatogramme obtenu est maintenant comparable à celui des échantillons en présence de DMSO. La présence de DMSO accélère le métabolisme bactérien. Nous observons également que l'acide usnique induit la production de nouveaux composés apparaissant dans la zone des temps de rétention autour de 33 min.

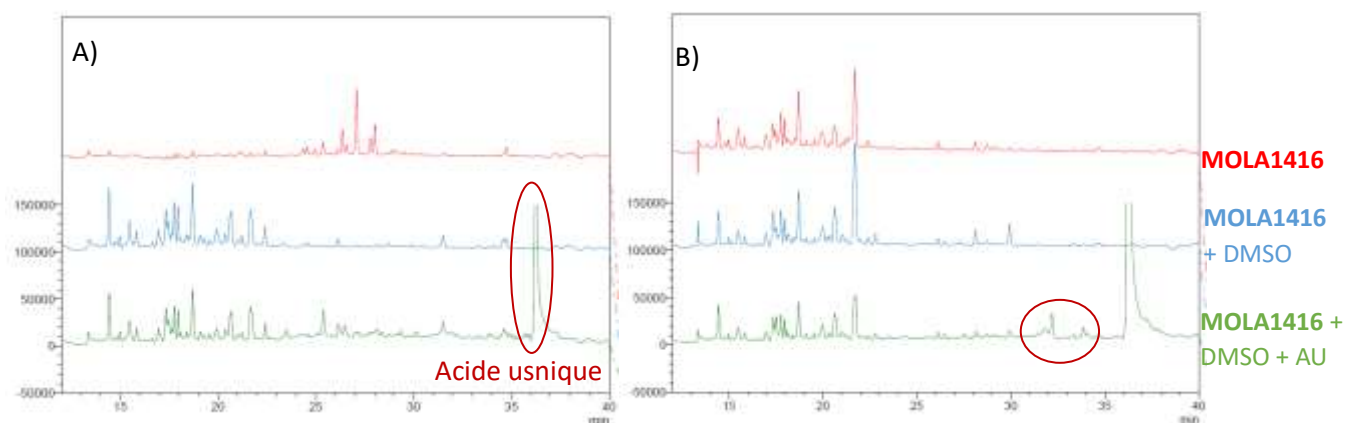


Figure 110 : Comparaison des profils chimiques de **MOLA1416**, A) au début de la phase stationnaire, B) à la fin de la phase stationnaire. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm

L'analyse par spectrométrie de masse en mode positif du composé éluant à 32,2 min sur le chromatogramme montre un ion majoritaire avec une masse de m/z 388. Son spectre UV présente une longueur d'onde maximale d'absorption à λ_{max} = 289 nm proche de celle de l'acide usnique (281 nm) laissant supposer que nous sommes en présence d'un dérivé de l'acide usnique. Ce composé sera décrit dans la partie suivante. L'acide usnique est toujours présent sur les chromatogrammes après une semaine de phase stationnaire, il n'est donc pas totalement métabolisé par la souche **MOLA1416**.

b-2. Résultats pour la souche **DP94**

L'analyse des chromatogrammes obtenus avec les extraits de **DP94** ne montrent aucune influence de l'acide usnique sur la production bactérienne. L'acide usnique n'apparaît pas sur ces chromatogrammes, il a complètement précipité dans le milieu de culture et il est resté avec le culot bactérien lors de la centrifugation des échantillons (Figure 111).

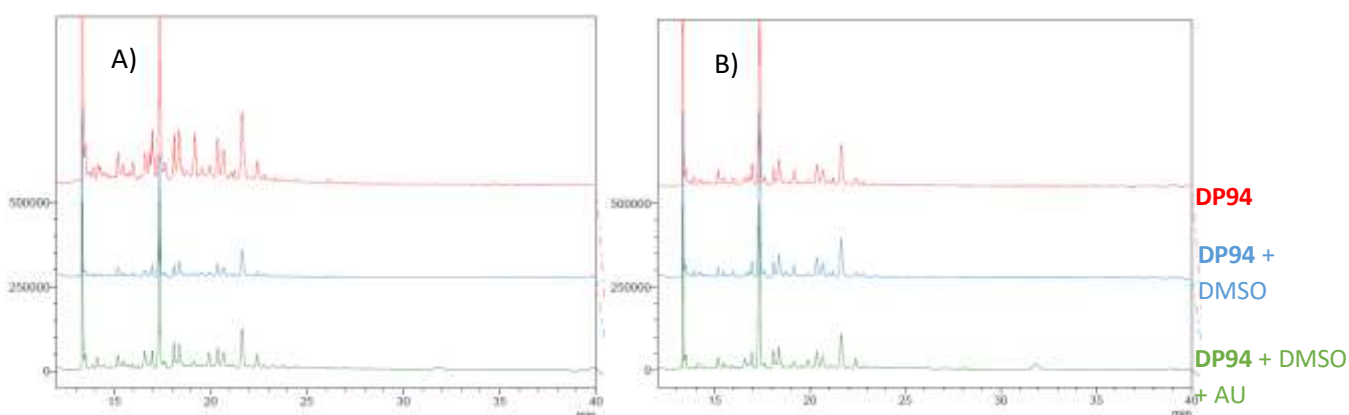


Figure 111 : Comparaison des profils chimiques de **DP94**, A) au début de la phase stationnaire, B) à la fin de la phase stationnaire. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm

b-3. Résultats pour la souche **MOLA1488**

L'analyse des chromatogrammes obtenus avec la souche **MOLA1488** fournit de nombreuses informations. Tout d'abord, l'acide usnique est toujours présent au début et à la fin de la phase stationnaire de croissance de cette souche. Ensuite nous observons que l'ajout de DMSO dans le milieu provoque l'apparition d'un composé avec un temps de rétention de 22,8 min. Dès le début de la phase stationnaire, la présence d'acide usnique induit l'apparition de nouveaux composés avec notamment des composés très polaires éluant en tout début de gradient à 13,3 et 13,5 min. Deux autres composés nouveaux sont détectés en fin de gradient à 26,4 min et 31,6 min (Figure 112).

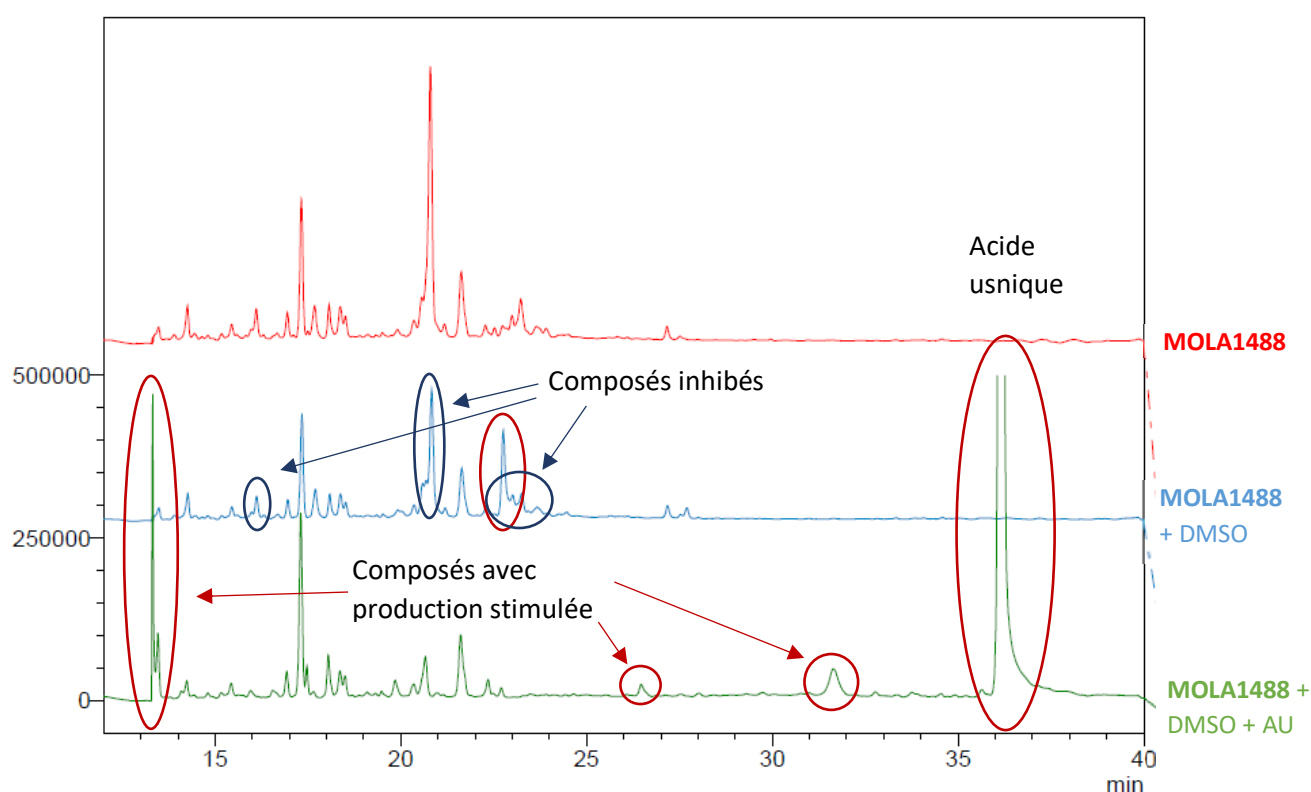


Figure 112 : Comparaison des profils chimiques de **MOLA1488**, au début de la phase stationnaire. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevaill® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm

L'analyse en spectrométrie de masse en mode positif des composés en début de gradient montrent un pic pseudomoléculaire avec un m/z de 268 (Figure 113). Le spectre UV présente une longueur d'onde maximale d'absorption à 255 nm. Si l'on considère que ce composé est un métabolite de l'acide usnique, alors le déplacement hypsochrome sur le spectre UV et la perte de masse importante par rapport à l'acide usnique (- 77) témoignent d'un clivage de la molécule au niveau du chromophore.

Cependant ce composé est retrouvé dans tous les chromatogrammes obtenus avec la souche **DP94** (avec ou sans acide usnique) ce qui ne corrobore pas la théorie du métabolite de l'acide usnique. Cela peut être un composé dont la production est induite par l'acide usnique, ou un composé libéré lors de

la cytolysé des bactéries inhibées par ce composé. En effet, rappelons-le, la croissance de cette souche est totalement inhibée par l'acide usnique.



Figure 113 : Spectre de masse en mode positif du pic de $T_r=13,3$ min de **MOLA 1488** en présence d'acide usnique

Les deux autres composés éluant à 26,4 et 31,6 min donnent respectivement en spectrométrie de masse des ions à m/z 333 et m/z 359 en mode négatif. Ces composés dérivent potentiellement de l'acide usnique mais aucune hypothèse valable de structure n'a pu être proposée.

D'autres composés initialement produits par la souche **MOLA1488** voient leur production inhibée en présence d'acide usnique. C'est notamment le cas pour le composé majoritaire éluant à 20,8 min, qui a été identifié lors des travaux de thèse de Delphine Parrot comme étant la cyclo (L-Leu-L-Pro), sa production est totalement inhibée par l'acide usnique. Nous avons précédemment démontré que la croissance de cette souche était inhibée par l'acide usnique et il est établi que les dicétopipérazines servent de molécule signal entre les bactéries dans le cadre du quorum sensing. Etant donné que la densité bactérienne est faible il n'est pas étonnant que ces molécules ne soient presque plus excrétées. On peut également émettre l'hypothèse que, la souche étant en danger à cause d'un composé toxique, elle réalise une économie de ses ressources en limitant les fonctions non vitales.

A la fin de la phase stationnaire on retrouve un profil chimique similaire (Figure 114). Les composés élués au début du gradient sont toujours produits en présence d'acide usnique et on constate la même inhibition des composés entourés en bleu. Cependant les signaux précédemment détectés à 26,4 et 31,6 min ne sont plus présents sur le chromatogramme. L'acide usnique est, quant à lui, toujours présent sur le chromatogramme, témoignant du fait qu'il n'est pas totalement métabolisé par la souche **MOLA1488**.

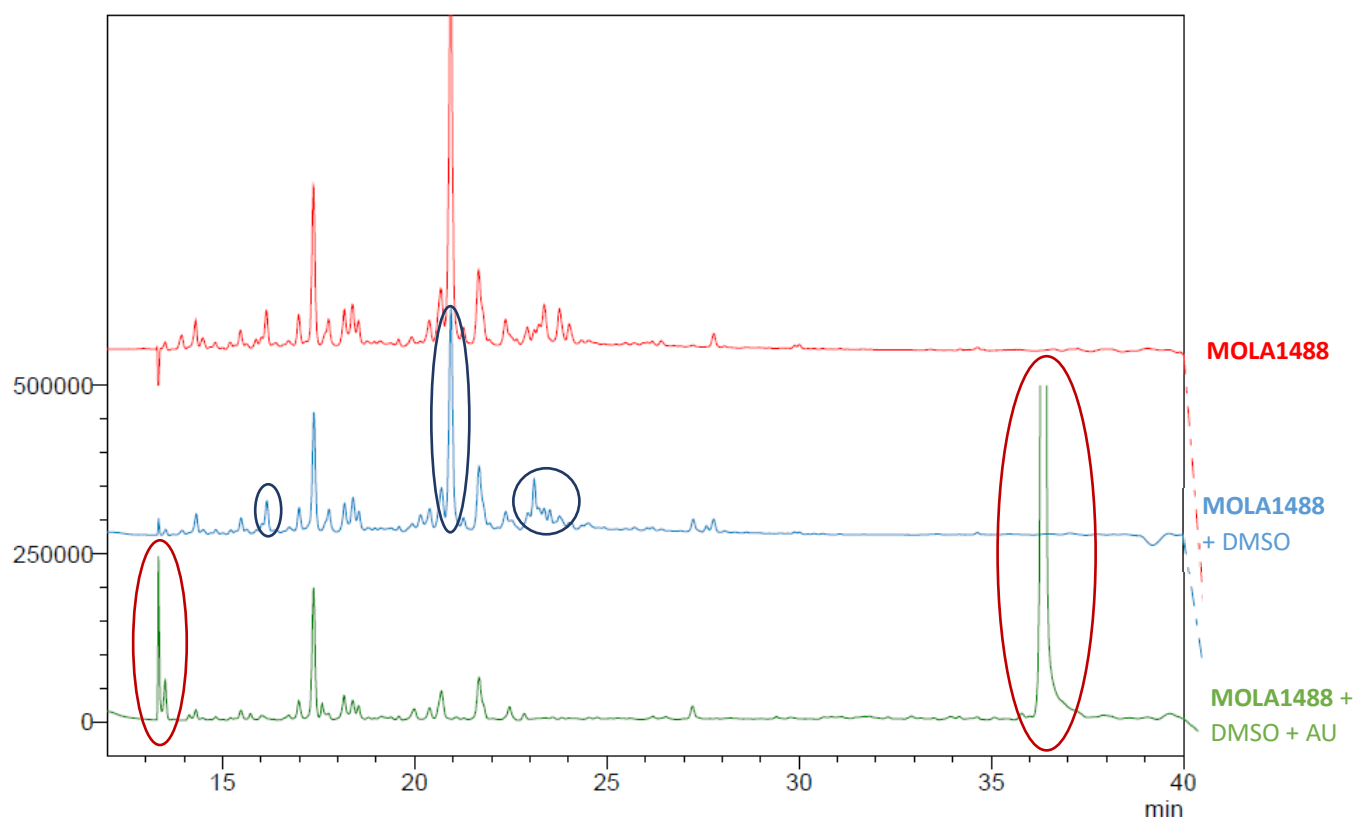


Figure 114 : Comparaison des profils chimiques de **MOLA1488**, à la fin de la phase stationnaire. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 220 nm

Ces travaux ont confirmé l'activité antibiotique de l'acide usnique sur les souches Gram-positif. On constate également l'apparition de potentiels métabolites de l'acide usnique dans les extraits de la souche Gram-négatif **MOLA1416** dont la croissance n'est pas inhibée. Enfin la souche **MOLA1488**, elle-même productrice d'acide usnique est totalement inhibée par ce composé et son métabolisme en est fortement modifié, laissant supposer qu'elle utilise ce composé pour auto-réguler sa propre prolifération.

La capacité des métabolites lichéniques à contrôler la communauté bactérienne associée aux lichens ainsi que la capacité à utiliser ces composés par cette population bactérienne a pu être révélée dans cette étude et démontre les interactions possibles qui existent entre les différents partenaires de cette symbiose lichénique.

C. Les souches bactériennes associées aux lichens utilisent-elles les composés lichéniques à leurs fins ?

1. Personnages mis en scène

La seconde étape de cette étude a été d'étudier la biotransformation de composés lichéniques par des bactéries associées aux lichens. Pour cela nous avons choisi d'observer les trois phyla bactériens les plus représentés au sein du thalle lichénique, soit les α -Protéobactéries, les Firmicutes et les Actinobactéries. Cette étude correspond à des travaux réalisés par un stagiaire de master 2, Alexandre Garnier.

a. α -Protéobactérie : **MOLA1416**

La bactérie sélectionnée dans le phylum des α -Protéobactéries est la souche **MOLA1416**, précédemment décrite lors de l'étude de l'effet de l'acide usnique. Elle a été cultivée dans le milieu MAI (Marine Agar supplémenté en iodure de sodium) à 25 °C à une vitesse d'agitation de 110 rpm.

b. Firmicutes : *Bacillus weihenstephanensis*

Pour représenter le phylum des Firmicutes, la souche sélectionnée est *Bacillus weihenstephanensis*. Elle a été isolée à partir du lichen *Peltigera hymenina*, après séquençage de l'ARNr 16S et comparaison aux données du serveur EzTaxon, elle a montré 100 % d'identité avec l'espèce *Bacillus weihenstephanensis*.

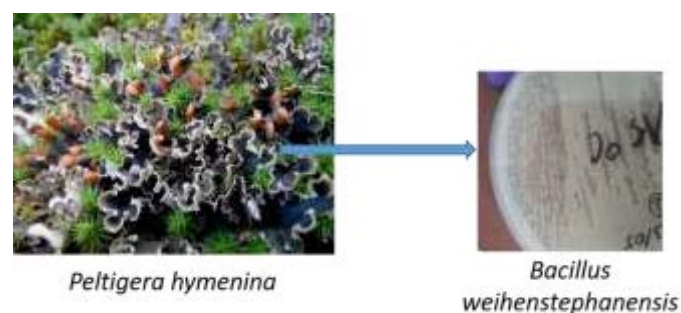


Figure 115 : Isolement de *Bacillus weihenstephanensis* à partir du lichen *Peltigera hymenina*

Cette bactérie à Gram-positif appartient au groupe des bactéries psychrotolérante de *B. cereus*. Elle est anaérobie facultative, peut se développer à des basses températures entre 4 et 7 °C mais pas à des températures trop élevées (43 °C) [234]. Les colonies sont de couleur crème et ont un aspect lisse. Les bactéries sont de grands bâtonnets ciliés et leur température optimale de croissance est entre 30 et

35 °C. Elle a été mise en culture dans le milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) à 25°C à une vitesse d'agitation de 110 rpm.

c. Actinobactérie : **DP94**

L'Actinobactérie sélectionnée pour cette étude est la même que précédemment décrit, à savoir la souche **DP94**, identifiée comme une *Nocardia* sp. Elle a été mise en culture dans le milieu TY (tryptone yeast) à une température de 25°C à une vitesse d'agitation de 110 rpm.

2. *Essais de stabilité et sélection des composés candidats à la biotransformation*

Les essais de biotransformation sont réalisés dans le tampon phosphate à pH 7, à 25 °C à une vitesse d'agitation de 110 rpm, sur une période de 9 jours. Dans un premier temps nous avons procédé à des essais de stabilité des composés lichéniques dans ces conditions pour pouvoir réaliser l'étude.

a. Composés lichéniques

Les composés lichéniques sont principalement des composés polyphénoliques, les squelettes les plus retrouvés sont des dibenzofuranes, des depsides et depsidones et des composés monoaromatiques [235].

Nous avons choisi un composé représentant de chaque famille structurale pour réaliser les essais de biotransformation. Ainsi, l'acide usnique (dibenzofurane), l'atranorine (depside), les acides stictique et variolérique (depsidones) et le méthyl- β -orcinolcarboxylate ou MOC (composé monoaromatique) ont été sélectionnés notamment par le fait que ce sont des composés très courant chez les lichens (Figure 116).

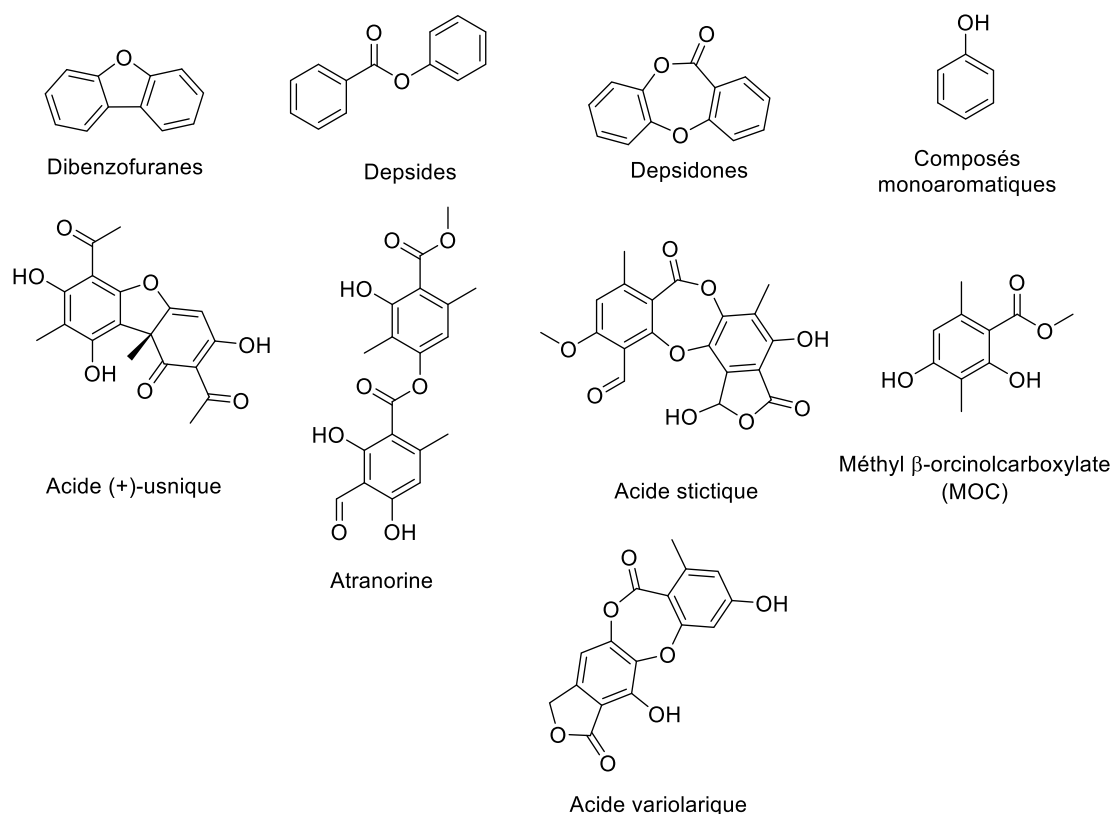


Figure 116 : Squelettes des composés lichéniques les plus retrouvés et structures des composés sélectionnés

Les composés ont été dissous dans le DMSO et ajoutés dans du tampon phosphate à pH 7 à trois concentrations différentes : 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL et 1 mg/mL puis les échantillons sont incubés (25°C, 110 rpm). Ils sont extraits par de l'acétate d'éthyle à J0, J1, J3, J6 et J9, J0 étant le jour de la préparation des échantillons, puis sont analysés en HPLC/MS.

Le témoin (+)-acide usnique est bien pur et on ne constate aucune dégradation de ce composé entre J0 et J9 ce qui confirme notre choix pour ce composé dans notre étude (Figure 117).

Le témoin acide stictique présente de nombreuses impuretés qui sont retrouvées lors de l'essai de stabilité. La concentration des impuretés n'est pas modifiée par l'incubation du produit dans le tampon phosphate, et on ne constate pas non plus d'apparition d'éventuels produits de dégradation. Cependant, l'acide stictique n'a pas été retenu pour nos essais de biotransformation en l'état du fait de la présence trop importante d'impuretés (Figure 117).

Le témoin de l'acide variolariusque est pur mais dès l'ajout du composé dans le tampon phosphate à J0 on constate l'apparition d'un produit de dégradation à 23,4 min sur les chromatogrammes. La concentration de ce produit augmente entre J0 et J9 et d'autres produits apparaissent aux temps de rétention de 21,4 min et 21,8 min. Ces données témoignent de la dégradation de l'acide variolariusque dans nos conditions opératoires. Il n'a donc pas été utilisé pour l'étude de biotransformation (Figure 117).

Le témoin MOC est également pur et on constate l'apparition de deux pics aux temps de rétention de 23,1 et 23,7 min lorsqu'il est dans le tampon phosphate dès J0. Cependant, la concentration de ces

composés n'évolue pas à J9 et elle reste très faible. Nous avons donc choisi de réaliser l'étude de biotransformation sur le MOC également (Figure 117).

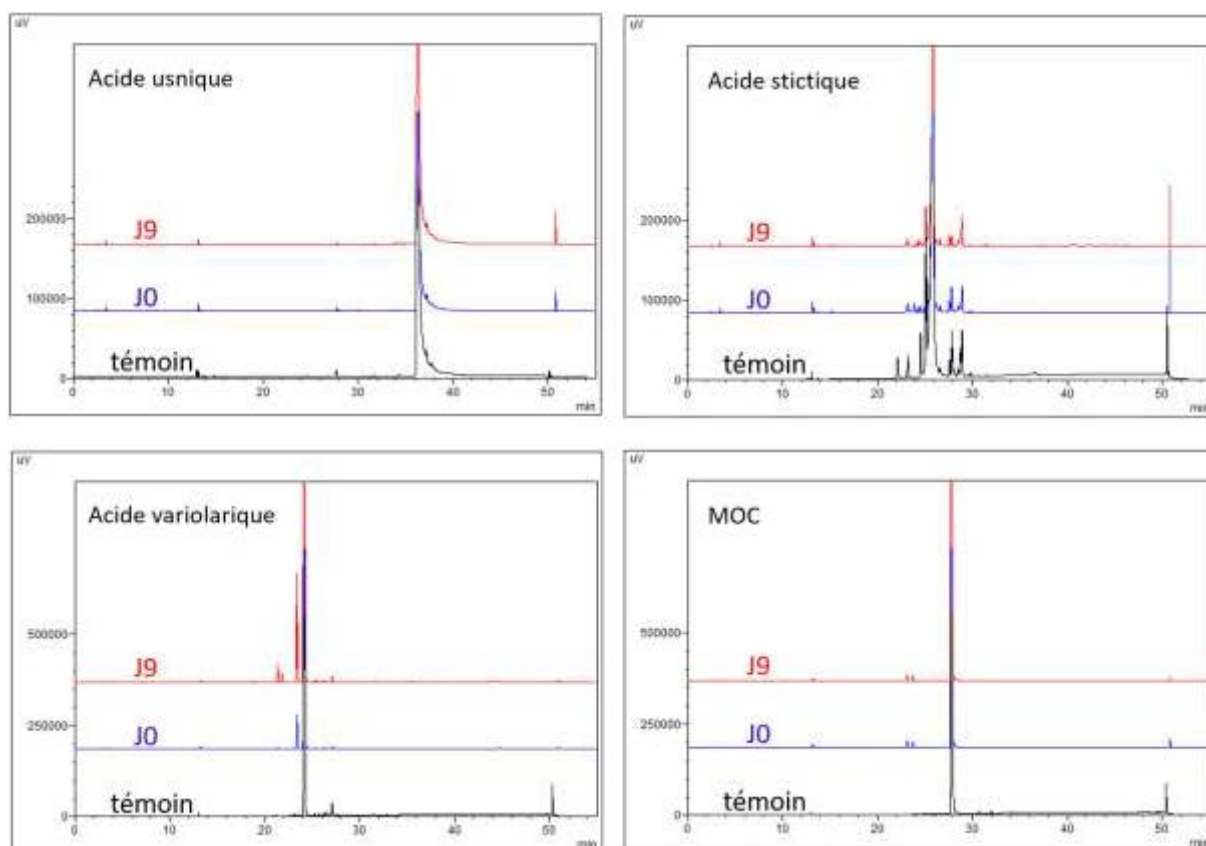


Figure 117 : Chromatogrammes des essais de stabilité de l'acide usnique, de l'acide stictique, de l'acide variolique et du MOC dans les conditions opératoires à J0 et J9 en comparaison avec des témoins. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

Les composés lichéniques sélectionnés pour l'étude de biotransformation par des bactéries associées aux lichens sont au final l'acide usnique et le MOC.

b. Composés synthétiques

Des travaux de synthèse d'alcaloïdes naturels ont été réalisés, ils sont décrits dans la partie 3 de ce manuscrit. L'étude de la biotransformation de certains composés synthétiques, notamment des intermédiaires de la synthèse des alcaloïdes, a été envisagée pour compléter l'étude sur le bagage enzymatique de nos souches bactériennes. Il est intéressant d'observer la capacité bactérienne à augmenter la diversité chimique. Pour cela nous avons sélectionné deux intermédiaires de synthèse que nous avons en quantité suffisante. L'un d'entre eux est un dérivé cyano, précurseur de la bgugaine, sa métabolisation pourrait mettre en évidence des nitrilases. Le second est un dérivé polyphénolique de type stilbène, précurseur de la tylophorine (Figure 118).

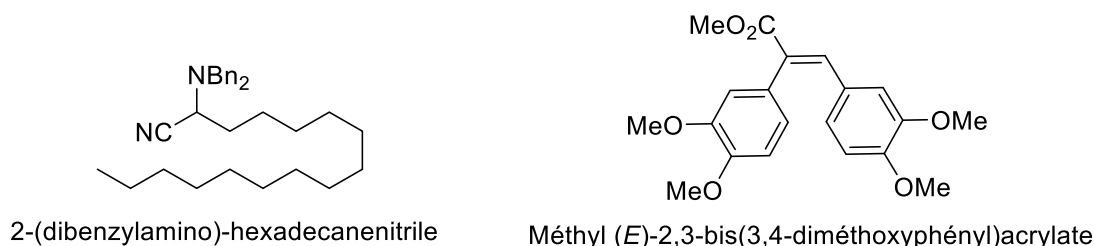


Figure 118 : Composés synthétiques envisagés pour l'étude de biotransformation

De la même manière que pour les composés lichéniques, ces composés synthétiques ont été dissous dans le DMSO et dilués à 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL et 1 mg/mL. Les échantillons ont ensuite été incubés (25°C, 110 rpm) et ils ont été analysés à J0, J1, J3, J6 et J9 par HPLC/MS.

Le précurseur cyano de la bbugaine, initialement pur montre de nombreux composés de dégradation dès J0 dans le tampon phosphate. Le nombre de composé augmente avec le temps et le précurseur de départ est rapidement consommé. De ce fait, il n'a pas été utilisé pour l'étude de biotransformation.

Le précurseur de la tylophorine également pur au départ, se dégrade dès le premier jour en un produit de dégradation avec un temps de rétention de 30,2 min. Le composé n'a donc pas non plus été retenu pour la suite des travaux (Figure 119).

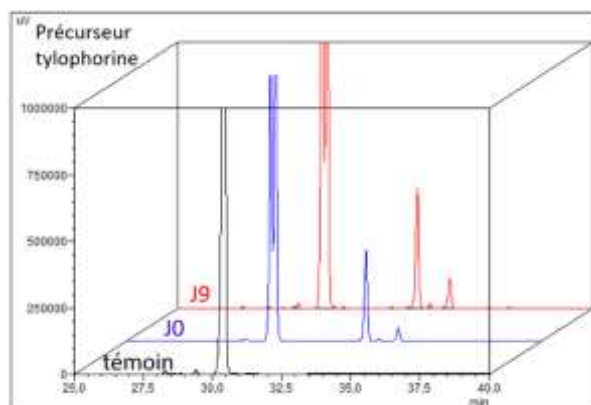


Figure 119 : Chromatogrammes des essais de stabilité du précurseur de la tylophorine dans les conditions opératoires à J0 et J9 en comparaison avec le témoin. HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

3. Résultats des essais de biotransformation

Pour cette étude nous avons utilisé un protocole proche de celui de l'équipe du Dr D. Buisson [236].

Les composés lichéniques ont été solubilisés dans le DMSO puis dilués dans le tampon phosphate à pH 7 à trois différentes concentrations : 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL et 0,5 mg/mL. Les trois souches bactériennes sélectionnées ont étéensemencées dans leur milieu de culture puis elles ont été

incubées pendant environ 7 jours, jusqu'à ce que la phase stationnaire de croissance ait été atteinte. A ce moment le milieu de culture est remplacé par une solution de tampon phosphate contenant un composé lichénique. Les échantillons ont ensuite été analysés à J0, J2, J4, J7 et J9, J0 correspondant au premier jour d'incubation dans le tampon phosphate. Après extraction à l'acétate d'éthyle, les extraits sont analysés par HPLC/MS (Figure 120).

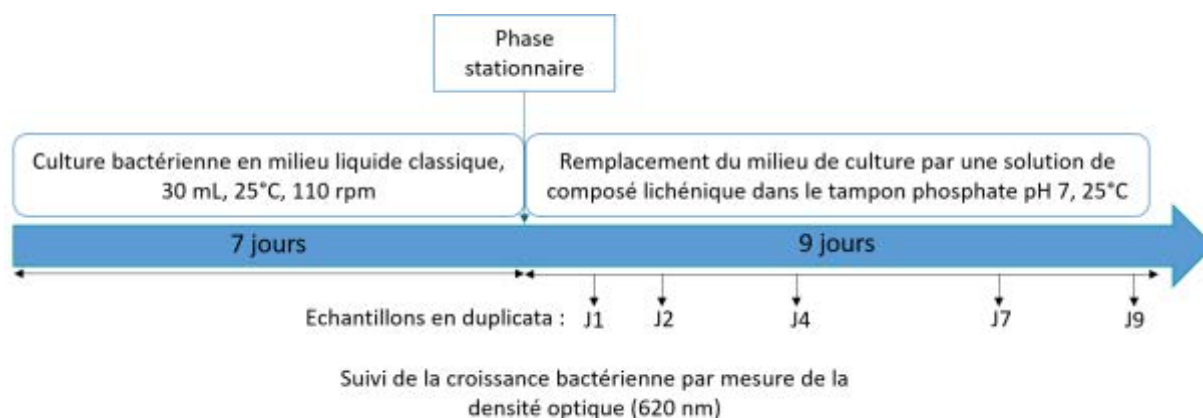


Figure 120 : Schéma récapitulatif de l'essai de biotransformation

a. Biotransformation de l'acide (+)-usnique

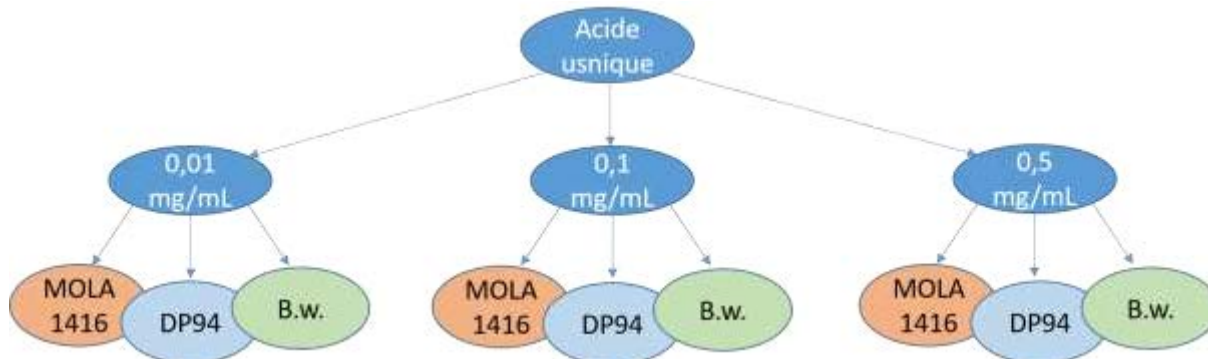


Figure 121 : Biotransformation de l'acide usnique

a-1. MOLA1416

A une concentration d'acide usnique de 0,01 mg/mL, un seul composé apparaît sur les chromatogrammes, le composé **H**. Ce dernier est plus important en proportion à J9 qu'à J1, il est donc produit tout au long de l'étude de biotransformation (Tableau 35).

A la concentration de 0,1 mg/mL, nous observons plusieurs pics de forte intensité sur les chromatogrammes, mais un seul augmente en proportion entre J1 et J9, il s'agit du même composé **H** (avec un λ_{max} à 290 nm) (Tableau 35).

Enfin, en présence d'acide usnique à 0,5 mg/mL, nous notons la présence de deux composés plus intenses à J9 qu'à J1. Il s'agit des composés **E** de λ_{max} à 280, 360 et plus intense à 530 nm et **H** précédemment décrit. Il est à noter que **H** apparaît à toutes les concentrations (Figure 122 et tableau 35).

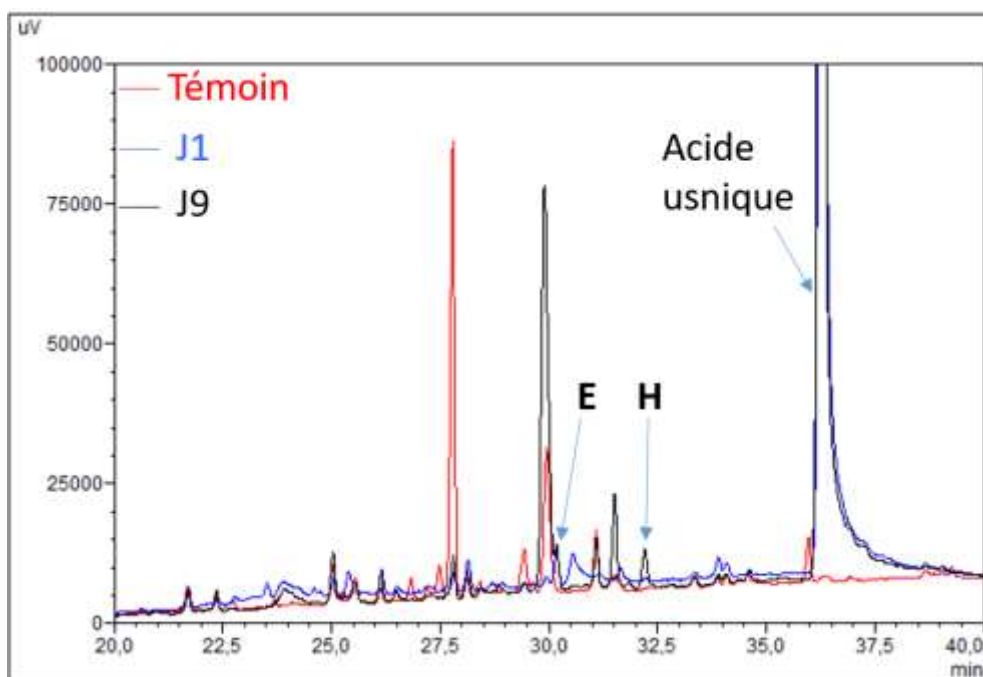


Figure 122 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à 0,5 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **MOLA1416** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 μm , gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

Le spectre de masse en mode négatif de l'acide usnique présente des pics de $m/z = 343$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$), $m/z = 709$ ($[\text{2M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$) et $m/z = 328$ soit 343-15 (perte de CH_3). Le spectre de masse du composé **E** présente un pic majoritaire de $m/z = 361$. Le composé **H** présente un ion de $m/z = 386$, c'est le même composé qui a été détecté lors de l'étude de l'effet de l'acide usnique sur la croissance bactérienne. L'analyse en spectrométrie de masse haute résolution des échantillons donne une masse de 386,1262 pour l'ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ du composé **H**, correspondant à une formule brute de $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7\text{N}$ soit l'ajout de $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ par rapport à l'acide usnique ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$). Cette formule correspond à l'addition d'un groupement éthanamine sur l'acide usnique. Ce phénomène a préalablement été décrit par l'équipe de Didier Buisson sur un sesquiterpène marin, l'ilimaquinone [237].

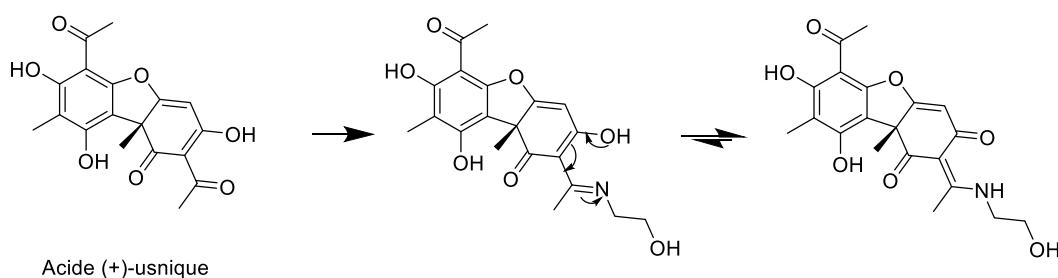


Tableau 35 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de **MOLA1416** en présence d'acide usnique, ND : non détecté

Composé	Temps de rétention (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL
E	30,2	280, 360, 530	ND	ND	Augmentation entre J1 et J9
H	32,4	280	Augmentation entre J1 et J9	Augmentation entre J1 et J9	Augmentation entre J1 et J9

a-2. DP94

En présence d'acide usnique à 0,01 mg/mL, nous observons dès J1, deux composés présents en forte proportion : le composé **I** avec un $\lambda_{\max}$ à 347 nm et le composé **J** ($\lambda_{\max}$ = 291 nm). A J9 cependant, ces pics diminuent en intensité et deux composés sont détectés en faible proportions, le composé **E**, précédemment observé avec **MOLA1416** et le composé **C** (Tableau 36).

En présence d'acide usnique à 0,1 mg/mL, deux composés **B** et **C** sont plus intenses à J9 qu'à J1. D'autres composés sont présents sans qu'ils n'augmentent en intensité après le J1, c'est notamment le cas du composé **I** (Tableau 36).

A la concentration de 0,5 mg/mL, deux composés ont augmenté en intensité entre J1 et J9 : le composé **A** de $\lambda_{\max}$ = 273 nm et le composé **G** de $\lambda_{\max}$ = 292 nm. Le composé **B** retrouvé de manière intense à la concentration de 0,1 mg/mL est présent en très faible proportion (tableau 36). On constate également que la proportion des composés **B**, **C**, **E** et **I** diminue au cours du temps témoignant de leur consommation (Figure 123, tableau 36).

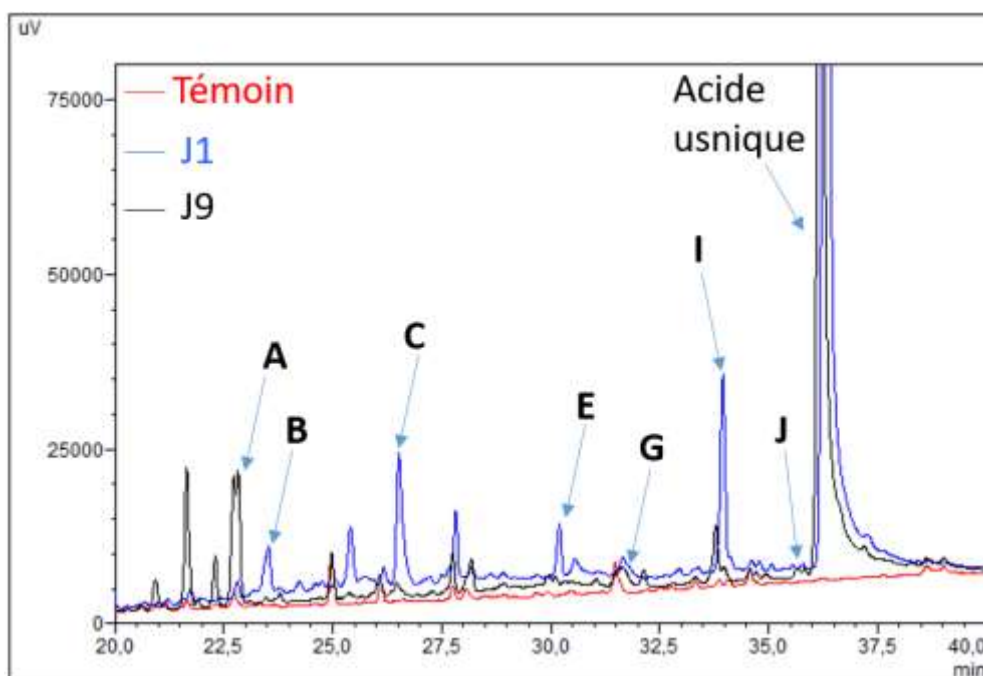


Figure 123 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à 0,5 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **DP94** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 μ m, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

Concernant les données de masse, le composé **I** n'est pas ionisé dans les conditions utilisées et les spectres de masse du composé **B** et **C** présentent des ions respectivement à $m/z = 343$ et $m/z = 333$.

Tableau 36 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de **DP94** en présence d'acide usnique, ND : Non détecté

Composé	Temps de rétention (min)	λ_{max} (nm)	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL
A	22,8	273	ND	ND	Augmentation entre J1 et J9
B	23,7	284	ND	Augmentation entre J1 et J9	Diminution à J9
C	26,6	292	Présent J9		
E	30,5		Présent J9	Présent	Présent J9
G	32,1		ND	ND	Augmentation entre J1 et J9
I	34,2	288 et 372	Diminution à J9	Présent	Présent
J	36,4	304		Présent J9	Présent J9

a-3. *B. weihenstephanensis*

Sur le chromatogramme obtenu en HPLC de l'échantillon de *B. weihenstephanensis* mis en culture en présence d'acide usnique à 0,01 mg/mL, nous observons dès J1 la présence de certains composés dont la proportion augmente fortement à J9. C'est le cas notamment du composé **H** ($\lambda_{\text{max}} = 294$ nm). Les autres composés sont présents en faible quantité dès J1 et les composés **C** et **D** n'apparaissent qu'à J9 (Figure 124, tableau 37).

A la concentration de 0,1 mg/mL, trois composés se démarquent de par leur intensité : le composé **E**, le composé **F** qui absorbe à 280 nm et qui est très intense et enfin le composé **I** de λ_{max} à 350 nm. A J9 cependant, le composé **E** a largement diminué en intensité et à ce temps de rétention apparaissent désormais 3 composés d'intensité similaire. Le composé **I** a lui augmenté à J9. On ne retrouve plus à cette concentration le composé **H** que l'on retrouvait de manière intense à la concentration de 0,01 mg/mL (Tableau 37).

Enfin à 0,5 mg/mL d'acide usnique, nous observons principalement deux composés présents en proportion plus importante à J9 qu'à J1 et correspondant à **C** et **E** précédemment décrits (Tableau 37). Les composés **F** et **I** sont présents en faible proportion.

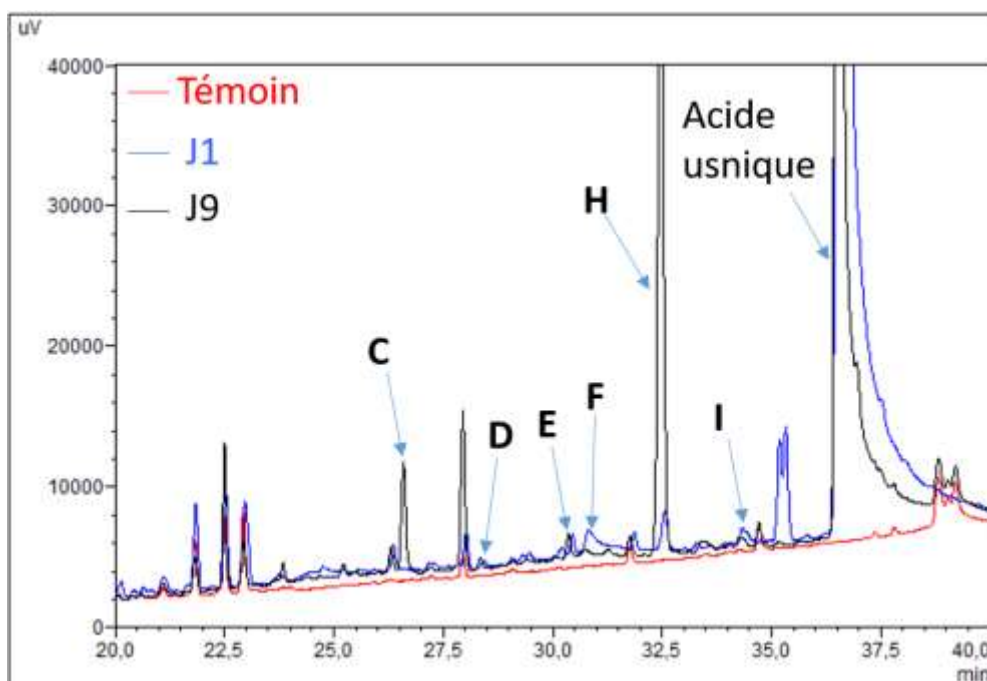


Figure 124 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à 0,01 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche *B. weihenstephanensis* et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

Les composés **C** et **D** ne sont pas ionisés et le composé **H** présente un ion de $m/z = 386$ et un deuxième de $m/z = 371$ soit $386-15$ correspondant à une perte de CH_3 .

Tableau 37 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de *B. weihenstephanensis* en présence d'acide usnique, ND : Non détecté

Composé	Temps de rétention (min)	λ_{max} (nm)	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL
C	26,6	288 et 372	Apparition à J9	ND	Augmentation entre J1 et J9
D	28,4	304		ND	ND
E	30,2		Augmentation entre J1 et J9	Diminution entre J1 et J9	Augmentation entre J1 et J9
F	30,6	280	Présent		Présent
H	32,5	294	Présent dès J1 augmentation au cours du temps	ND	ND
I	34,1	350	Présent	Augmentation entre J1 et J9	Présent à J1

Les différents ions détectés lors de l'étude de biotransformation sont rassemblés dans le tableau 38 qui suit. Lorsqu'un composé est détecté un signe (+) est indiqué dans le cas contraire c'est un signe (-) et la flèche indique une augmentation de la concentration du composé entre J1 et J9.

Tableau 38 : Récapitulatif des composés détectés lors de l'essai de biotransformation de l'acide usnique

Composés et temps de rétention (min)	MOLA1416			DP94			B. w.		
	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL
A : 22,8	-	-	-	-	-	+↑	-	-	-
B : 23,7	-	-	-	-	+↑	+	-	-	-
C : 26,6	-	-	-	+	+↑	+	+	-	+↑
D : 28,4	-	-	-	-	-	-	+	-	-
E : 30,2	-	-	+↑	+	+	+	+↑	+	+↑
F : 30,6	-	-	-	-	-	-	+	+	+
G : 32,1	-	-	-	-	-	+↑	-	-	-
H : 32,4	+↑	+↑	+↑	-	-	-	+↑	-	-
I : 34,2	-	-	-	+	+	+	+	+↑	+
J : 36,4	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Ce tableau montre que l'acide usnique n'est pas métabolisé de la même manière suivant la souche bactérienne étudiée. Par exemple, nous constatons que la souche **MOLA1416** a un potentiel de biotransformation plus faible que les deux autres souches. Certains composés sont communs aux trois souches bactériennes témoignant la présence d'enzymes communes aux trois bactéries. Le composé **E** est par exemple retrouvé dans nos trois souches.

Tableau 39 : Analyse par spectrométrie de masse en mode négatif des principaux composés détectés

Composé bioconverti	Composés et temps de rétention (min)	Ions observés (m/z) en spectrométrie de masse (ESI -)
	Acide usnique : 36,5	709 [2M+Na-2H] ⁻ 343 [M-H] ⁻ 328 soit [M-H] ⁻ - CH ₃
Acide usnique	B : 23,7	427 343 249
Acide usnique	C : 26,6	333
Acide usnique	E : 30,2	361
Acide usnique	H : 32,4	386 [M-H] ⁻ 371 soit [M-H] ⁻ - CH ₃ 386 → 343 (UA) + 43

b. Biotransformation du MOC

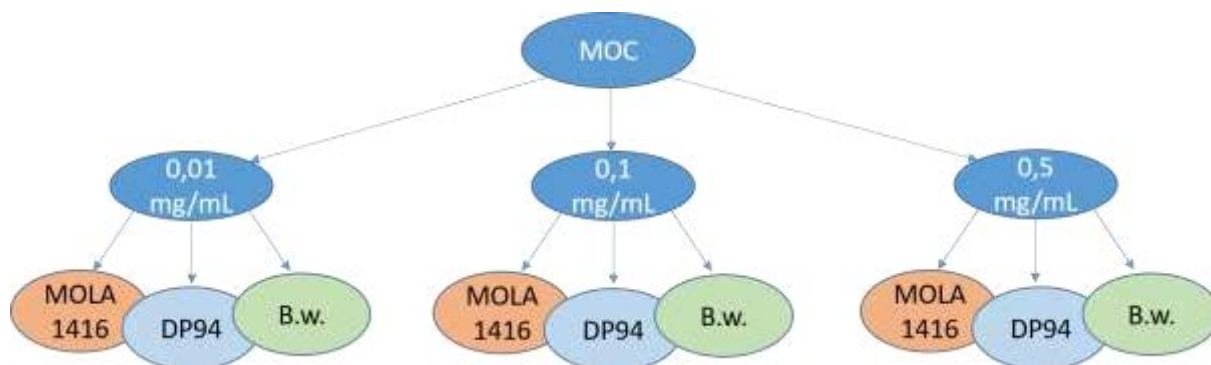


Figure 125 : Biotransformation du MOC

b-1. MOLA1416

En présence de MOC à 0,01 mg/mL, quatre composés se démarquent dont un de forte intensité, le composé **G'** qui absorbe à 265 et 408 nm. On détecte également les composés **D'**, **F'** et **J'** avec des λ_{max} respectives de 269 nm, 315nm et 524 nm. La production des composés **F'** et **G'** augmente entre J1 et J9 alors que le composé **D'** disparaît des chromatogrammes. A J9, deux composés de $\lambda_{\text{max}} = 306$ nm (**A'** et **B'**) apparaissent (Figure 126, tableau 40).

A la concentration de 0,1 mg/mL, nous notons également la présence de quatre composés en forte proportion : les composés **C'**, **D'** ($\lambda_{\text{max}} = 315$ nm), **F'** et **G'** ($\lambda_{\text{max}} = 269$ et 410 nm). Parmi ces composés, seuls les composés **F'** et **G'** voient leur intensité augmenter entre le J1 et le J9 (Tableau 40).

Enfin, en présence de MOC à 0,5 mg/mL, on observe la présence des mêmes quatre composés qu'à 0,1 mg/mL (**C'**, **D'**, **F'** et **G'**). De la même manière seuls les composés **F'** et **G'** augmentent entre J1 et J9 (Tableau 40).

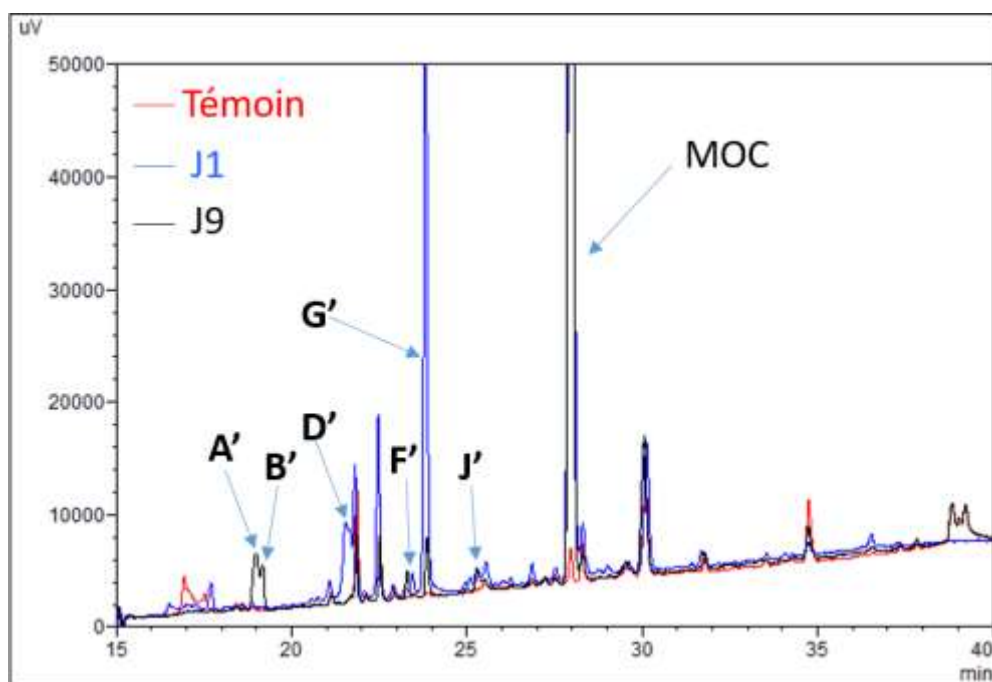


Figure 126 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,01 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **MOLA1416** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

En spectrométrie de masse, le **MOC** présente un ion à $m/z = 163$. Les composés **A'**, **B'**, **C'** et **D'** ne sont pas ionisés. Le composé **F'** présente plusieurs ions à $m/z = 181$ ($[F'-H]^-$), $m/z = 385$ ($[2F'+Na-2H]^-$) et $m/z = 137$. Le composé **G'** présente deux pics à $m/z = 209$ et $m/z = 181$ soit $209 - 28$ pouvant représenter une perte d'un groupement CO. Le spectre de masse du composé **J'** présente un ion pseudomoléculaire de $m/z = 179$ et un autre ion de $m/z = 151$.

Tableau 40 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de **MOLA1416** en présence de MOC, ND : non détecté

Composé	Temps de rétention (min)	λmax (nm)	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL
A'	18,9	306	Apparition à J9	ND	ND
B'	19,1	306		ND	ND
C'	20,9		ND	Diminution entre J1 et J9	Présent à J1
D'	21,6	315	Présent à J1	Présent J1 à J9	
F'	23,2	269, 410	Augmentation entre J1 et J9		
G'	23,9	265, 408	Augmentation entre J1 et J9		
J'	25,4	369, 524	Augmentation entre J1 et J9	ND	ND

b-2. DP94

En présence de MOC à 0,01 mg/mL, nous observons de nombreux composés de faible intensité à J1 et de divers profils UV, ce sont les composés **A'** à **G'**. Certains restent présents en faible proportion (**A'**, **B'**, **C'**, **E'** et **G'**) alors que d'autres disparaissent à J9 (**D'** et **F'**) (Tableau 41).

A la concentration de 0,1 mg/mL, il y a encore plus de composés présents sur les chromatogrammes (11). Certains sont présents en faible quantité tout le long de l'étude (**C'**, **D'** et **E'**) tandis que d'autres voient leur production augmentée entre J1 et J9 (**A'**, **B'**, **F'** et **G'**). Enfin, quatre composés ne sont détectés qu'à J9 (**H'**, **I'**, **K'** et **M'**) (Figure 127, tableau 41). Les $\lambda_{\max}$ des deux composés les plus représentés ont été déterminées : le **F'** à 267 et 300 nm et le **G'** à 268 et 409 nm.

En présence de MOC à 0,5 mg/mL, nous retrouvons les mêmes composés que ceux détectés à 0,01 mg/mL. La production des composés **A'**, **B'**, **F'** et **G'** est augmentée au fur et à mesure du temps alors que les autres restent faiblement détectés (Tableau 41).

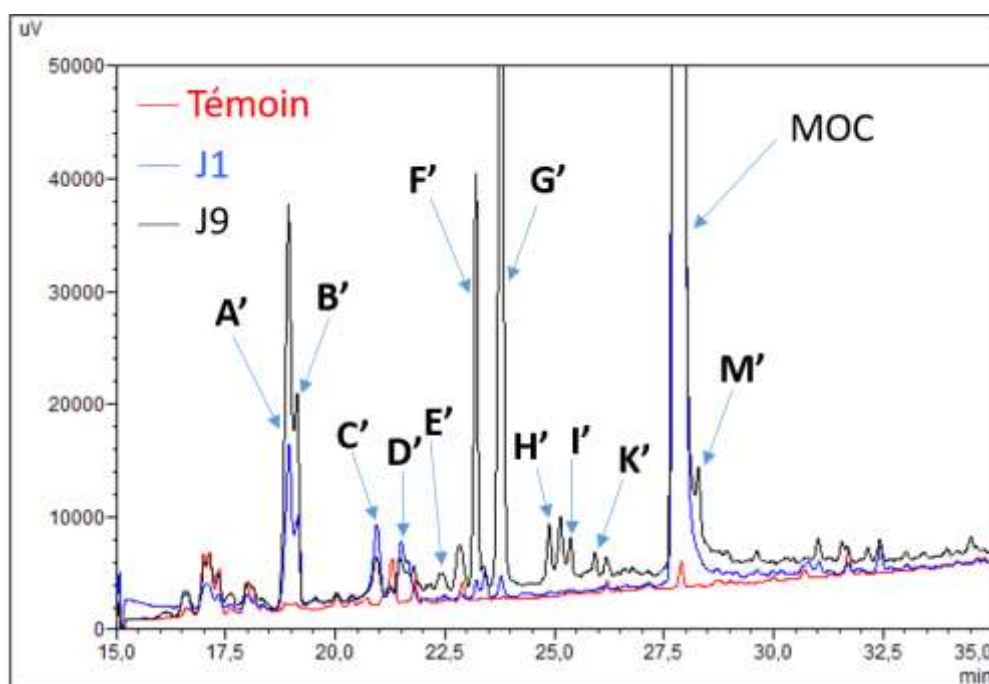


Figure 127 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,1 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **DP94** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 μ m, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

En spectrométrie de masse, le composé **D'** présente plusieurs pics à $m/z = 361$, $m/z = 318$ (soit $361 - 43$) et $m/z = 275$ (soit $318 - 43$). Les composés **F'** et **G'** présentent les mêmes spectres de masse que précédemment décrit. Les autres composés détectés ne s'ionisent pas dans nos conditions d'analyse.

Tableau 41 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de **DP94** en présence de MOC, ND : non détecté

Composé	Temps de rétention (min)	λ_{max} (nm)	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL
A'	18,9	306	Présent	Augmentation entre J1 et J9	Augmentation entre J1 et J9
B'	19,1	306	Présent		
C'	20,9	295	Faiblement présent	Présent	Faiblement présent J1
D'	21,6	312	Présent J1 puis diminue	Présent	Présent
E'	22,4		Faiblement présent	Faiblement présent	Diminution entre J1 et J9
F'	23,2	267, 300	Présent J1 Disparition à J9	Augmentation entre J1 et J9	Augmentation entre J1 et J9
G'	23,8	268, 409	Faiblement présent		
H'	24,9		ND	Présent J9	ND
I'	25,3		ND		ND
K'	25,9		ND		ND
M'	28,3		ND		Présent J1

b-3. *B. weihenstephanensis*

En présence de MOC à 0,01 mg/mL, nous ne retrouvons que les composés **A'**, **B'** et **G'** dès J1, le composé **I'** est également présent mais en faible quantité. Un nouveau composé est détecté, le composé **N'**, celui-ci est présent dès J1 et disparaît par la suite (Tableau 42).

A la concentration de 0,1 mg/mL, dès J1 les composés **C'**, **D'**, **F'**, **G'**, **H'** et **N'** sont détectés. La proportion de **F'**, **G'** et **H'** augmente jusqu'à J9 alors que celle des autres composés reste stable. A J9 on peut également détecter les composés **I'**, **K'**, **L'** et **M'** (Tableau 42).

Enfin, en présence de MOC à 0,5 mg/mL, on retrouve les mêmes composés qu'à la concentration de 0,1 mg/mL dès le premier jour et **E'** et **I'** sont détectés en plus. De la même manière **F'**, **G'**, **H'** et **I'** augmentent entre J1 et J9 ce qui montre un profil de transformation similaire à ces deux concentrations de produit lichénique (Figure 128 et Tableau 42).

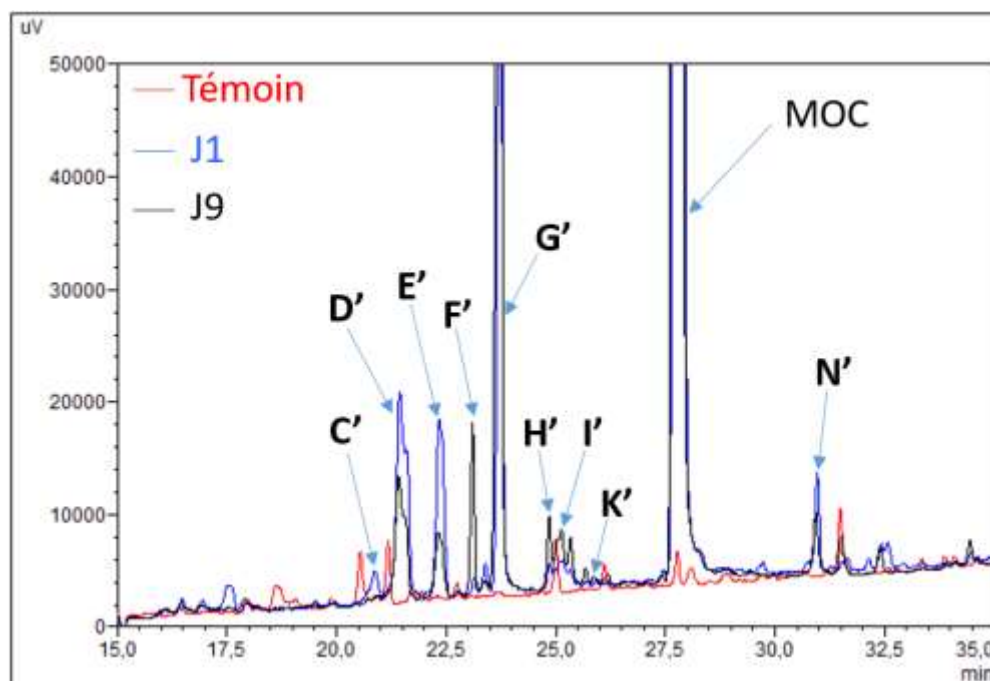


Figure 128 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,5 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche *B. weihenstephanensis* et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

En spectrométrie de masse, le composé **E'** présente deux pics à une valeur de $m/z = 393$ et $m/z=361$. Les composés **D'**, **F'**, **G'**, **H'** et **J'** s'ionisent de la même manière que précédemment décrit par contre les autres composés ne s'ionisent pas.

Tableau 42 : Données chromatographiques des composés détectés après analyse des cultures de *B. weihenstephanensis* en présence de MOC, ND : non détecté

Composé	Temps de rétention (min)	λ_{max} (nm)	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL
A'	18,9	306	Présent J1 et J9	ND	ND
B'	19,1	306	Présent J1 et J9	ND	ND
C'	20,9	270, 315	ND	Présent J1 et J9	Faible à J1
D'	21,6	270, 315	ND	Présent J1 et J9	Présent J1 et J9
E'	22,4	270, 315	ND	ND	Présent J1 et J9
F'	23,2		ND	Augmentation entre J1 et J9	Augmentation entre J1 et J9
G'	23,8	270, 403	Diminution entre J1 et J9		
H'	24,9		ND		
I'	25,2	317	Faiblement présent	Présent à J9	
K'	25,9		ND	Présent à J9	Faible à J9
L'	26,8		ND	Présent à J9	ND
M'	28,3		ND	Faiblement présent à J9	ND
N'	30,9		Présent à J1	Présent J1 et J9	Présent J1 et J9

Les différents ions détectés lors de l'étude de biotransformation sont rassemblés dans le tableau suivant. Lorsqu'un composé est détecté un signe (+) est indiqué dans le cas contraire c'est un signe (-) et la flèche indique une augmentation de la concentration du composé entre J1 et J9.

Tableau 43 : Récapitulatif des composés détectés lors de l'essai de biotransformation du MOC

Composés et temps de rétention (min)	MOLA1416			DP94			B. w.		
	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL	0,01 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL
A' : 18,9	+	-	-	+	+↑	+↑	+	-	-
B' : 19,1	+	-	-	+	+↑	+↑	+	-	-
C' : 20,9	-	+	+	+	+	+	-	+	+
D' : 21,6	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E' : 22,4	-	-	-	+	+	+	-	-	+
F' : 23,2	+↑	+↑	+↑	+	+↑	+↑	-	+↑	+↑
G' : 23,8	+↑	+↑	+↑	+	+↑	+↑	+	+↑	+↑
H' : 24,9	-	-	-	-	+	-	-	+↑	+↑
I' : 25,3	-	-	-	-	+	-	+	+	+↑
J' : 25,5	+↑	-	-	-	-	-	-	-	-
K' : 25,9	-	-	-	-	+	-	-	+	+
L' : 26,8	-	-	-	-	-	-	-	+	-
M' : 28,3	-	-	-	-	+	-	-	+	-
N' : 30,9	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Dans un premier temps, nous constatons que la présence de MOC provoque l'apparition de plus de composés (14) qu'en présence d'acide usnique (10). Les principaux produits de transformation du MOC sont **F'** et **G'** et ils sont retrouvés dans les trois souches bactériennes. De la même manière que pour l'acide usnique on constate une transformation différente du MOC suivant la souche utilisée. La souche **DP94** par exemple est celle avec laquelle on retrouve le plus de produits de transformation. Comme dans le cas de l'acide usnique, c'est la souche **MOLA1416** qui a le plus faible potentiel de biotransformation.

Tableau 44 : Analyse par spectrométrie de masse en mode négatif des principaux composés détectés

Composé bioconverti	Composés et temps de rétention (min)	Ions observés (m/z) en spectrométrie de masse (ESI -)	Masse haute résolution et formule brute
	MOC : 27,8	163 [M-H] ⁻ 181 [M-H + H ₂ O] ⁻ 119 soit [M-H] ⁻ - 44 : perte de CO ₂	MOC : C ₁₀ H ₁₂ O ₄
MOC	D' : 21,6	361 [D'-H] ⁻ 318 soit [D'-H] ⁻ - 43 275 soit 318 - 43 : perte de COCH ₃ ou C ₃ H ₈	
MOC	E' : 22,4	361 393	
MOC	F' : 23,2	181 [F'-H] ⁻ 137 soit [F'-H] ⁻ - 44 : perte de CO ₂ 385 [2F'+Na-2H] ⁻	181,0550 [F'-H] ⁻ : C ₉ H ₉ O ₄ MOC - CH ₂
MOC	G' : 23,8	209 [G'-H] ⁻ 181 soit [G'-H] ⁻ - CO	209,0460 [G'-H] ⁻ : C ₁₀ H ₉ O ₅ MOC + H ₂ O
MOC	H' : 24,9	227 209 (perte de H ₂ O) 419	227,0564 [H'-H] ⁻ : C ₁₀ H ₁₁ O ₆ MOC + O ₂
MOC	J' : 25,5	179 [M-H] ⁻ 151 soit [M-H] ⁻ - CO	179,0387 [J'-H] ⁻ : C ₉ H ₇ O ₄ MOC - CH ₄

D'après les données de masse haute résolution, les modifications observées sur le MOC semblent correspondre aux différentes réactions enzymatiques décrites précédemment (hydratation, oxydation, déméthylation). Cependant pour confirmer les structures de ces composés, leur isolement est nécessaire et les essais ont été réalisés sur des petites quantités qui ne sont pas suffisantes pour réaliser un isolement et une analyse par RMN 2D.

D. Conclusion

Les travaux ici présentés démontrent les propriétés antibactériennes de l'acide usnique sur les souches bactériennes à Gram-positif isolées à partir de lichens. Ils permettent également de constater que ce composé a un effet sur le métabolisme bactérien, surtout pour la souche *Streptomyces cyaneofuscatus* (**MOLA1488**) elle-même productrice d'acide usnique. Étonnamment, l'autre Actinobactérie (**DP94**) ne montre aucune modification de son métabolisme suite à l'addition d'acide usnique dans son milieu de culture.

Les essais de biotransformation ont montré que les trois souches bactériennes étudiées ont un potentiel de biotransformation. Celui-ci varie selon la souche et selon le composé biotransformé. Pour confirmer que les composés repérés en HPLC/MS sont bien des dérivés des composés lichéniques nous avons analysé les échantillons par HPLC/MS/MS au laboratoire BioCis de la faculté de Chatenay-Malabry. Les données sont actuellement en cours de traitement par la plateforme GNPS pour établir des réseaux moléculaires autour des composés lichéniques étudiés.

Scène 3 : Matériels et méthodes

A. Souches étudiées

1. *DP94*

La souche **DP94** utilisée pour ces études est la même que celle précédemment décrite dans le Chapitre 1.

2. *MOLA1416*

La souche **MOLA1416** a été isolée à partir du lichen *Lichina pygmaea*. Le lichen a été récolté à la Pointe de la Houssaye (Erquy, Bretagne, France) (48°37'47.9" N, 2°28'31.55" W) en Avril 2012. Le lichen a été identifié par Martin Grube. Après un rinçage sur le terrain à l'eau de mer stérile, il a de nouveau été lavé à plusieurs reprises par cette eau stérile au laboratoire (extrait de lavage). Il a ensuite été broyé et associé à la même solution (homogénat). Ces solutions ont ensuite été ensemencées sur deux milieux : MA (marine agar) et AIA (Actinomycetes isolation Agar) en boîte de Pétri supplémenté en acide nalidixique et amphotéricine B. Des repiquages ont ensuite été effectués jusqu'à l'obtention de colonies pures. La souche a été référencée sous le nom **MOLA1416** au sein de la collection du laboratoire. Une première identification en 2013 par extraction de l'ARN 16S et comparaison avec les données du serveur EzTaxon a montré 91,90% de similarité avec la souche *Hoeflea phototrophica*. Une seconde identification réalisée en 2017 par Laurent Intertaglia de l'observatoire océanologique de Banyuls-sur-mer a permis une extraction d'un plus grand nombre de paires de bases d'ARN 16S et une nouvelle identification à 93,60% d'identité avec les espèces *Chelativorans intermedius* et *Mycoplana ramosa*. La souche a été conservée dans le milieu MB (Marine Broth) avec 50% v/v de glycérol ou 5% v/v de DMSO à -80 °C et référencée comme **MOLA1416** (CORINT collection).

3. *MOLA1488*

La souche **MOLA1488** a été isolée à partir du lichen *Lichina confinis* récolté au même endroit que *Lichina pygmaea* précédemment décrit. Le lichen a été traité selon le même protocole et la souche bactérienne **MOLA1488** a été obtenue à partir de l'homogénat sur milieu AIA. L'identification de la souche réalisée en 2013 par extraction de l'ARN 16S et comparaison avec les données du serveur EzTaxon a montré 100% de similarité avec la souche *Streptomyces cyaneofuscatus*. La souche a été conservée dans le milieu LB (Lysogeny Broth) avec 50% v/v de glycérol ou 5% v/v de DMSO à -80 °C et référencée comme **MOLA1488** (CORINT collection).

4. *Bacillus weihenstephanensis*

La souche *Bacillus weihenstephanensis* a été isolée à partir du lichen *Peltigera hymenina*. Le lichen a été récolté à Huelgoat (Bretagne, France) (48°21'57" N, 3°44'47" W). Le thalle lichénique a été rincé avec de l'eau « DNase, RNase, protease-free » puis découpé en petits morceaux et ceux-ci ont été

déposés sur une boîte de Pétri contenant du milieu TY agar. Après incubation à 25 °C pendant deux semaines, des repiquages ont été effectués jusqu'à l'obtention de colonies pures. La souche bactérienne a été identifiée par extraction de l'ARNr 16S et comparaison avec les données du serveur EzTaxon a montré 100% de similarité avec la souche *Bacillus weihenstephanensis*. La souche a été conservée dans le milieu TY (Tryptone Yeast) avec 50% v/v de glycérol ou 5% v/v de DMSO à -80 °C.

B. Milieux de culture utilisés

Quatre milieux de culture ont été utilisés :

- ISP2 (International Streptomyces Project 2) : extrait de levure 4 g/L, extrait de malt 10 g/L et glucose 4 g/L. Pour la préparation des boîtes de Pétri 20 g/L d'agar ont été ajoutés.
- TY (Tryptone Yeast) : tryptone 16 g/L, extrait de levure 10 g/L et chlorure de sodium 5 g/L. Pour les boîtes de Pétri 15 g/L d'agar sont ajoutés.
- LB (Lysogeny Broth) : peptone 5 g/L, chlorure de sodium 5 g/L et extrait de levure 3 g/L. Pour obtenir de la gélose 15 g/L sont ajoutés.
- MAI (Marine Broth supplémenté en iode) : 37,4 g/L d'un milieu déshydraté commercialement disponible, le marine broth (Difco[®] 2216, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) supplémenté par 5 mg/L de iodure de sodium (NaI).

Les poudres sont pesées puis diluées dans le volume adéquat d'eau ultra-pure et le tout est stérilisé à 121°C pendant 20 min à l'autoclave (Advantage Lab[®], modèle AL02-03-100).

C. Préparation des pré-cultures

De la même manière que dans le chapitre 1, les pré-cultures ont été préparées par ensemencement de 30 mL de milieu (ISP2, TY, LB ou MB suivant la souche concernée) avec des colonies pures récupérées sur boîte de Pétri ou par addition de quelques microlitres d'une culture cryoconservée à -80 °C. Elles sont ensuite incubées à 25 °C à 110 rpm.

D. Mise en culture des échantillons

1. Effets de l'acide usnique sur la croissance et le métabolisme

Pour réaliser l'étude de l'effet de l'acide usnique, les souches bactériennes (**DP94**, **MOLA1416** et **MOLA1488**) ont été ensemencées dans 30 mL de milieu (TY, MAI et LB respectivement) par addition de 300 µL de pré-culture. Chaque culture a été réalisée en duplicata, soit 4 tubes d'échantillons témoins contenant les bactéries seules, 4 tubes contenant la culture bactérienne additionnée de

DMSO et 4 tubes contenant la culture bactérienne avec l'acide usnique dissous dans le DMSO. Ainsi, 12 tubes ont été ensemencés par souche bactérienne.

L'acide usnique est ajouté à une concentration de 0,1 mg/mL dans les cultures bactériennes. Pour préparer 12 tubes de culture avec de l'acide usnique (4 tubes par souche x 3 souches bactériennes), 36 mg d'acide usnique sont dissous dans 6 mL de DMSO puis 500 µL de cette solution sont ajoutés dans chaque tube de culture.

Tableau 45 : Constitution des échantillons de culture pour l'étude de l'effet de l'acide usnique

	Témoin Bactérie seule	Témoin Bactérie + DMSO	Tube contenant bactérie + acide usnique dans le DMSO
Milieu de culture	30 mL	30 mL	30 mL
Pré-culture	300 µL	300 µL	300 µL
Acide usnique	-	-	0,1 mg/mL (3 mg)
DMSO	-	500 µL	500 µL

2. Etude de stabilité

Pour effectuer les essais de stabilité des composés envisagés pour l'étude de biotransformation, les composés sont dissous dans le DMSO puis cette solution est diluée dans du tampon phosphate à pH 7 stérile. Le tampon phosphate est préparé par mélange de 780 mL d'une solution de KH_2PO_4 à 9,08 g/L et de 1,22 L d'une solution de Na_2HPO_4 à 9,47 g/L pour 2 L de solution. Le pH est réajusté à 7 après agitation. La solution est ensuite stérilisée à 121 °C à l'autoclave.

Les composés étudiés dissous dans le DMSO sont ajoutés dans le tampon phosphate pour obtenir des solutions à 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL et 1 mg/mL. Chaque solution est finalement répartie dans 10 tubes (5 jours de prélèvements en duplicata) de 50 mL (30 mL par tube) et les échantillons sont mis à incuber à 25 °C, 110 rpm.

3. Etude de bioconversion

Chaque souche bactérienne (**DP94**, **MOLA1416** et *B. weihenstephanensis*) est mise en culture dans un milieu qui lui est adapté (TY, MAI et ISP2 respectivement) et incubée à 25 °C à 110 rpm. Lorsque les cultures atteignent la phase stationnaire de croissance elles sont transvasées en tubes de 50 mL (30 mL par tube) et elles sont centrifugées à 3500 rpm, 4 °C pendant 15 min. Le milieu de culture est retiré et 30 mL d'une solution de tampon phosphate sont ajoutés.

Suivant le type d'échantillon la solution de tampon phosphate ajoutée peut être :

- Simple (échantillons témoins ou blancs)
- Additionnée de 150 µL de DMSO (témoins DMSO)
- Additionnée de 150 µL d'une solution de composé lichénique à 0,01 mg/mL, 0,1 mg/mL ou 0,5 mg/mL dissous dans le DMSO

Les échantillons sont ensuite incubés à 25 °C, à 110 rpm.

E. Traitement des échantillons

1. *Suivi des cultures*

a. Mesure de la densité optique à 620 nm

Quotidiennement, 200 µL de chaque culture sont prélevés et déposés dans une plaque 96-puits, la densité optique est ensuite mesurée par un lecteur de plaque (Multiscan FC®, ThermoScientific) à 620 nm. Les données sont classées en tableau et la courbe de croissance est établie par représentation du log de la densité optique en fonction du temps.

b. Test au MTT

La croissance bactérienne est également mesurée par le test au MTT. 200 µL de culture sont déposés dans une plaque 96-puits puis 10 µL du réactif MTT (sels de tétrazolium) sont ajoutés dans chaque puits. Après 4h d'incubation (37 °C), le surnageant est retiré et les cristaux de formazan obtenus par transformation enzymatique du MTT par les bactéries vivantes se déposent au fond du puits. 200 µL de DMSO sont alors ajoutés pour remettre en solution ce formazan et la densité optique est lue à 540 nm. La quantité de formazan (absorbant à 540 nm) est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

La viabilité cellulaire est ensuite déterminée par ce calcul :

$$\text{Pourcentage de viabilité} = [(DO_{540} - DO_{540} \text{ milieu}) / (DO_{540} \text{ bactéries} - DO_{540} \text{ milieu})] \times 100$$

Avec DO_{540} : valeur lue pour l'échantillon analysé ; DO_{540} milieu : valeur lue pour le milieu seul ; DO_{540} bactéries : valeur lue pour l'échantillon de culture bactérienne seule.

2. *Extraction des échantillons*

Pour l'étude de l'effet de l'acide usnique sur le métabolisme bactérien et l'étude de biotransformation des composés lichéniques, les échantillons ont été traités de la même manière. Les tubes ont été centrifugés à 3500 rpm, 4 °C pendant 15 min, le culot bactérien a été mis de côté et le surnageant a été extrait par 2 x 30 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique a ensuite été séchée par du sulfate de sodium anhydre et le solvant a été évaporé à sec. Le résidu a été pesé et repris avec du solvant de qualité HPLC à une concentration de 1 mg/mL pour la suite des analyses.

Pour l'étude de l'effet de l'acide usnique sur le métabolisme bactérien les extractions sont réalisées au début de la phase stationnaire de croissance.

Pour les essais de stabilité les extractions sont réalisées après 0, 1, 3, 6 et 9 jours d'incubation.

Pour les études de biotransformation, les extractions des blancs sont effectuées après 1, 4 et 9 jours d'incubation avec la solution de tampon phosphate. Les extractions des échantillons en présence de

composés à biotransformer sont faites après 1, 2, 4, 7 et 9 jours d'incubation avec la solution de tampon phosphate contenant le composé.

F. Analyse des échantillons

Les échantillons sont analysés par HPLC/UV-DAD/MS. Ils sont préparés à 1 mg/mL avec du méthanol HPLC pour les échantillons de l'étude de l'effet de l'acide usnique sur le métabolisme bactérien et avec du THF distillé pour les échantillons des essais de stabilité et des essais de biotransformation. Ils sont ensuite filtrés sur membrane à 0,45 µm et transférés en vials HPLC.

Les analyses se font sur la colonne Prevail C₁₈ (5 µm, 250 x 4,6 mm, Hichrom, Reading, UK) à un débit de 0,8 mL/min avec comme système éluant un gradient constitué d'eau ultra-pure + 0,1% d'acide formique et d'acétonitrile qualité HPLC avec 0,1% d'acide formique. Le gradient utilisé est le gradient analytique classique décrit dans le chapitre 1 et 20 µL de chaque échantillon sont injectés dans la colonne. Le système HPLC (Shimadzu ®) est le même que celui précédemment décrit dans le chapitre 1. Les détecteurs en sortie de colonne sont un détecteur UV à barrette de diode, les chromatogrammes sont observés à 272 nm, et un spectromètre de masse (Advion ®) réglé en mode ESI négatif.

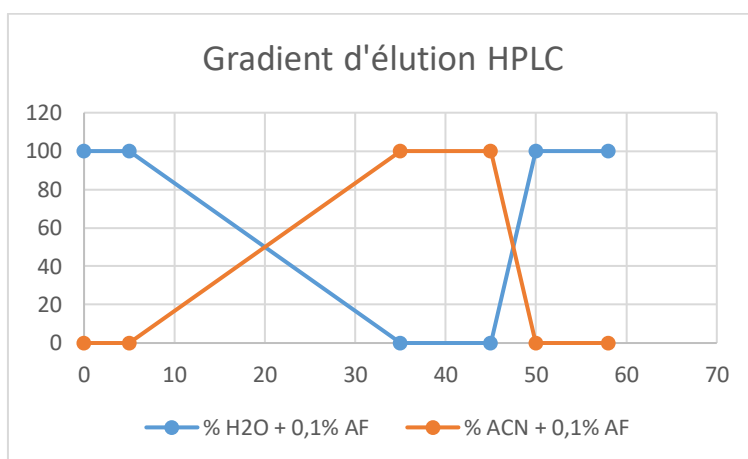


Figure 129 : Gradient d'élution analytique classique

Les logiciels utilisés pour le traitement des données sont LabSolutions pour les données HPLC/UV et Advion pour les données de spectrométrie de masse.

ACTE III : Obtention de composés azotés bioactifs par synthèse

Scène 1 : Introduction

Après les travaux pour obtenir des composés azotés bioactifs à partir de produits naturels nous nous sommes intéressés à une méthode d'obtention de ces derniers par voie synthétique. Dans ce but nous avons choisi d'étudier une voie de synthèse d'alcaloïdes naturels.

A. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés azotés qui forment l'un des groupes les plus importants de substances d'origine animales ou végétales. Plus précisément, le terme alcaloïde tend à désigner des composés organiques à propriétés basiques ou alcalines. Les alcaloïdes ont généralement une structure complexe et parmi eux on peut citer les dérivés morphiniques caractéristiques des *Papaver*. La concentration en substance active est particulièrement importante dans cette famille puisque le pavot somnifère (*P. somniferum*) contient jusqu'à 20% de morphine qui est utilisée principalement comme antalgique de palier 3. Un examen attentif de la morphine montre qu'il s'agit bien d'une 1-benzyltétrahydroisoquinoléine qui dérive de la phénylalanine ou de la tyrosine. Le groupe des alcaloïdes dérivant du tryptophane est sans doute aussi vaste que le précédent. Les alcaloïdes isolés de l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*), tels que l'ergotamine, ou l'acide lysergique, possèdent des propriétés hallucinogènes mais peuvent également être utilisés dans le domaine médical pour traiter les migraines (ergotamine) [238].

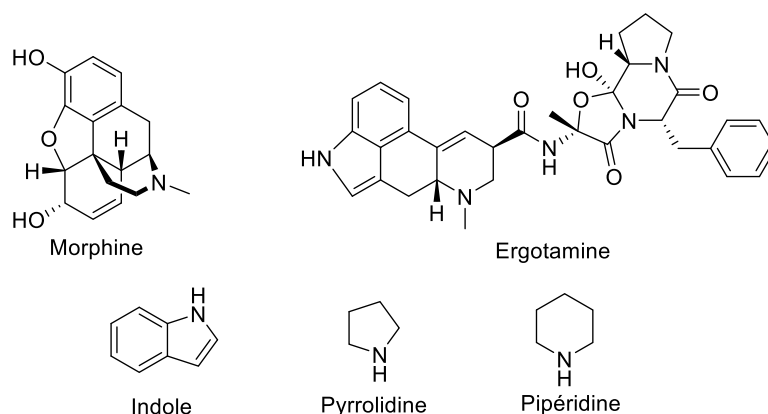


Figure 130 : Quelques structures représentatives des alcaloïdes

Pour notre étude nous nous sommes intéressés à d'autres types d'hétérocycles azotés tels que : la pyrrolidine, la pipéridine et l'indolizidine. Dans la nature, les alcaloïdes pyrrolidiniques sont synthétisés à partir de la L-ornithine avec formation intermédiaire de putrescine (Schéma 4). De cette manière, il est possible d'obtenir des alcaloïdes tropaniques tels que la hyosciamine, ou encore la cocaïne. Les alcaloïdes pyrrolidiniques simples les plus connus sont l'hygrine et la cuscohygrine qui sont isolés de plantes de la famille des Solanacées comme la Datura, ou la Belladone, des Erythroxylacées et des Convolvulacées [44]. Ce sont dans ces mêmes familles de plantes que sont retrouvés les alcaloïdes tropanique : *Erythroxylon coca* pour la cocaïne et *Atropa belladonna* pour la hyosciamine. On peut également citer la nicotine, isolée de la Solanacée *Nicotiana tabacum*, qui possède également un cycle pyrrolidinique (Figure 131).

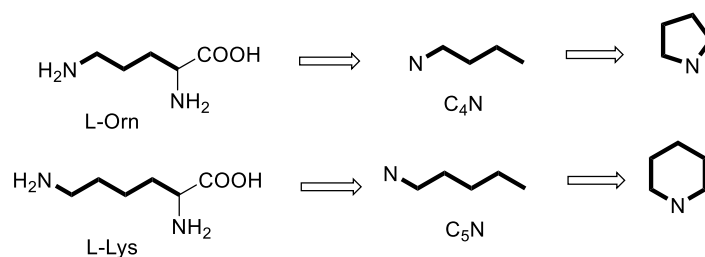


Schéma 4 : Obtention des alcaloïdes pyrrolidiniques et pipéridiniques [44]

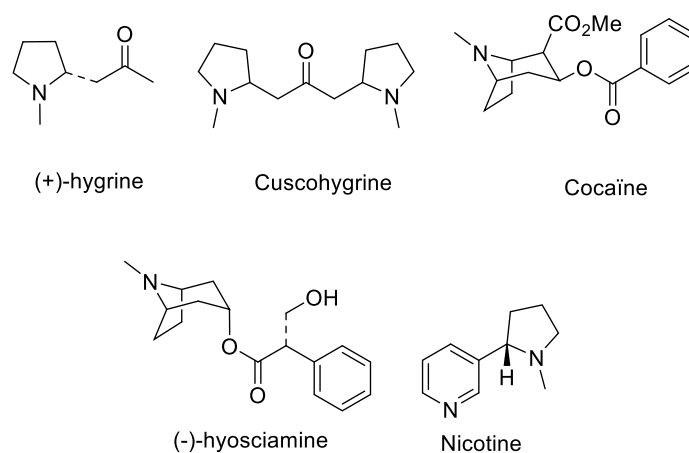


Figure 131 : Exemples d'alcaloïdes pyrrolidiniques et tropaniques

Les alcaloïdes pipéridiniques dérivent quant à eux de la L-Lysine et sont biosynthétisés à partir de cadavérine. On retrouve les analogues structuraux de l'hygrine et de la cuscohygrine qui sont respectivement la pelletiérine et l'anaferine ainsi que les analogues des tropanes à 6 chaînons comme la pseudopelletiérine. On peut également citer la lobeline, isolée de *Lobelia inflata*, ou la pipérine de *Piper nigrum* [44] (Figure 132).

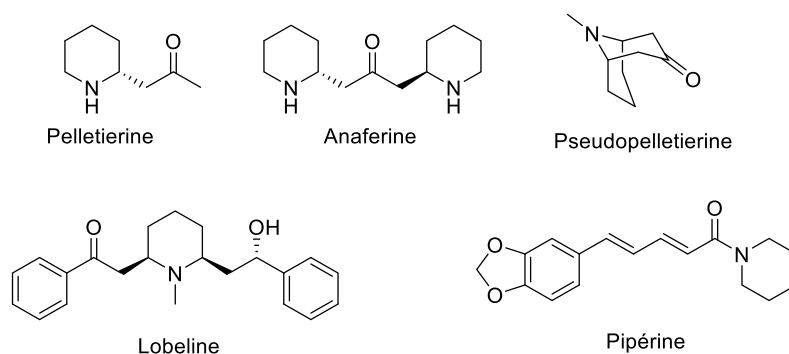


Figure 132 : Exemples d'alcaloïdes pipéridiniques

Les cycles indolizidiniques sont également obtenus à partir de la L-Lysine mais avec comme intermédiaire l'acide L-pipécolique. La castanospermine isolée de *Castanospermum australe* et la swainsonine issue de *Swainsona canescens* sont des exemples de composés possédant ce noyau (Figure 133).

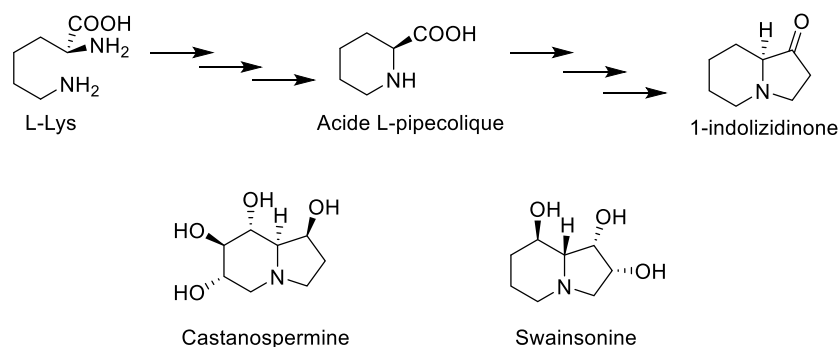


Figure 133 : Schéma de l'obtention du noyau indolizidine et exemples de composés [44]

B. Structures sélectionnées pour l'étude

Pour développer une nouvelle synthèse d'alcaloïdes, nous avons sélectionné trois structures caractéristiques des systèmes hétérocycliques précédemment décrits et qui sont représentées sur la Figure 134 ci-dessous.

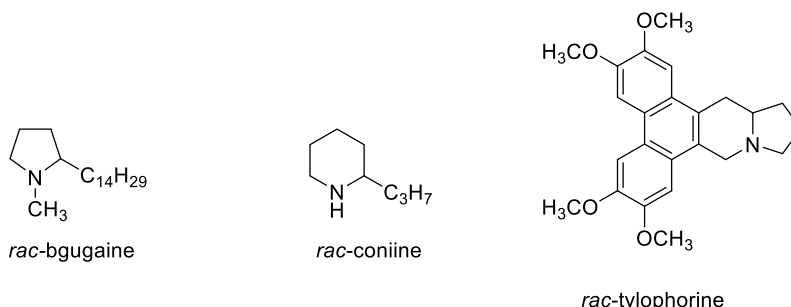


Figure 134 : Structures des trois alcaloïdes représentatifs des noyaux pyrrolidine, pipéridine et indolizidine sélectionnés pour la suite des travaux

La bugaine ou 1-méthyl-tétradécyl-pyrrolidine, est un alcaloïde qui a été isolé en 1993 par Melhaoui à partir des tubercules du capuchon de moine *Arisarum vulgare*. Ce composé est présent en faible quantité dans la plante puisque 10 kg de tubercules contiennent seulement 33 mg de bugaine [239]. Cet alcaloïde possède des propriétés antibiotique [239–241], antifongique [239], hépatotoxique [242] et cytotoxique [240,243], qui sont probablement liées à sa capacité à se fixer à l'ADN. On remarquera que la (–)-*R*-bugaine possède une affinité plus prononcée pour l'ADN que son énantiomère dextrogyre [240]. Enfin, la (–)-*R*-bugaine induit également des fuites potassiques suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire en ions calcium [243].

La Coniine ou 2-propyl-pipéridine, est isolée de la grande cigüe *Conium maculatum*. C'est un composé extrêmement volatil que l'on retrouve dans la plante entière mais en proportion plus importante dans les graines qui contiennent jusqu'à 1,6 % d'alcaloïdes dont 90% de coniine. Les effets neurotoxiques de la coniine sont connus depuis l'antiquité puisque les Grecs anciens utilisaient des décoctions de grande cigüe pour exécuter les condamnés. Le cas le plus célèbre est celui de Socrate dont l'agonie est décrite par Platon dans *Phédon* [244]. La coniine est également tératogène et son utilisation à des fins thérapeutiques est encore aujourd'hui à l'étude [245].

Le dernier composé dont nous envisageons de faire la synthèse est la tylophorine. Cet alcaloïde polycyclique a été isolé en 1935 par Ratnagiriswaran et Venkatachalam d'une liane grimpante *Tylophora indica* appartenant à la famille des Apocynacées [246]. Cette plante a longtemps été utilisée en médecine traditionnelle en raison de ses propriétés anti-inflammatoires [247] et antiémétiques. La tylophorine est le principal composé des alcaloïdes de la famille des phénanthroindolizidines qui contient un nombre assez restreint de substances. Les différences structurales entre ces dernières portent essentiellement sur le nombre et la position des groupements méthoxy. Des études récentes ont montré que les dérivés de la tylophorine possèdent des activités antivirales [248], anti-inflammatoires [249], et cytotoxiques [250]. L'étude du mécanisme d'action de la cytotoxicité de la *rac*-tylophorine a montré un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 expliqué par une accumulation de la protéine c-Jun qui induit une diminution de l'expression de la cycline A2 ainsi qu'une inhibition de la synthèse protéique [251].

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'approche synthétique que nous avons tenté de développer au cours de ce travail de thèse. Des travaux préalablement effectués au sein du laboratoire ont montré que des α -aminonitriles convenablement substitués permettaient la création de nouvelles liaisons carbone-carbone en position α de l'atome d'azote. Par exemple, les synthèses d'alcaloïdes de la tétrahydroisoquinoline tels que la (–)-xylopinine, la (–)-norlaudanosine et la (–)-carnégine ont été réalisées à partir d'un α -aminonitrile préparé par voie électrochimique [252,253]. De la même manière, des alcaloïdes de la quinoléine tels que l'angustureine, ou la cuspareine (*Galipea officinalis*) ont également été synthétisés en suivant la même stratégie de synthèse (Schéma 5).

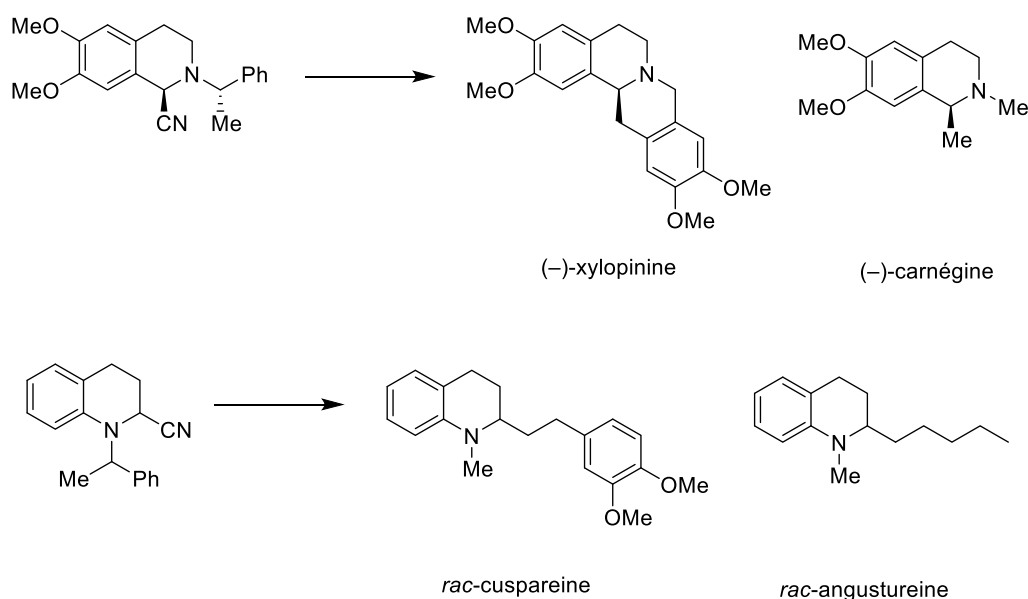
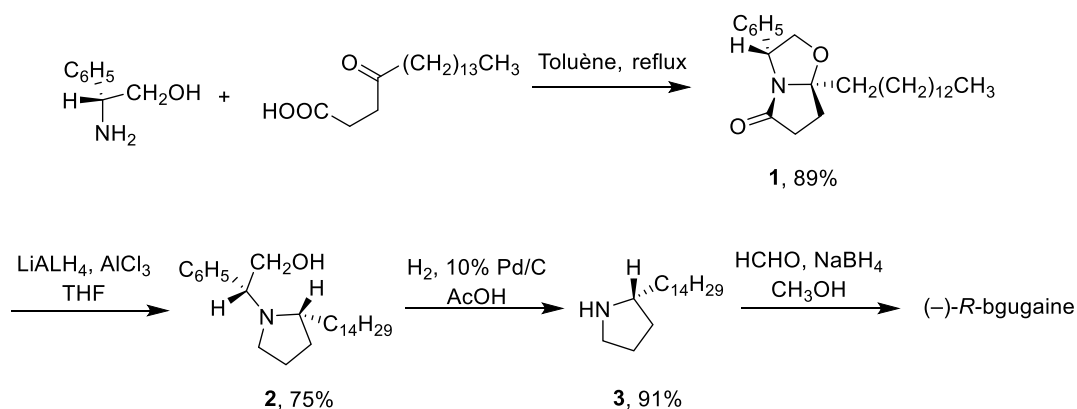


Schéma 5 : Alcaloïdes préalablement synthétisés au laboratoire à partir d' α -aminonitriles.

C. Etat de l'art

1. Synthèse de la rac-bgugaine et de son énantiomère lévogyre

La première synthèse diastéréosélective de la bgugaine a été réalisée en 1996 par Jossang en condensant l'acide 4-oxooctadécanoïque et le (-)-*R*-phénylglycinol pour former le 2*S*-2''*R*-tétradecyloxazololactame, **1**. Une première étape de réduction complète du composé avec du tétrahydruroaluminat de lithium (LiAlH₄) et du chlorure d'aluminium permet l'ouverture du cycle oxazole et la réduction simultanée de la fonction carbonylée pour conduire à la *N*-benzylpyrrolidine **2**. La copule chirale est libérée par hydrogénation catalytique pour conduire à la pyrrolidine **3** qui est ensuite méthylée par amination réductrice. Ainsi la (-)-*R*-bgugaine est obtenue avec un rendement total d'environ 61% [254] (Schéma 6).



En 1997, Takahata réalise une synthèse énantiosélective de la (-)-bgugaine en 6 étapes incluant une dihydroxylation asymétrique de Sharpless. Le *N*-penténylphthalimide **4** est tout d'abord converti en diol **5** par la méthode de Sharpless. Ce dernier est ensuite transformé en époxyde **6** selon un protocole en trois étapes proposé par le même auteur [255]. L'ouverture de cet époxyde à l'aide de bromure de tridécanylmagnésium est effectuée de manière stéréosélective et conduit à l'alcool **7** avec un rendement de 75%. L'aminoalcool intermédiaire est obtenu par traitement à l'hydrazine puis l'atome d'azote terminal est acylé à l'aide de chloroformate de benzyle pour conduire au composé **7**. L'étape de cyclisation se fait en deux étapes incluant la mésylation de la fonction alcool et la déprotonation du groupement NCbz par du NaH. Enfin, l'action de l'hydruure double de lithium et d'aluminium (LiAlH₄), permet d'accéder directement à la (-)-bgugaine avec un rendement total de 30 % [256] (Schéma 7).

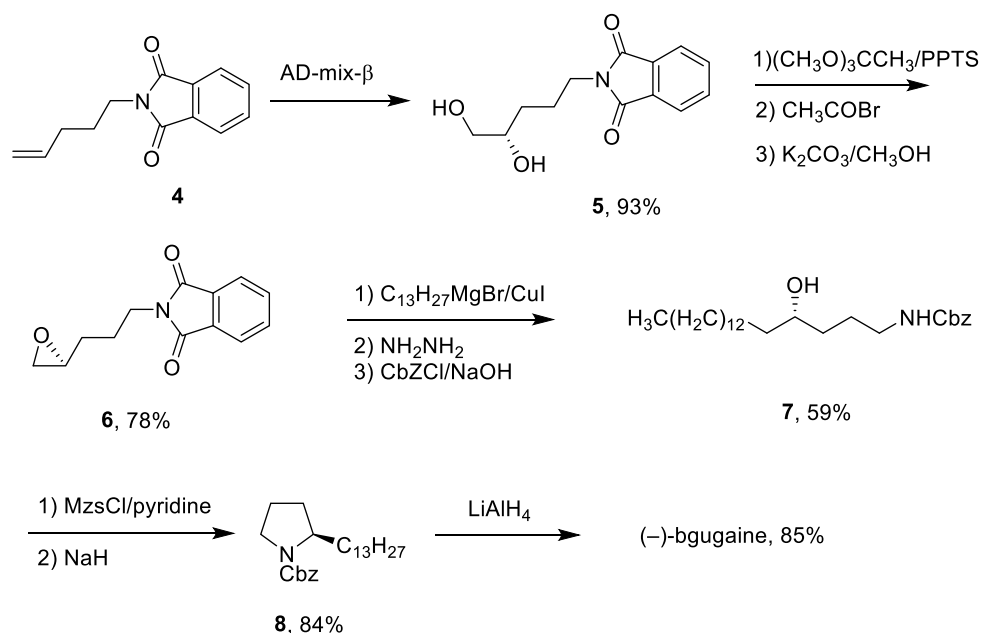


Schéma 7 : Synthèse de la (-)-bgugaine par Takahata

Les études sur la synthèse stéréosélective de la bgugaine se poursuivent en 2001 avec les travaux d'Enders et Thiebes qui utilisent l'addition 1,2 de composés organométalliques nucléophiles sur la double liaison CN des hydrazones chirales. Ainsi, l'addition de tétradecyllithium sur l'hydrazone **9** permet d'obtenir l'hydrazine **10** avec une stéréosélectivité de 96%. La copule chirale est ensuite retirée par réduction au diborane pour conduire à une amine primaire dont l'atome d'azote est converti en carbamate par action de chloroformate de méthyle. L'étape de cyclisation est effectuée par déplacement du mésylate terminal issu de l'alcool **11** par l'amidure formé par action de *t*-BuOK. La (-)-(*R*)-bgugaine est ensuite obtenue avec un excès énantiomérique de 96% et un rendement global de 43% [257] (Schéma 8).

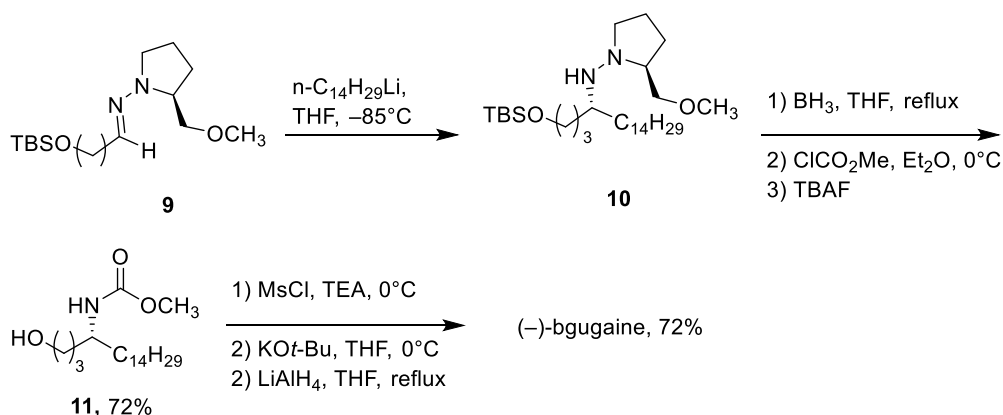


Schéma 8 : Synthèse de la (*R*)-bgugaine par Enders et Thiebes.

La synthèse suivante n'a été décrite qu'en 2008 par Miyata. Il s'appuie alors sur une réaction tandem radicalaire effectuée en présence de triéthylborane et d'oxygène au reflux du dichlorométhane. Il est intéressant de noter qu'en l'absence de dérivé halogéné la réaction a lieu avec l'incorporation d'un groupement éthyle en α de l'atome d'azote de l'oxime **12** conduisant à la pyrrolidine *rac*-**13**. L'oxime

14 est obtenue avec un rendement de 30% par ajout d'un large excès de 1-iodotétradécane sur le composé **12**. La bgugaine est obtenue avec un rendement total de 15 % [258]. Le mécanisme de la réaction reste cependant assez spéculatif et implique vraisemblablement la formation intermédiaire d'un radical aminyl lors de la cyclisation (Schéma 9).

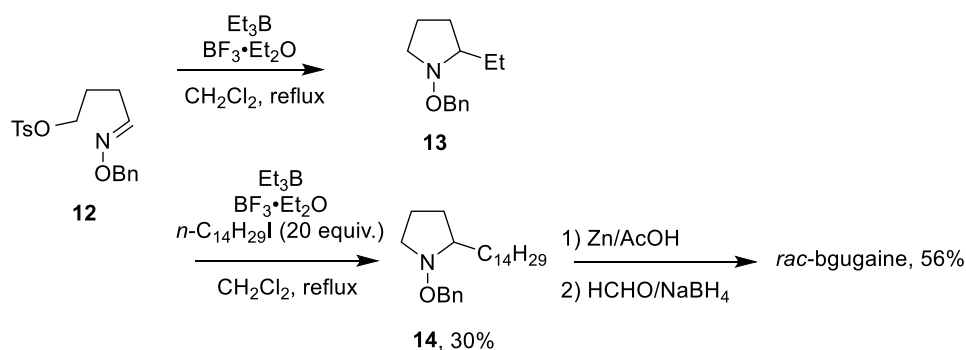


Schéma 9 : Schéma de synthèse de la *rac*-bgugaine par Miyata et Xiao

La même année, Majik décrit la condensation de Wittig entre le *N*-carboéthoxyprolinal et le sel de tridécanne phosphonium pour synthétiser l'alcène **15**. La (*R*)-bgugaine est finalement obtenue avec un rendement global d'environ 40 % [259] (Schéma 10).

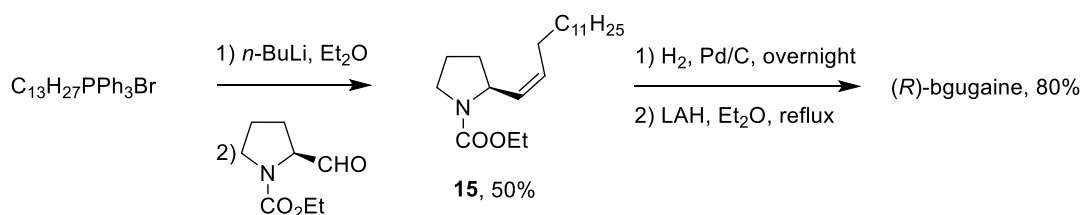


Schéma 10 : Synthèse de la (*R*)-bgugaine par Majik.

En 2010, Huang décrit la synthèse de la *rac*-bgugaine en deux étapes à partir de la *N*-méthylpyrrolidin-2-one commerciale. La chaîne alkyle est incorporée en une seule opération par addition de bromure de tétradécyle magnésium sur le groupement carbonyle de la *N*-méthylpyrrolidinone après activation par un mélange d'anhydride triflique et de 2,6-di-tert-butyl-4-méthylpyridine (DTBMP). Le sel de magnésium formé intermédiairement est alors réduit par l'hydruure de lithium et d'aluminium (LiAlH_4) en *rac*-bgugaine avec un rendement de 75% [260] (Schéma 11).

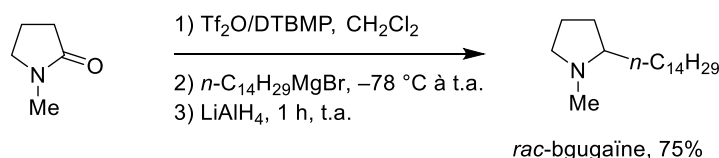


Schéma 11 : Synthèse de la (*R*)-bgugaine par Huang.

La synthèse de la bbugaine établie par Shu permet d'obtenir des composés optiquement purs en utilisant des amines homopropargyliques chirales non racémiques. Celles-ci sont préparées selon la méthode d'Ellman à partir de la *tert*-butylsulfinimine **16** qui est condensée avec le bromo-2-propynylmagnésium pour fournir l'homopropargylsulfonylamine **17**. Le groupement *tert*-butylsulfinyle est ensuite retiré par hydrolyse acide, puis l'amine est protégée par un groupement tosyloxy (**18**). La cyclisation en pyrrolidine est ensuite effectuée en présence de complexes d'or (I) qui conduisent à l'ion iminium **19**. Une oxydation par l'acide métachloroperbenzoïque (*m*-CPBA) permet de synthétiser le lactame **20** dont l'atome d'azote est déprotégé à l'aide de naphthalène de lithium (Li/naphtalène) puis alkylé en présence de iodométhane. La pyrrolidinone intermédiaire est ensuite réduite en présence de LiAlH_4 pour conduire à la (-)-bbugaine avec un rendement total de 21 % en 8 étapes avec un excellent ratio énantiomérique de 99:1 [261] (Schéma 12).

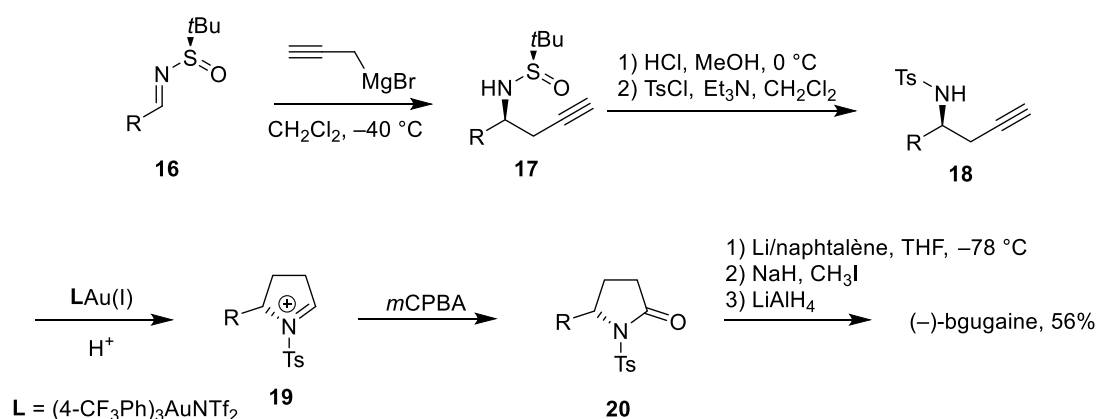


Schéma 12 : Synthèse de la (-)-bbugaine par Shu.

Ainsi, plusieurs synthèses de la bbugaine ont été décrites en version racémique et asymétrique. Cinq d'entre elles permettent d'obtenir l'énantiomère lévogyre avec des excès énantiomériques supérieurs à 98%. Deux méthodes décrivent la synthèse racémique de la bbugaine avec des rendements globaux compris entre 15 à 75 %. On notera que la chaîne lipophile à 14 atomes de carbone est introduite directement par action d'un réactif de Grignard ou construite par homologation de Wittig.

2. Synthèse de la rac-coniine

Les synthèses racémiques de la coniine sont trop nombreuses pour être toutes rapportées ici. Par conséquent, seules quelques approches seront présentées ici avec un accent particulier sur les méthodes qui exploitent la réactivité d'un α -aminonitrile.

En 2005 Girard effectue la synthèse de la *rac*-coniine à partir de l' α -aminonitrile **21** préparé par voie électrochimique en développant la cyanation anodique de la *N*-phényl-pipéridine. La chaîne propyle est incorporée pour former l'amine **22** selon une séquence d'alkylation-décyanation réductrice utilisant le 1-iodopropane comme agent alkylant et NaBH_4 comme source d'hydrure. Le groupement phényle porté par l'atome d'azote est ensuite retiré par hydrolyse d'une énamine intermédiaire **23**.

Cette dernière est formée à l'issue d'une réduction de Birch qui est réalisée en présence de lithium dans l'ammoniac liquide et d'éthanol comme source de proton. La *rac*-coniine est obtenue avec un rendement global de 70% [262] (Schéma 13).

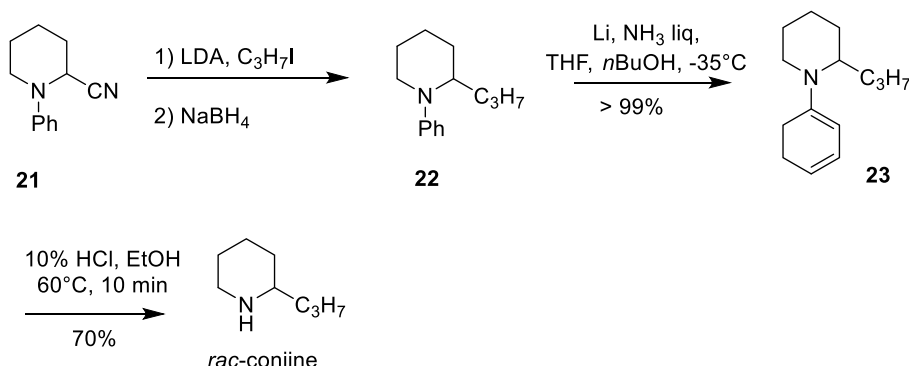


Schéma 13 : Synthèse de la *rac*-coniine par Girard.

En 2010, Airiaud propose une nouvelle synthèse de la *rac*-coniine en utilisant la réaction d'hydroformylation des homoallylamines comme étape clef. Il utilise pour cela un complexe de rhodium qui réagit avec l'amine homoallylique **24** dans un mélange d'hydrogène et de monoxyde de carbone. L'énamide **25** est obtenue avec un rendement de 84%, puis celle-ci subit une réduction complète en *rac*-coniine en présence d'hydrogène et de catalyseur de Pearlman. La coniine est synthétisée avec un rendement global de 54% sur 3 étapes [263] (Schéma 14).

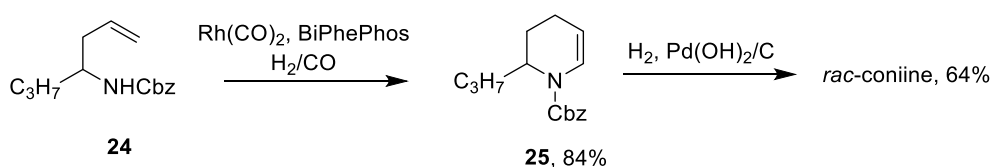


Schéma 14 : Synthèse de la *rac*-coniine par Airiaud.

La même année, Xiao applique l'alkylation réductrice des lactames à la synthèse racémique de la coniine à partir de la *N*-benzylpipéridinone **26**. La fonction carbonylée est activée à l'aide du couple Tf_2O /DTBMP dans le but d'ajouter le bromure de propyle magnésium. L'aminal intermédiaire est alors réduit par LiAlH_4 pour conduire à la pipéridine **27**. Cette dernière est directement convertie en chlorure de coniine par hydrogénation catalytique dans le méthanol acide avec un rendement de 85% [260] (Schéma 15).

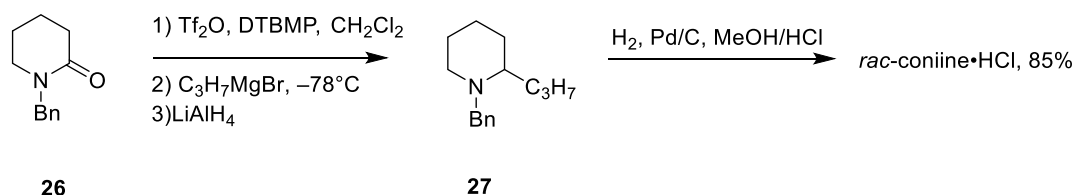


Schéma 15 : Synthèse de la *rac*-coniine par Xiao

La réaction tandem de type aza-Prins a été utilisée par Reddy pour effectuer la synthèse de la coniine. Ainsi, il effectue la condensation de l'homoallylamine *N*-tosylée **28** avec le *n*-butyraldéhyde pour former un ion iminium qui se cyclise sur la double liaison éthylénique terminale pour former la 4-iodo-2-propyl-pipéridine **29** avec un rendement de 92%. L'atome d'iode est ensuite retiré par voie radicalaire par chauffage en présence d'hydruure de tributylétain (Bu_3SnH) et d'azobisisobutyronitrile (AIBN) dans le toluène pour former la 2-propyl-pipéridine **30**. La déprotection de l'atome d'azote est effectuée par une solution de naphthalénure de sodium pour synthétiser la coniine avec un rendement global de cette séquence réactionnelle de 79% [264] (Schéma 16).

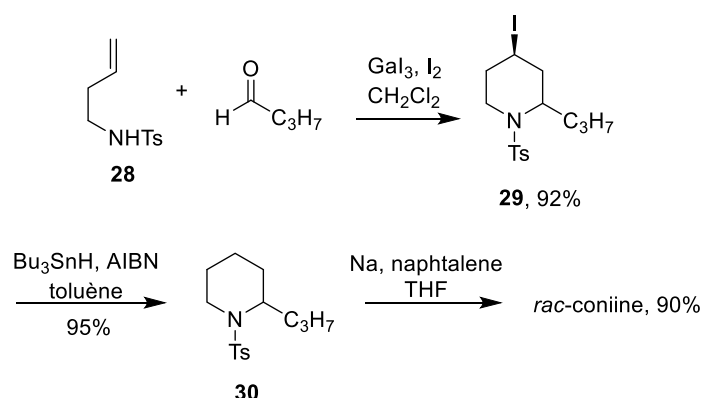


Schéma 16 : Synthèse de la *rac*-coniine par Reddy

En 2013, Dion a choisi la coniine comme composé modèle pour étudier la réaction d'hydroamination intramoléculaire de type Cope. Le précurseur **32** est synthétisé à partir de la tétrahydro-2H-pyran-2-one **31** par réduction au DIBAL puis oléfination selon la méthode de Wittig de l'aldéhyde intermédiaire. Une réaction de type Mitsunobu en présence de BocNHOBoc permet d'accéder à l'hydroxylamine **33** avec de bons rendements. Cette dernière est alkylée à l'aide de bromure d'allyle en présence de carbonate de potassium dans le THF, puis la cyclisation en pipéridine intervient lors du chauffage à 150°C de l'allylamine **34** dans un mélange d'eau et de benzène pour produire l'hydroxylamine **35**. La réduction de la liaison N-O est réalisée à l'aide de zinc en milieu acide pour former la coniine. Cette dernière réaction constitue l'étape limitante de cette synthèse puisque la coniine est obtenue avec un rendement global de 2% [265] (Schéma 17).

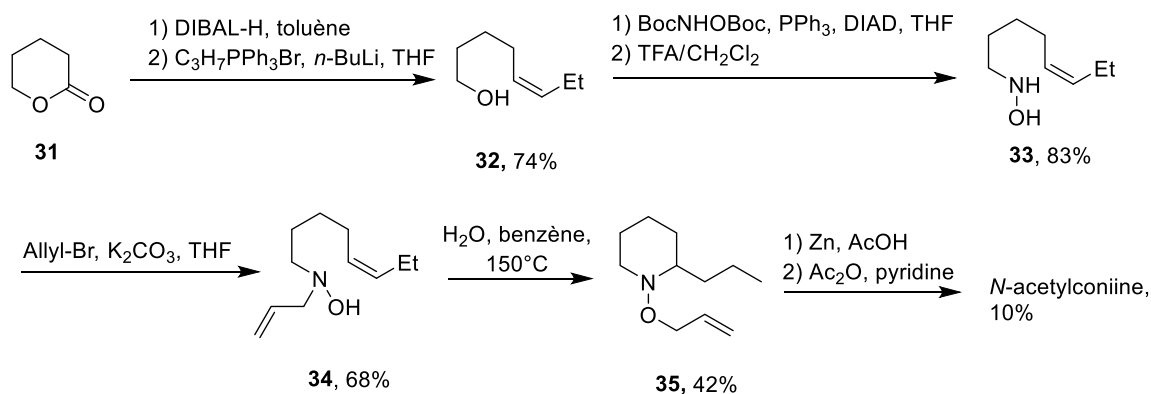


Schéma 17 : Synthèse de la rac-coniine par Dion

Une seconde synthèse racémique de la coniine a été réalisée par Vu au laboratoire. L'α-aminonitrile **36** est préparé par modification de la réaction de Fry par réduction ménagée d'un sel de pyridinium puis par action de cyanure de sodium sur la 1,2-dihydropyridine intermédiaire. L'α-aminonitrile **36** est alkylé par action successive de LDA et de iodopropane pour former la Δ₃-pipéridine **37** suite à la réaction de décyanation réductrice. La double liaison éthylénique est saturée à l'aide du catalyseur de Wilkinson pour conduire à l'amine **38**, qui est ensuite déprotégée par hydrogénation catalytique. Les deux énantiomères de la coniine **39** et **40** sont obtenus suite au dédoublement du mélange racémique à l'aide d'acide (+)-mandélique [266] (Schéma 18).

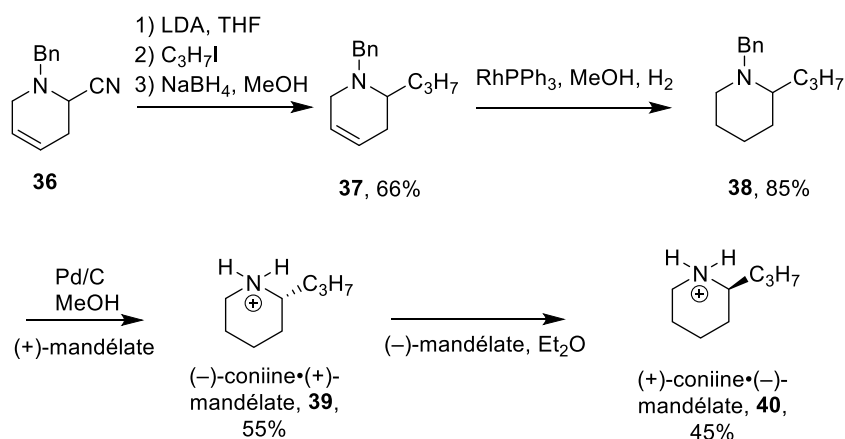


Schéma 18 : Synthèse de la rac-coniine par Vu

La dernière synthèse de la *rac*-coniine a été effectuée par réaction de Mannich entre le 5-bromopentanal, l'anisidine et l'acétone. La réaction est catalysée par la proline conduisant de manière quantitative à la pipéridine **41**. La fonction carbonylée est réduite en deux temps en groupement méthylène par réduction du dithiane correspondant à l'aide du couple NiCl₂/NaBH₄. Le groupement *p*-méthoxyphenyl (PMP) est retiré par voie oxydante à l'aide de nitrate de cérium et d'ammonium aboutissant alors à la formation de la *rac*-coniine sous la forme de son carbamate **42** avec un rendement final de 62% [267] (Schéma 19).

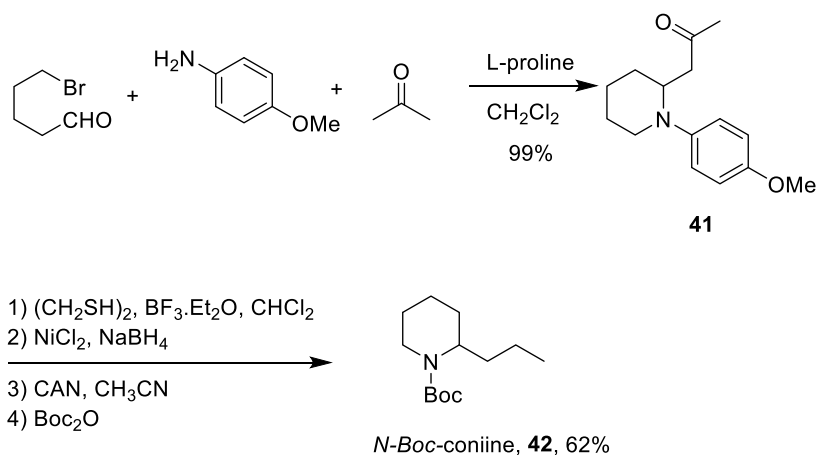


Schéma 19 : Synthèse de la rac-coniine par Chacko

3. Synthèse de la rac-tylophorine

La synthèse de cet alcaloïde phénanthroindolizidinique a été étudiée dès 1961 par Govindachari. [268]

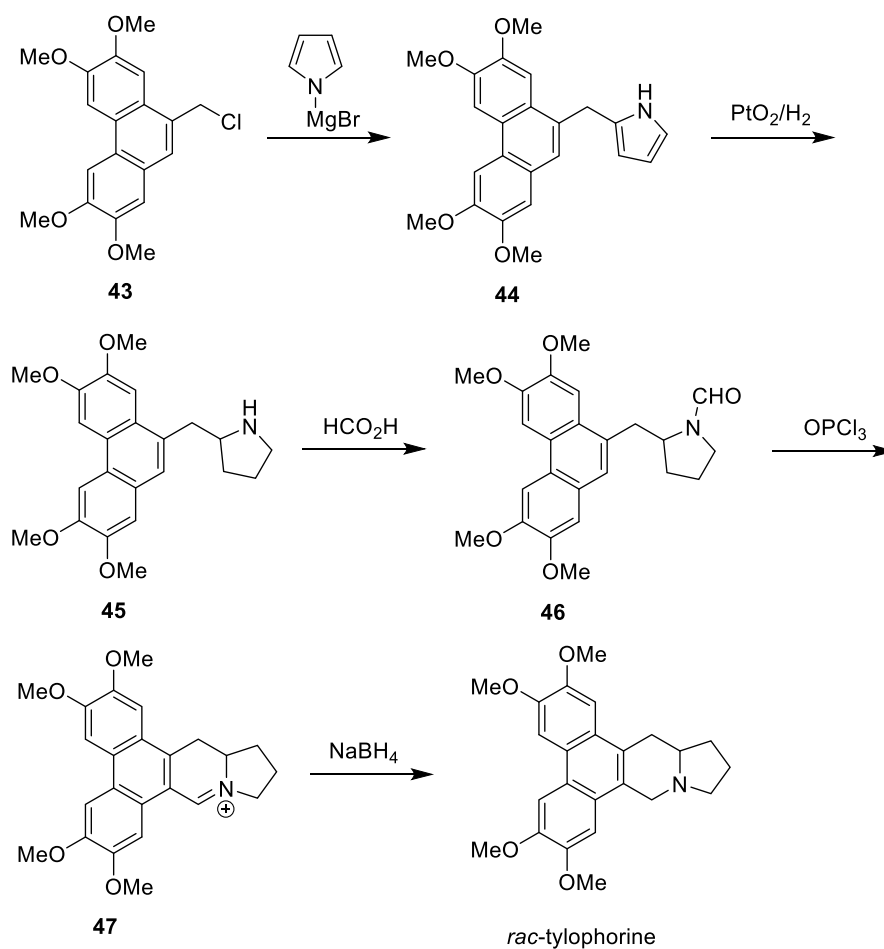


Schéma 20 : Synthèse de la rac-tylophorine par Govindachari.

Après plusieurs tentatives infructueuses, il réussit à condenser le bromure de pyrrolymagnésium sur le 2,3,6,7-tétraméthoxy-9-chlorophénanthrène **43** pour former le pyrrole **44**. Une réduction complète en pyrrolidine **45** est réalisée en présence de catalyseur d'Adams (PtO_2) pour ensuite synthétiser le dérivé formylé correspondant **46**. Ce dernier composé subit une réaction de Bischler-Napieralsky en présence d'oxychlorure de phosphore, pour produire l'ion iminium intermédiaire **47** dont la réduction par NaBH_4 dans le méthanol fournit la *rac*-tylophorine (Schéma 20). Comme il est d'usage à l'époque, le mélange racémique est résolu en ses deux antipodes optiques à l'aide d'acide camphorsulfonique. Bien que les pouvoirs rotatoires soient mesurés avec précision, la configuration absolue de chaque énantiomère n'a pu être déterminée à ce stade.

En 2012, Lahm réalise la synthèse totale de la *rac*-tylophorine en 3 étapes en utilisant le réarrangement de Stevens comme étape clef. Pour cela, il effectue la condensation du dérivé dibromé **48** avec la 2-cyanopyrrolidine **49** en présence de DIPEA fournissant ainsi le sel d'ammonium spirocyclique **50**. L'action du KHMDS (bis(triméthylsilyl)amide) sur ce composé se traduit par la formation d'un ylure intermédiaire qui se transpose en α -aminonitrile **51** qui, en raison de son instabilité, n'a pas été isolé. L'étape de décyanation réductrice est finalement effectuée à l'aide de cyanoborohydrure de sodium pour former la tylophorine avec un rendement final de 58% [269] (Schéma 21).

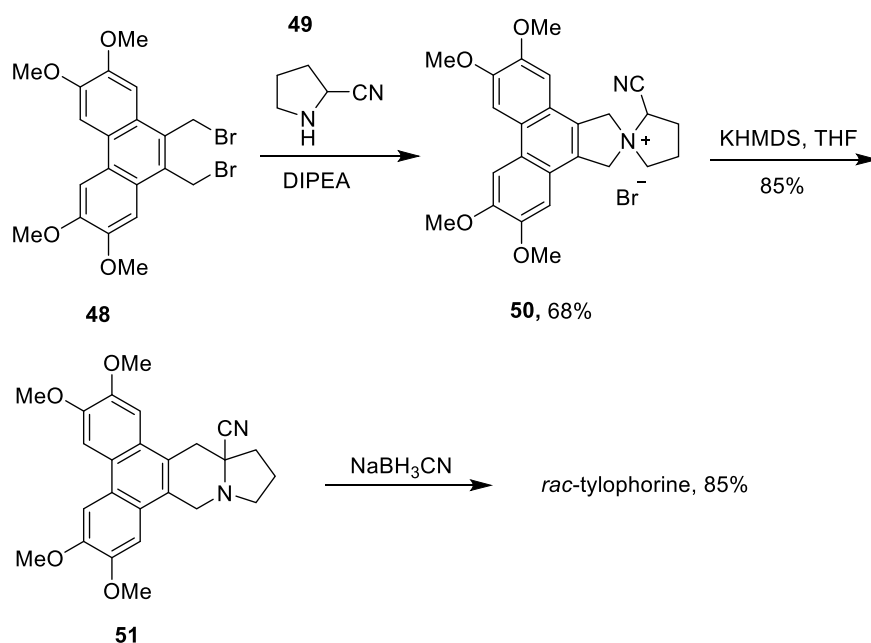


Schéma 21 : Synthèse de la *rac*-tylophorine par Lahm

La même année, Xu utilise les sels de rhodium (III) pour catalyser la cyclisation de l'acide hydroxamique **52** en pyridone **53**. Une fois obtenu, le composé est ensuite converti en indolizidine **54** par réaction de Mitsunobu. Le groupement triméthylsilyl est retiré de la molécule à l'aide de fluorure de tétrabutyl ammonium, puis une réduction selon les conditions de Moore ($\text{LiAlH}_4/\text{AlCl}_3$) permet d'obtenir la *rac*-septicine **56** avec un rendement de 81%. Enfin, un couplage oxydant entre les deux noyaux catéchols par action de VOF_3 permet de finaliser la synthèse de la *rac*-tylophorine avec un rendement total de 52% [270] (Schéma 22).

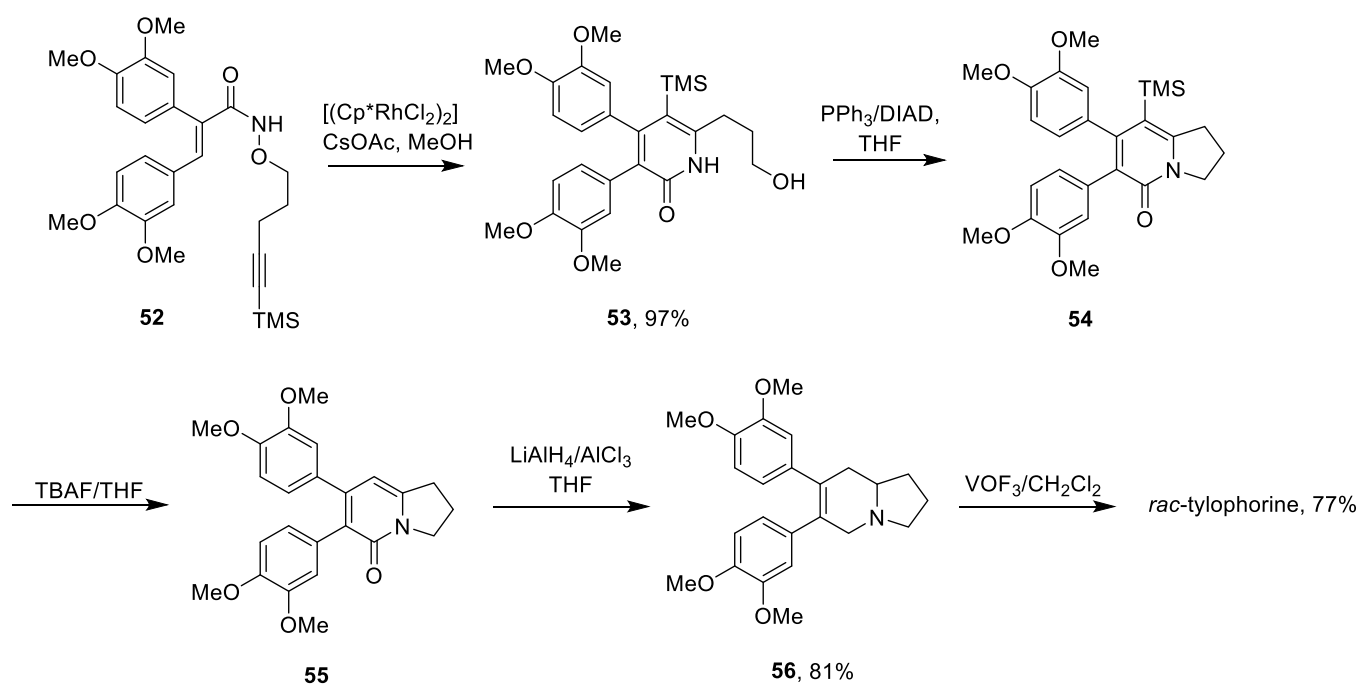


Schéma 22 : Synthèse de la *rac*-tylophorine par Xu.

En 2013, Lin décrit plusieurs voies de synthèse de la tylophorine. L'une d'entre elle s'appuie sur la condensation du iodobiphényle **58** avec la pyrrolidinone **59** selon les conditions décrites par Sonogashira. L'alcyne **60** est ensuite cyclisé en phénanthrène **61** par chauffage au reflux de la *N*-méthyl-pyrrolidone (NMP) en présence de DBU. La fonction carbonylée est réduite par $LiAlH_4$. Après déprotection par hydrogénolyse, le composé **62** obtenu se cyclise selon les conditions de Pictet-Spengler pour former la *rac*-tylophorine avec un rendement de 84% [73] (Schéma 23).

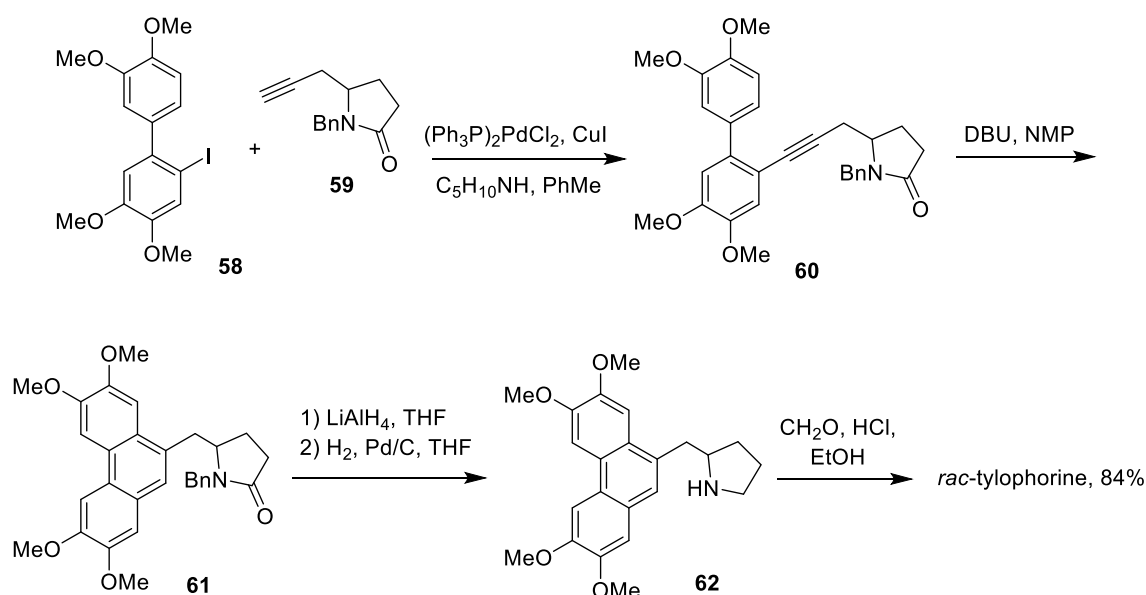


Schéma 23 : Synthèse de la *rac*-tylophorine par Lin

En 2016, Yao étudie la synthèse de composés à noyau phénanthrène par condensation de dérivés de l'acide cinnamique et du triflate **64** précurseur d'un aryne formée par action d'un complexe de palladium. L'application de ce protocole au dérivé iodé **63** s'est traduit par la formation du phénanthrène **65** puis du lactame **66** qui constitue un précurseur avancé vers la synthèse de la tylophorine [271] (Schéma 24).

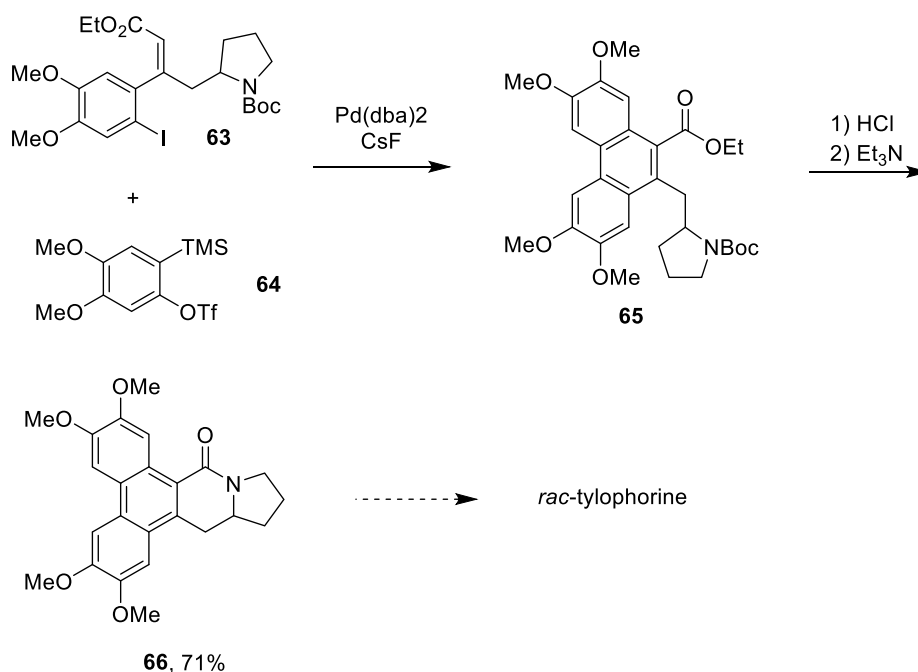


Schéma 24 : Synthèse de la *rac*-tylophorine par Yao.

La dernière synthèse de la *rac*-tylophorine a été publiée par Opatz en 2016. La séquence réactionnelle débute par une réaction de Perkin entre le véatraldéhyde et l'acide homovératrique permettant la synthèse de l'acide cinnamique **67**. Un couplage oxydant réalisé en présence du couple NaNO_2 /oxygène permet d'accéder à la phénanthrène **68**, puis cette dernière est condensée avec la penténamine pour former l'amide **69**. Une réaction de iodo-cyclisation réalisée par action d'iode moléculaire permet la formation de la pyrrolidine **70**. La construction de l'indolizidine constitue l'étape clef de l'approche proposée par Opatz qui opte pour un couplage radicalaire suite à la coupure homolytique de la liaison carbone-iode au contact de tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0). Le lactame pentacyclique **71** ainsi formé sera réduit par LiAlH_4 pour donner la *rac*-tylophorine avec un rendement total de 41% [272] (Schéma 25).

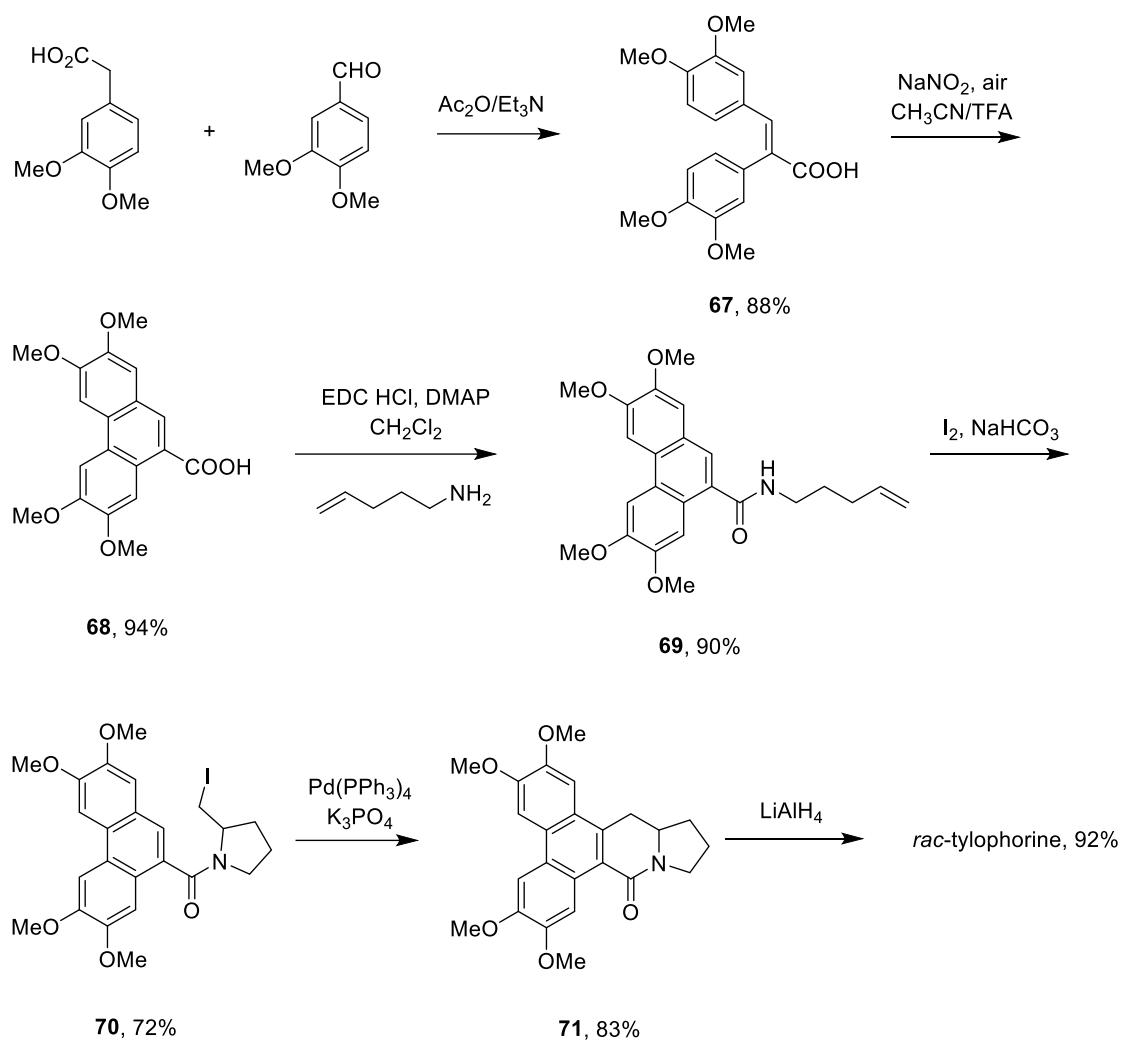


Schéma 25 : Synthèse de la *rac*-tylophorine par Opatz.

D. Plan de synthèse

En examinant les structures des trois composés sélectionnés pour notre étude, on peut remarquer qu'ils possèdent tous un carbone tertiaire situé en position α de l'atome d'azote (C2) (Schéma 26). On peut alors imaginer une approche basée sur l'assemblage de différents fragments carbonés sur ce carbone central. Une première déconnection ($d1$) au niveau du cycle azoté aboutit à un premier fragment (**F1**) porteur d'une chaîne alkyle terminée par un groupement cyclisant (Z). La seconde déconnection ($d2$) libère une chaîne alkyle qui constituera le futur système hétérocyclique ainsi qu'une amine (**F3**) qui sera obtenue par la condensation d'un dérivé halogéné (**F4**) et de l'α-aminoacétonitrile. Nous avons donc décidé d'étudier la chimie de l'α-aminoacétonitrile qui a surtout été utilisé comme précurseur de la glycine mais dont l'utilisation demeure délicate en raison de sa toxicité. Pour répondre à nos objectifs de synthèse nous avons retenu l'utilisation d'un équivalent synthétique tel que le *N,N*-dibenzylaminoacétonitrile.

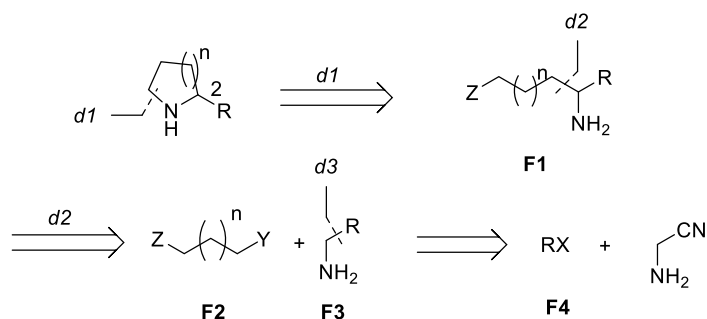


Schéma 26 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse d'alkaloïdes

De manière plus générale, la réactivité des *N,N*-dialkylaminoacétonitriles a été assez peu étudiée. En 1978, Gilbert Stork étudie l'alkylation séquentielle du *N,N*-diéthylaminoacétonitrile **72** en présence de LDA et d'agents alkylants tels que le 2-(2-bromoéthyl)-1,3-dioxolane et le 1-iodo-3-hexène. Il obtient alors l'aminonitrile à structure quaternaire **74** qui, chauffé au reflux de l'éthanol en présence de CuSO_4 permet d'obtenir la cétone **75** [273] (Schéma 27). Cette réaction illustre la fragilité de ces composés qui se décomposent également sur colonne de gel de silice de la même manière. De plus, nous pouvons affirmer que ces composés peuvent être considérés comme des équivalents synthétiques d'anion acyls.

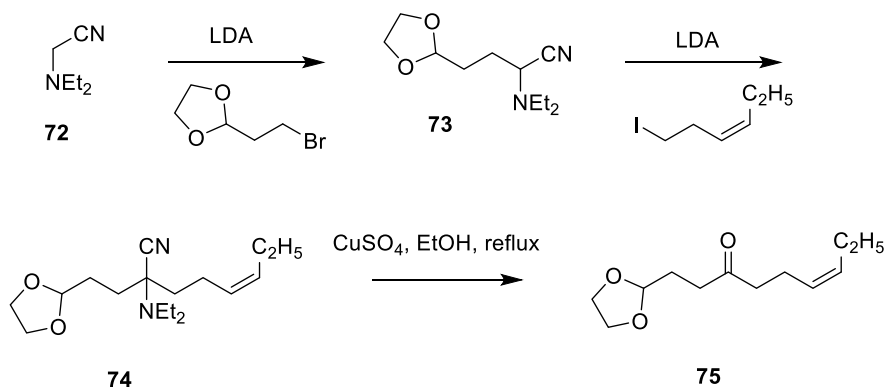


Schéma 27 : Synthèse de la cétone **75** par Stork.

Plusieurs études d'alkylation du *N,N*-dibenzylaminoacétonitrile ont été réalisées ces dernières années, celles-ci sont résumées dans le schéma 28. Leclerc effectue la condensation de divers aldéhydes pour obtenir des aminoalcools tout en contrôlant la configuration relative des substituants [274]. Guillaume utilise le 1,5-bromopentane pour synthétiser un α -aminonitrile présentant un carbone spiranique [275]. Enfin Bahde réalise la synthèse d' α -aminonitrile à structure quaternaire par condensation successive de iodométhane et du 5-bromopentène [276].

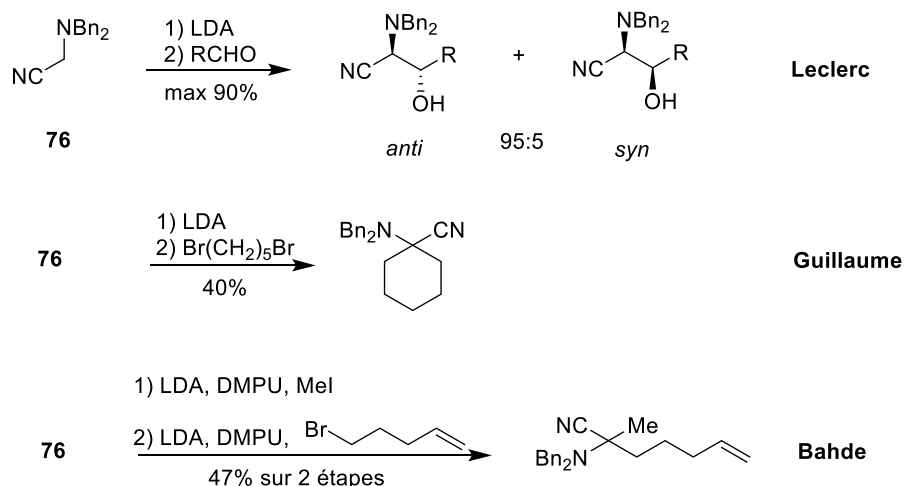


Schéma 28 : Utilisation du *N,N*-dibenzylaminoacétonitrile en synthèse organique

Ainsi, dans la continuité de ces travaux, le *N,N*-dibenzylaminoacétonitrile sera ici utilisé comme source d'azote pour la synthèse d'alcaloïdes de type pyrrolidine (bugaine), pipéridine (coniine) et indolizidine (tylophorine). L'analyse rétrosynthétique et les fragments carbonés utilisés correspondants sont représentés dans le schéma 29. Nous décrirons tout d'abord l'optimisation de la synthèse des agents alkylants qui ne sont pas commerciaux, puis dans une seconde partie, nous décrirons nos travaux sur l'étude de l'alkylation du *N,N*-dibenzylaminoacétonitrile.

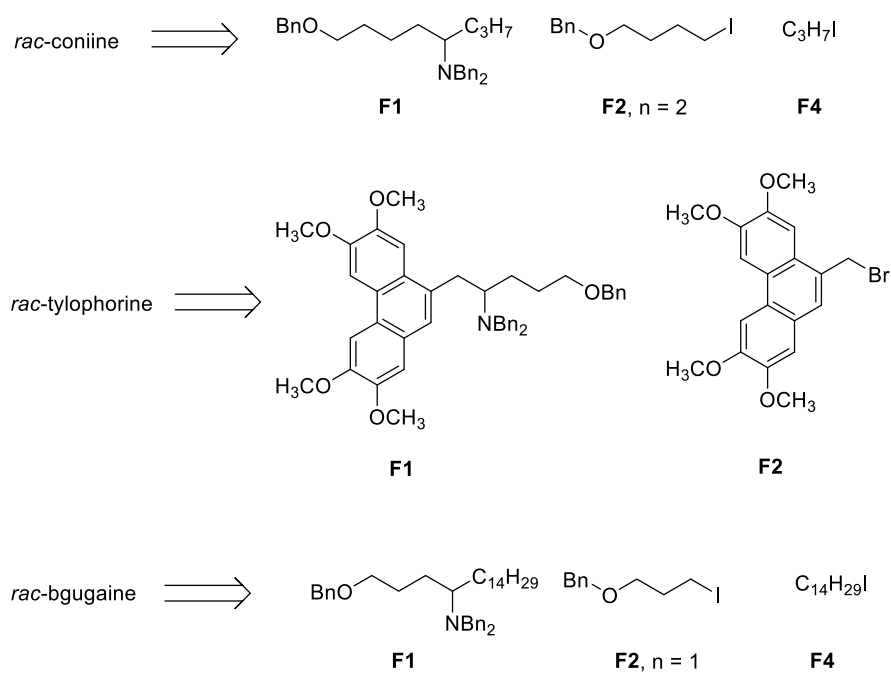


Schéma 29 : Plan de synthèse de la coniine, de la tylophorine et de la bgugaine par approche bidirectionnelle

Scène 2 : Résultats et discussion

A. Synthèse du *N,N*-dibenzylaminoacétonitrile **76**

La synthèse de l' α -aminonitrile **76** (Schéma 30) a été effectuée selon le mode opératoire utilisé par Bahde [276], par condensation du chloroacétonitrile avec la dibenzylamine dans l'acétonitrile en présence d'une base de Hünig (*N,N*-diisopropyléthylamine, DIPEA) et d'une quantité catalytique (5-10% en masse) de iodure de tétrabutylammonium (Bu_4NI). La réaction est réalisée sous atmosphère d'argon, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après 72 h d'agitation, le solvant est évaporé et le mélange réactionnel est agité dans un mélange biphasique d'éther diéthylique et d'eau en présence de sulfite de sodium. Le brut réactionnel est ensuite purifié sur colonne de silice et le composé **76** est obtenu avec un rendement de 90% sous la forme d'une huile visqueuse qui se solidifie au refroidissement. Après broyage au mortier, une poudre blanche dont le point de fusion est de 53°C est alors obtenue.

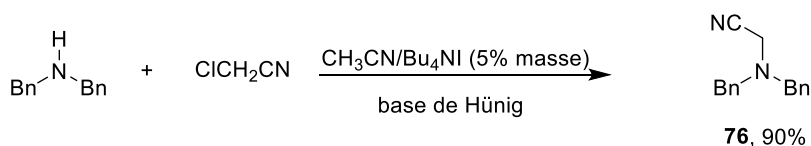


Schéma 30 : Synthèse du *N,N*-dibenzylaminoacétonitrile

L'analyse par RMN du proton est conforme avec les données de la littérature et on observe notamment la présence d'un singulet (2 H) à $\delta = 3.40$ ppm et un second singulet (4 H) à $\delta = 3.78$ ppm. Ces deux signaux sont attribués respectivement aux protons du groupement méthylène en position α du groupement nitrile et aux protons benzyliques.

B. Synthèse des dérivés halogénés

1. Synthèse des iodures d'alkyles **78a-b** par réaction d'Appel

Pour réaliser la synthèse des fragments iodés nous avons protégé l'une des deux fonctions alcool du 1,3-propanediol et du 1,4-butanediol sous la forme d'un éther benzylique (Schéma 31). Cette protection est effectuée par le bromure de benzyle dans le THF après formation d'un alcoolate suite à l'ajout de 1,2 équivalents de NaH sur 5 équivalents de diol. Après réaction complète, un équivalent de bromure de benzyle est ajouté dans le milieu réactionnel qui est agité pendant 12 h à température ambiante puis à reflux pendant 4 h. Quatre volumes d'éther diéthylique sont ajoutés puis la phase organique est lavée à l'eau par 4 lavages successifs pour éliminer l'excès de diol. Le brut est ensuite purifié sur colonne de silice pour donner les composés **77a** et **77b** avec des rendements respectifs de 70% et de 85% calculés à partir de la quantité de bromure de benzyle introduite en défaut.

La synthèse des dérivés halogénés est ensuite réalisée par la réaction d'Appel qui permet la conversion directe d'un alcool primaire en dérivé halogéné correspondant [277]. Ce protocole est ensuite revu par Garegg en 1984, et celui-ci propose d'agiter l'alcool dans le dichlorométhane en présence de triphénylphosphine, d'imidazole et d'iode moléculaire [278,279][280,281]. A un équivalent des composés **77a** et **77b** à 0 °C sous atmosphère inerte sont ajoutés 1,2 équivalents de triphénylphosphine et 1,8 équivalents d'imidazole dans le dichlorométhane puis 1,3 équivalents de diiode sont additionnés à la spatule sur une durée de 30 min. La disparition de la coloration caractéristique de l'iode au fur et à mesure de l'ajout témoigne de sa consommation et donc de la formation du complexe PPh_3I_2 en solution. Après 2 h de réaction, l'excès d'iode est réduit par ajout d'eau et de sulfite de sodium dans le milieu jusqu'à décoloration complète de la phase aqueuse qui est agitée pendant au moins 30 minutes supplémentaires. Après séparation de l'oxyde de triphényl phosphine par deux lavages à l'éther diéthylique et par filtration sur colonne de gel de silice, les produits **78a** et **78b** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 70% et de 87%.

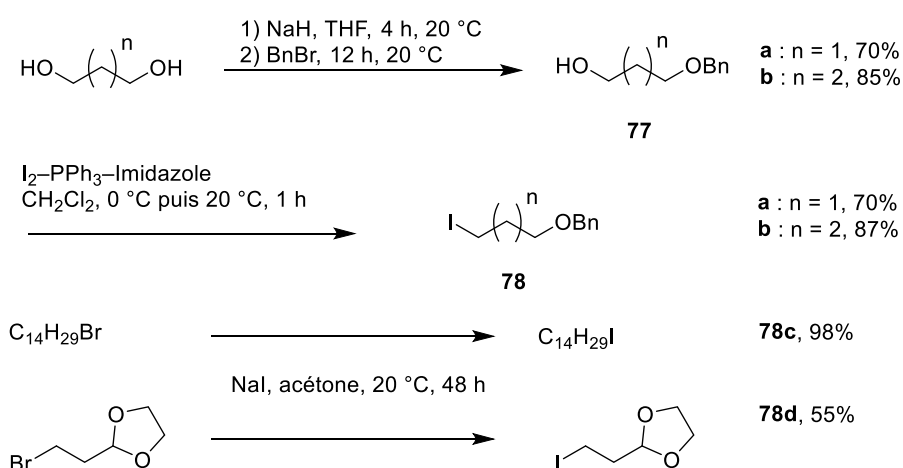


Schéma 31 : Synthèse des dérivés iodés **78a-d**

2. Synthèse des iodures d'alkyles **78c** et **78d** par substitution nucléophile par le NaI

Les composés iodés **78c** et **78d** ont été obtenus à partir des dérivés bromés commerciaux correspondant. Après avoir été préalablement séché sous vide pendant 1 h à 50 °C, 2 équivalents de NaI ont été solubilisés dans l'acétone avant l'addition des bromures d'alkyle correspondants. Après 72 h d'agitation et une purification sur colonne de silice, les produits **78c** et **78d** sont récupérés avec des rendements respectifs de 98% et 55%. Le produit **78d** présente une certaine instabilité sur silice expliquant un rendement plus faible pour cette réaction.

3. Synthèse du dérivé phénanthrène bromé **78e**

a. Plan de synthèse à partir de l'ester cinnamique **80**

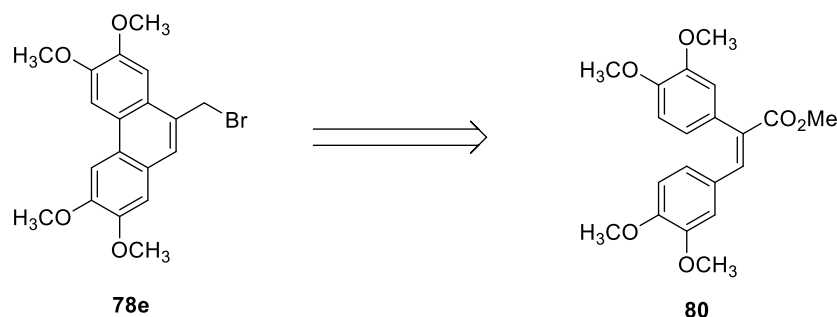


Figure 135 : Synthèse du dérivé bromé **78e** à partir de l'ester cinnamique **80**

Dans la littérature, le cinnamate **79** est généralement obtenu par condensation de l'acide 3,4-diméthoxyphényle acétique avec le vératraldéhyde selon une réaction de Perkins que l'on réalise en présence de triéthylamine et d'anhydride acétique (Schéma 32). Après 48 h de chauffage, nous avons constaté la formation d'une quantité importante de goudrons. Une solution de carbonate de sodium est utilisée pour traiter le brut réactionnel puis de l'acide chlorhydrique concentré est ajouté pour acidifier le milieu. L'acide cinnamique **79** précipite à pH = 4 sous la forme d'un seul diastéréoisomère avec un rendement maximal compris entre 25% et 30%. L'estérification de ce composé est ensuite réalisée dans le méthanol en présence d'acide sulfurique en quantité catalytique pour former l'ester **80** avec un rendement de 40%.

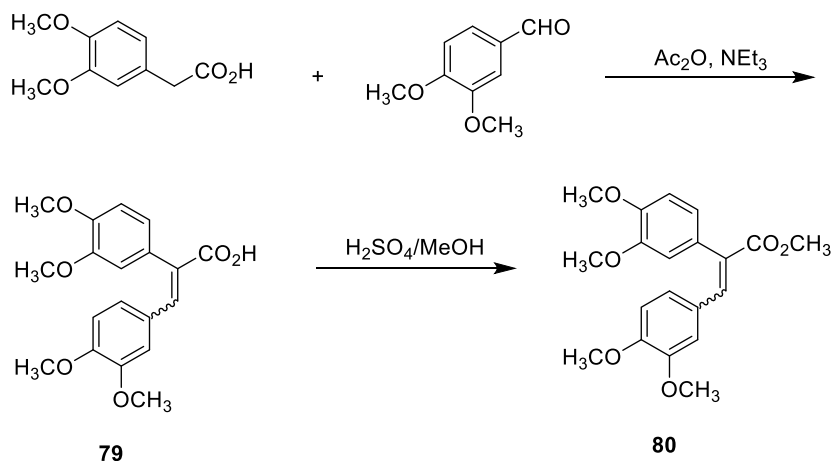


Schéma 32 : Synthèse de l'acide cinnamique **80** selon la réaction de Perkins

Les faibles rendements obtenus avec cette méthode nous ont poussé à essayer une synthèse multi-étapes décrite par Ozeki pour la synthèse d'esters α,β -insaturés. La condensation se fait alors entre l'ester méthylique de l'acide 3,4-diméthoxyphényle acétique et le vératraldéhyde. La première étape consiste donc en une estérification de notre acide dans le méthanol en présence de 2 équivalents de chlorure de thionyle. On remarquera en RMN ^1H , l'équivalence magnétique fortuite de tous les protons aromatiques qui résonnent sous la forme d'un singulet (3 H) à $\delta = 6.78$ ppm.

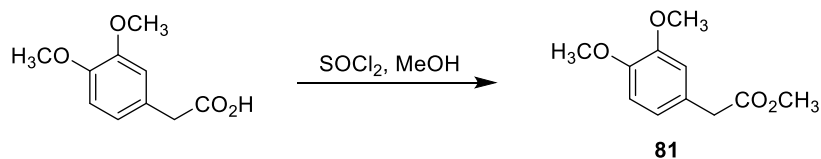


Schéma 33 : Préparation de l'ester **81**

b. Synthèse aldolique du composé **82**

La seconde étape est une réaction d'aldolisation entre l'ester **81** et le vératraldéhyde présentée dans le schéma 34. Pour cela, il convient de former l'énolate **A** par addition de 1,5 équivalents de LDA sur l'ester **81** dans le THF agité à -80°C pendant 40 min. Le vératraldéhyde en solution dans du THF est ensuite ajouté.

Différentes conditions ont été testées en modifiant la stœchiométrie des réactifs, la durée de la réaction ou la température du milieu réactionnel. Pour chaque expérience, le pourcentage de conversion de l'ester **81** en aldol **82** est mesuré par RMN du proton en effectuant les rapports des intégrations relatives des protons **H-3** qui résonnent sous la forme de deux doublets à $\delta = 5.10$ et 5.20 ppm et du proton aldéhydique du vératraldéhyde (Tableau 46).

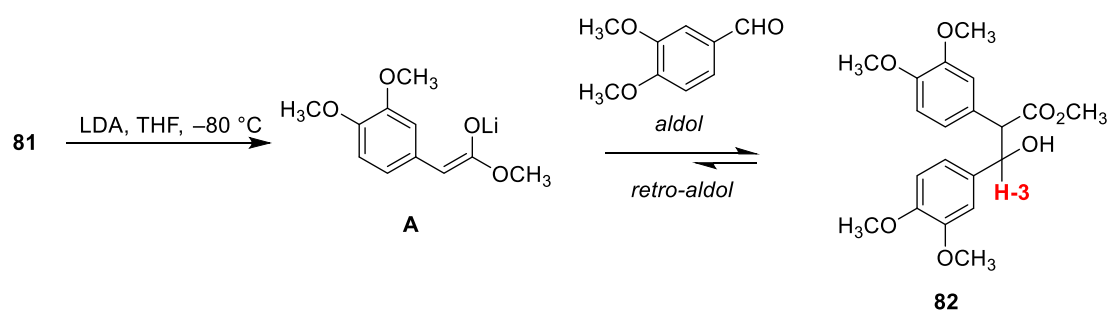


Tableau 46 : Réaction d'aldolisation entre l'ester **81** et le véatraldéhyde

Entrée	81 (équiv)	Et ₂ O•BF ₃ (équiv)	Temps	Température (°C)	Conversion (%)
1	1,3	–	1 h	–20	10
2	1,3	–	12 h	0	70
3	1,3	–	24 h	0	50
4	2	–	24 h	0	75
5	1	1	1 h	–30	50
6	1,3	2	3 h	0	44
7	1,2	1	15 min	–80	54
8	1,2	1	30 min	–60	55
9	1,2	0,2	5 min	–80	90
10	1,1	0,10	15 min	–80	87
11	1,2	0,15	8 min	–80	95

La première expérience à –20 °C permet de constater une faible conversion après 1h de réaction (entrée 1). Cette hypothèse est confirmée par l'entrée 2 qui montre qu'un traitement prolongé de 12 h fournit un taux de conversion de 70%. Il semble qu'une durée d'expérience supérieure (ici 24 h dans l'entrée 3) provoque une diminution de ce taux de conversion avec une stabilisation à 50 %. Cette dernière constatation est en faveur de la présence d'une réaction de rétro-aldolisation et donc de la formation d'un équilibre entre les deux composés en présence. De l'éthérate de BF₃ a alors été ajouté au milieu dans le but d'améliorer les rendements, il a tout d'abord été introduit en quantité stoechiométrique (entrée 5).

Après 1 h d'agitation on constate un taux de rendement amélioré à 50 % par rapport à l'entrée 1. Des essais réalisés sur des délais plus courts de 15 et 30 min à –80 et –60 °C (entrées 7 et 8) montrent un taux de conversion comparable et donc une stabilisation de la réaction à l'équilibre. Ces données indiquent que l'éthérate de BF₃ favorise effectivement la réaction d'aldolisation en se complexant sur le groupement aldéhyde car on observe une accélération de la formation du composé **82**. Cependant cela montre également qu'il induit la réaction rétro-aldol. L'acide de Lewis a ensuite été ajouté en quantité sous-stœchiométrique pour remédier à cet inconvénient et l'expérience a été réalisée à des températures basses (entre –60 et –80 °C) et sur une très courte période (entrées 8 à 10) pour favoriser une complexation sélective sur la fonction aldéhyde. Le meilleur taux de conversion (entrée 11 ; 95 %) a été obtenu avec 0,15 équivalent d'éthérate de BF₃ pour 1,2 équivalent d'ester **81** ajouté sur un équivalent de véatraldéhyde et en effectuant la réaction à –80 °C. Le traitement de la manipulation

semble également avoir une grande importance sur le rendement final. En effet, il semble que les meilleurs rendements soient obtenus lorsque le mélange réactionnel *est versé rapidement* sur une solution de chlorure d'ammonium à 10% dans l'eau. L'influence de ce paramètre est actuellement à l'étude au laboratoire.

Lorsque la réaction est effectuée en présence d'éthérate de BF_3 , l'aldol **82** est obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères selon un rapport 1 :1. Le brut réactionnel est traité puis agité dans l'éther diéthylique ce qui conduit à la formation d'un précipité blanc (30%, PF = 140 °C) qui correspond au composé R^*,R^* -**82** dont la configuration relative a été déterminée en comparant les données spectrales obtenues expérimentalement avec celles de la littérature.

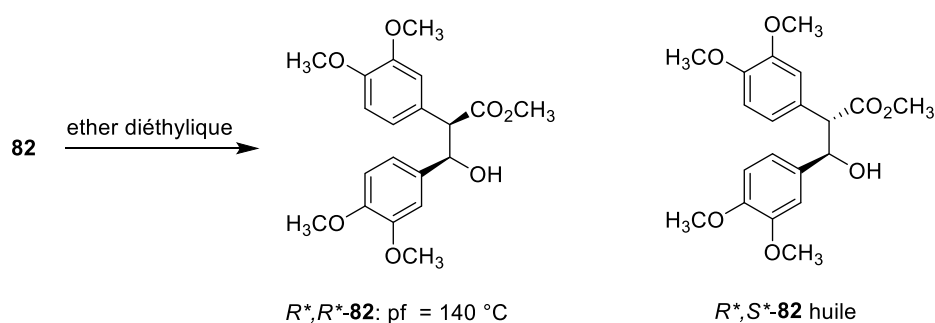


Schéma 35 : Séparation des diastéréoisomères par cristallisation fractionnée.

Les composés **82** ont ensuite été acétylés par de l'anhydride acétique en présence d'une quantité catalytique de DMAP dans la pyridine. L'excès d'anhydride acétique est détruit après 1 h d'agitation par l'ajout de 10 équivalents de méthanol, la fin de la réaction est contrôlée par RMN ^1H .

L'addition d'éther diéthylique sur le brut réactionnel provoque la précipitation du composé acétylé R^*,R^* -**83** sous la forme d'une poudre blanche (30%, PF = 174 °C).

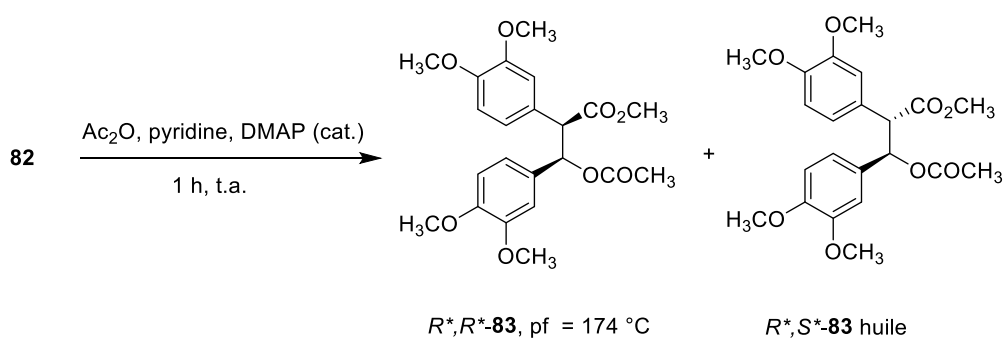


Schéma 36 : Acétylation et cristallisation fractionnée du composé R^*,R^* -**83**

L'ester cinnamique **80** est finalement obtenu par chauffage à reflux du composé **83** (sous la forme d'un mélange de deux diastéréoisomères) dans le toluène en présence de DBU pendant 3 h. Ceci provoque la perte d'une molécule d'acide acétique et donne le composé **80** avec un rendement de 80% calculé à partir du vératraldéhyde. La purification est simplement réalisée par recristallisation dans l'éther

diéthylique et l'analyse par RMN montre que seul le diastéréoisomère de configuration *E* de l'ester **80** est obtenu.

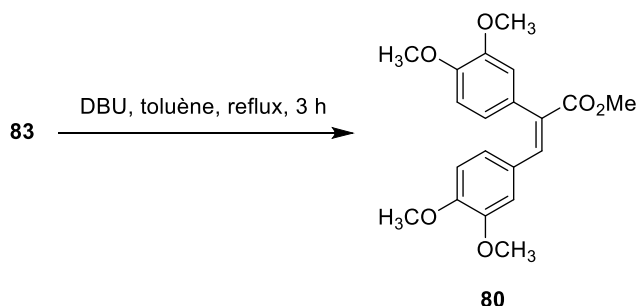


Schéma 37 : Synthèse de l'ester cinnamique **80**

c. Synthèse du phénanthrène **84**

Le phénanthrène **84** a été obtenu par réaction de Scholl à partir de l'ester cinnamique **80** par oxydation au DDQ (dichloro-dicyano-benzoquinone) (Schéma 38). La réaction est réalisée dans le dichlorométhane à 0 °C en présence de quelques gouttes d'acide méthane sulfonique. L'ajout d'un équivalent du réactif oxydant dans le milieu se traduit par l'apparition d'une couleur sombre témoignant de la formation d'espèces radicalaires et d'un complexe de transfert de charge en solution. Après 30 minutes d'agitation, une solution saturée de K_2CO_3 est ajoutée pour arrêter la réaction. Le brut réactionnel est ensuite analysé par RMN du proton et montre la présence uniquement de 4 singulets avec des déplacements chimiques compris entre 7.74 et 8.64 ppm. La réaction est quantitative et pour mieux comprendre les phénomènes mis en jeu une étude électrochimique par voltammétrie cyclique a été réalisée.

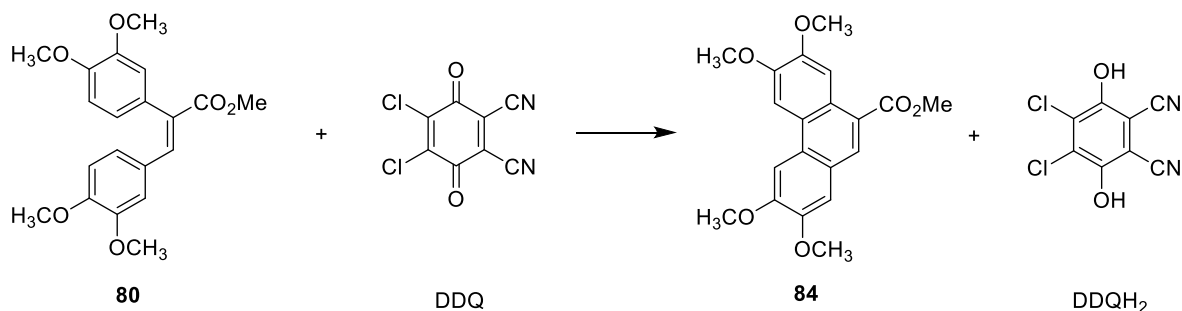


Schéma 38 : Synthèse du phénanthrène **84** par réaction de Scholl

L'étude électrochimique a été réalisée à l'aide d'une électrode de carbone vitreux plongeant dans le dichlorométhane en présence d'hexafluorophosphate de tétrabutylammonium (Bu_4NPF_6) comme électrolyte support. Le premier voltampérogramme cyclique (en bleu, figure 136) a été réalisé à une vitesse de balayage de 0,1 V/s en l'absence de substrat à oxyder et montre l'absence de pic d'oxydation entre 0 V et 2,5 V. L'ajout de l'ester cinnamique **80** à une concentration de 5 mM se traduit par l'apparition de deux pics d'oxydation à $E_{p1}^{ox} = 1,9$ V et $E_{p2}^{ox} = 2,1$ V avec un pic cathodique sur le balayage retour à $E_{p1}^{red} = 1,6$ V (en rouge, figure 136).

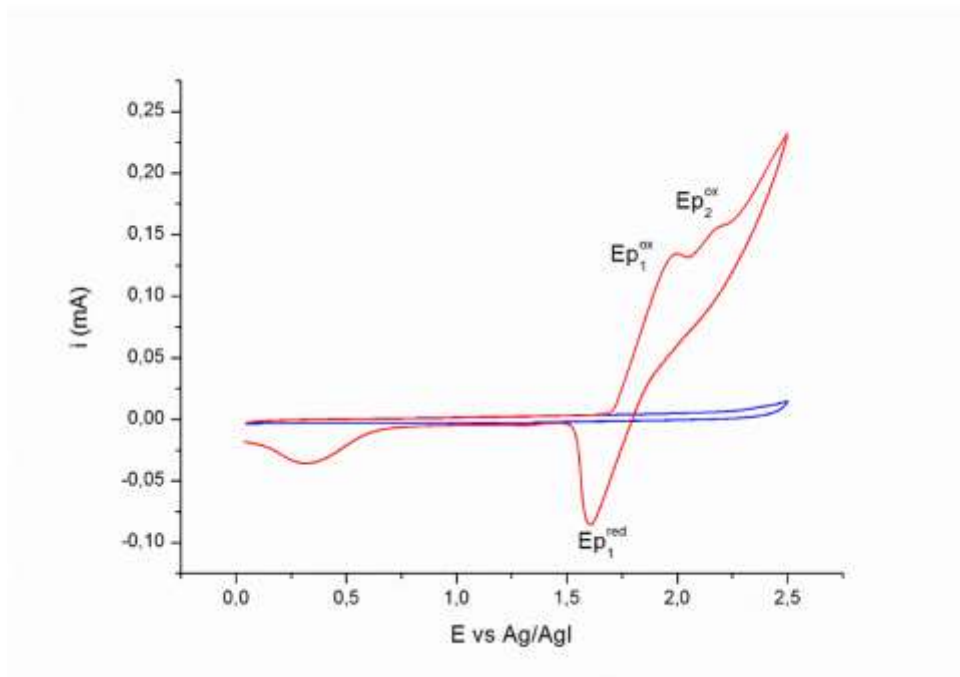


Figure 136 : Voltampérogramme cyclique de la solution seule (—). Voltampérogramme cyclique de l'ester cinnamique **80** (—).

Pour compléter ces premières informations, nous avons décidé de réaliser l'étude électrochimique du phénanthrène **84** dans les mêmes conditions opératoires. Le voltampérogramme cyclique (Figure 137) obtenu sur une solution de phénanthrène **84** montre la présence d'un pic d'oxydation assez mal défini à un potentiel anodique $E_{p2}^{ox} = 2,1$ V et surtout un pic cathodique au balayage retour à $E_{p1}^{red} = 1,6$ V.

On constate surtout l'absence du premier pic anodique à $E_{p1}^{ox} = 1,9$ V qui correspond à l'oxydation de l'ester cinnamique en phénanthrène **84** selon un processus biélectronique irréversible. Nous pouvons également affirmer que le phénanthrène **84** ainsi obtenu est susceptible de s'oxyder à des potentiels plus anodiques en radical cation **84**^{•+} stable en solution qui présente un pic cathodique au balayage retour.

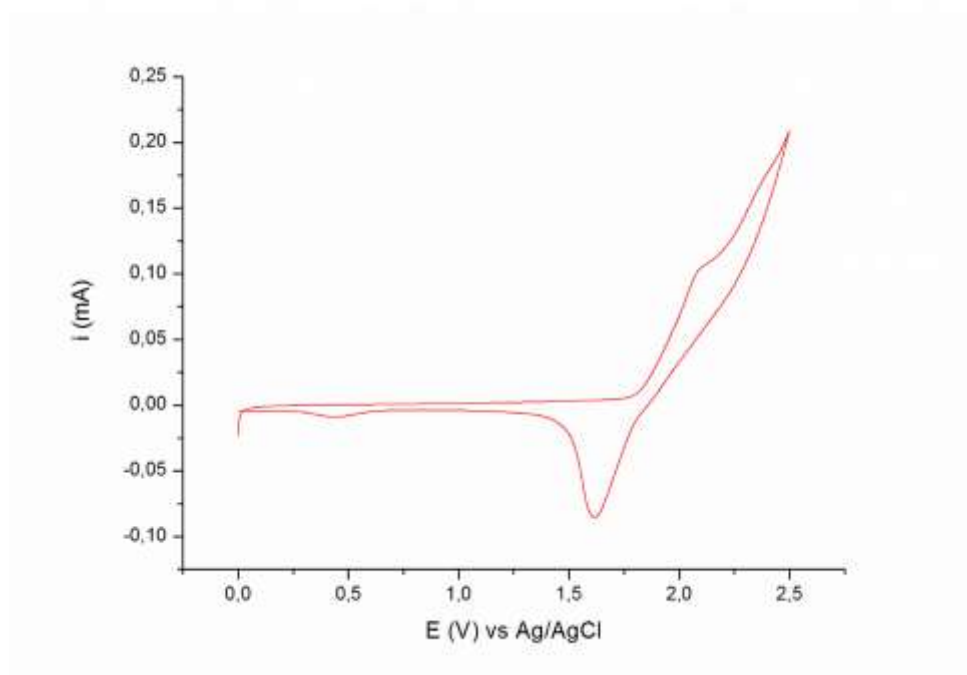


Figure 137 : Voltampérogramme cyclique du phénanthrène **84** (-).

La dernière expérience tend à confirmer les hypothèses préalablement formulées. En effet lorsque le balayage retour est effectué à un potentiel de 2,1 V lors de l'enregistrement du voltampérogramme de l'ester cinnamique **80** (figure 137, courbe bleue), nous constatons la présence d'un seul pic anodique $E_{p1^{ox}} = 1,9$ V avec la quasi disparition du pic cathodique au balayage retour. Dans ce cas, seule l'oxydation de l'ester cinnamique en phénanthrène **84** est enregistrée.

Le mécanisme du couplage est représenté sur le schéma 39. Le premier transfert biélectronique conduit vraisemblablement à la formation du composé **B** en raison des potentiels d'oxydation quasi identiques des deux cycles aromatiques. La réaction de couplage des deux radicaux cations conduit à la formation du composé **C** qui par perte de deux protons évolue spontanément vers le phénanthrène **84**. On remarquera également que dans les conditions de l'expérience réalisée en présence de DDQ, le produit de la réaction n'est pas oxydé en radical cation correspondant ce qui laisse penser que les mécanismes de transfert électronique entre l'oxydant chimique et par voie anodique possèdent des sélectivités différentes.

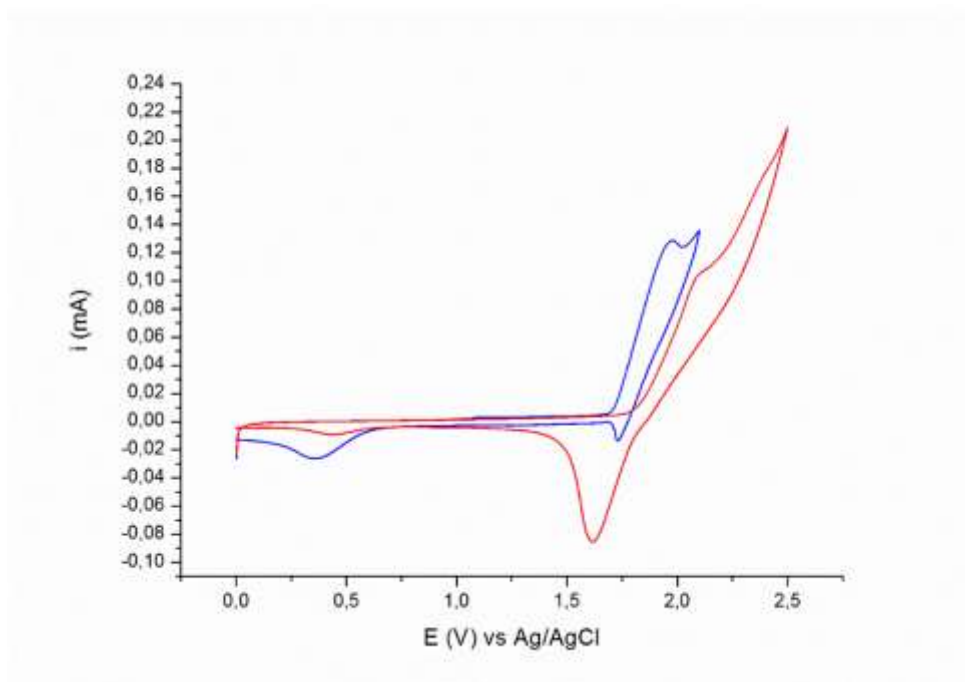


Figure 138 : Voltampérogrammes cycliques, **a)** phénanthrène **84** de 0 à 2,5 V, **b)** ester cinnamique **80** de 0 à 2,1 V.

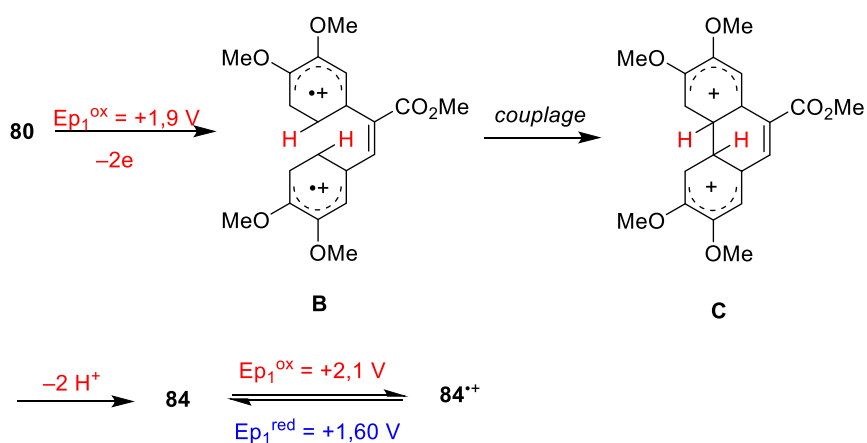


Schéma 39 : Mécanisme proposé pour la synthèse et les propriétés redox de la phénanthrène **84**.

d. Synthèse du dérivé bromé **78e**

Dans un premier temps la fonction ester du phénanthrène **84** a été réduite en alcool **85** par action d'un excès de LiAlH_4 , puis la synthèse du dérivé bromé **78e** a été réalisée à l'aide de PBr_3 .

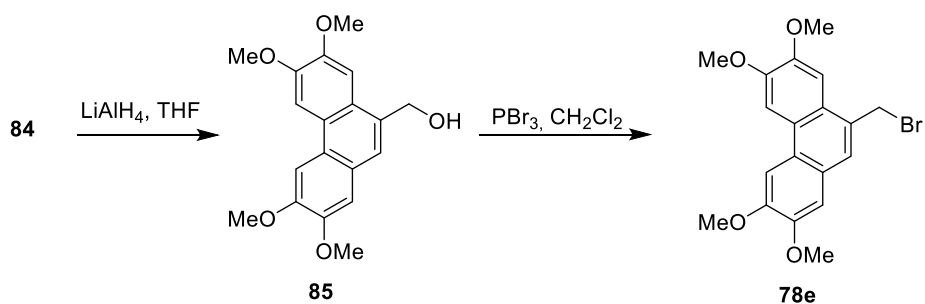


Schéma 40 : Synthèse du dérivé bromé **78e**

C. Synthèse des α -aminonitriles **86a-e**

La suite de notre travail a consisté à alkyler le *N,N*-dibenzylaminoacétonitrile **76** par les différents précurseurs iodés (**78a-d**) précédemment synthétisés. Cette étape est réalisée en présence de LDA formée par l'ajout d'une solution commerciale de *n*-BuLi (1,6 M) à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sur une solution de diisopropylamine dissoute dans le THF.

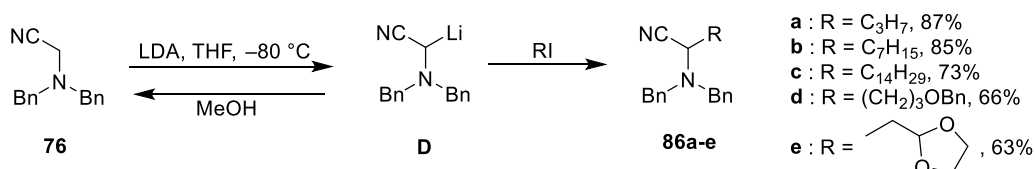


Schéma 41 : Synthèse des α -aminonitriles **86a-e**

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier la stabilité de l'anion **D** formé lors de la première étape de déprotonation. L'ajout rapide (à l'aide d'une canule) d'un équivalent de LDA sur une solution d' α -aminonitrile **76** dans le THF maintenue à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se traduit par l'apparition progressive d'une couleur rouge caractéristique de la formation de l'anion attendu. Le milieu est maintenu à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 2 h avant d'ajouter un excès de méthanol. Après traitement, le brut réactionnel est purifié sur colonne de gel de silice conduisant à la récupération du produit de départ avec un rendement de 75%. Ce rendement relativement faible pour une telle réaction montre que l' α -aminonitrile métallé **D** est relativement instable à des températures supérieures à $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ et est donc susceptible de polymériser. Pour pallier cet inconvénient, l'étape de déprotonation sera désormais réalisée sur une heure à une température n'excédant pas $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cette réaction a ensuite été optimisée en utilisant le 1-iodopropane comme électrophile. Après ajout de 1,2 équivalents de LDA, le milieu est de nouveau refroidi à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 1,1 équivalents de 1-iodopropane sont alors ajoutés sur l'anion **D** en solution. On observe alors une décoloration progressive du milieu avec la remontée en température ainsi que l'apparition transitoire d'un précipité blanc entre -30 et $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ qui correspond à l'iodure de lithium formé lors de la réaction.

La réaction est ensuite stoppée par ajout d'eau puis d'éther éthylique, le brut récupéré dans la phase organique est ensuite purifié sur colonne de silice. Le composé **86a** est alors obtenu avec un rendement de 87%. Le spectre RMN ¹H confirme la structure du composé attendu et nous pouvons y constater que les protons benzyliques qui résonnaient initialement sous la forme d'un singulet apparaissent désormais sous la forme d'un système AB ($J = 13,8\text{ Hz}$) $\delta = 4,0$ et $3,4\text{ ppm}$ en raison de la présence d'un carbone asymétrique sur la molécule.

Les composés **86b-e** sont obtenus avec des rendements compris entre 63% à 81% en suivant le même protocole opératoire. Le composé **86d** a été obtenu sous forme de cristaux par cristallisation lente dans le toluène, ceux-ci ont ensuite été analysés par diffraction des rayons X.

D. Synthèse du précurseur azoté de la *rac*-bgugaine

L'étape suivante de la synthèse de la *rac*-bgugaine consiste en une seconde alkylation de l'aminonitrile **86d** avec le 1-iodotétradécane **78c** (Schéma 42). Le procédé est le même que celui décrit pour la première étape d'alkylation c'est-à-dire une déprotonation avec 1,2 équivalent de LDA réalisée à -80°C dans le THF. On observe comme précédemment l'apparition d'une couleur rouge. Après 2h d'agitation le milieu est de nouveau refroidi à -80°C puis l'agent alkylant est ajouté provoquant une décoloration du milieu. La réaction est stoppée par ajout d'éthanol et le brut réactionnel est analysé par RMN ^1H sur laquelle on peut constater la quasi-disparition des signaux correspondants aux produits de départ. La décyanation réductrice est ensuite réalisée in situ sans passer par l'étape de purification du composé **87a** du fait de son instabilité sur silice (menant à la cétone correspondante). On ajoute alors 4 équivalents de NaBH_4 au milieu réactionnel qui est alors constitué d'un mélange de THF et d'éthanol en proportion 1/1.

Le produit de décyanation **88a** est obtenu avec un rendement de 15% ce qui s'explique par un encombrement stérique très important du dérivé **78c** gênant l'incorporation de cette chaîne en une seule étape. Cependant, l'amine **88a** est très bien séparée du brut réactionnel par chromatographie sur gel de silice avec un mélange éluant d'éther diéthylique et d'éther de pétrole (2/98).

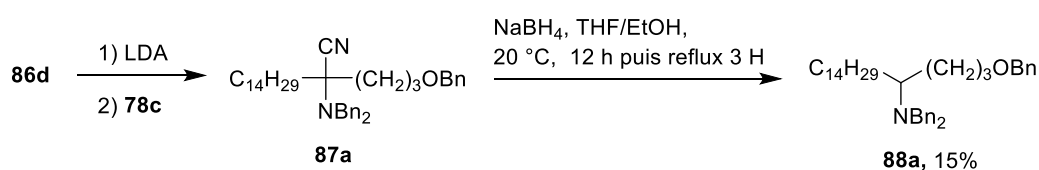


Schéma 42 : Synthèse du précurseur azoté **88a** de la *rac*-bgugaine

On peut constater sur le spectre obtenu par analyse RMN du proton que les protons benzyliques apparaissent sous la forme d'un système AB ($J = 13.6 \text{ Hz}$) centré à $\delta = 3.6$ du fait de la dissymétrie des chaînes alkyles portées par le carbone C2.

Etant donné les faibles rendements obtenus lors de l'alkylation de l' α -aminonitrile **86d**, un essai d'alkylation par le 1-iodoheptane a été réalisé (Schéma 43). Après l'addition de 1,2 équivalent de LDA sur l' α -aminonitrile **86d**, l'ajout de 1,1 équivalent de 1-iodoheptane se traduit par la décoloration du milieu. Après évaporation des solvants, la décyanation réductrice est effectuée sur le brut réactionnel par ajout de 4 équivalents de NaBH_4 . Le produit **88b** est alors obtenu avec un rendement de 47 %. Ces premiers résultats montrent que l'étape d'alkylation semble se dérouler avec de moins bons rendements lorsque l' α -aminonitrile possède une chaîne latérale encombrée.

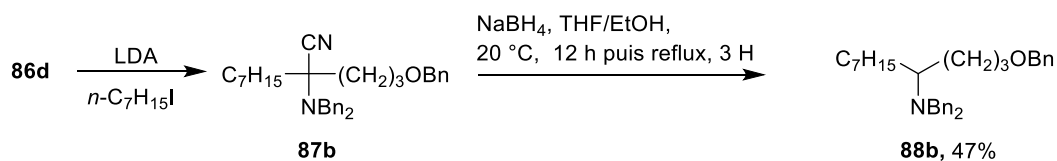


Schéma 43 : Synthèse du précurseur azoté **88b**

E. Synthèse du précurseur azoté de la *rac*-coniine

Le précurseur de la *rac*-coniine **88c** est obtenu en utilisant la même suite réactionnelle que pour la synthèse du composé **88a** (Schéma 44). L'α-aminonitrile **86a** est déprotoné par ajout de 1,3 équivalent de LDA puis condensé avec le dérivé iodé **78b**. La décyanation réductrice est également réalisée in situ par 4 équivalents de NaBH₄ et mène à l'amine **88c**. Cette réaction est partielle même après une agitation de l'échantillon pendant 24 h à température ambiante. Pour compléter la réaction, le milieu a été chauffé à reflux pendant 3 h. Après traitement, et purification du mélange réactionnel sur colonne de gel de silice, l'amine **88c** est obtenue avec un rendement de 95%.

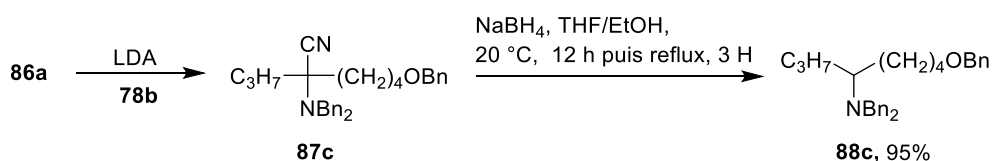


Schéma 44 : Synthèse du précurseur azoté **88c** de la *rac*-coniine

Des essais d'hydrogénolyse ont ensuite été réalisés en commençant par agiter une solution éthanolique du composé **88c** sous une pression d'hydrogène de 5 bars, en présence de palladium sur charbon à 10%. Cependant, avec ce protocole on constate la présence du groupement OBn et le degré d'avancement de la réaction varie de 0 à 50% suivant les expériences, ce qui peut être expliqué par un empoisonnement progressif du catalyseur au palladium. Nous avons ensuite effectué cette réaction avec du catalyseur de Pearlman dans le méthanol, puis dans un mélange éthanol/méthanol (3 : 7). De cette manière, il est possible d'obtenir des taux de conversion plus reproductibles en présence de catalyseur de Pearlman (10% en masse), sous une pression d'hydrogène de 4 bars pendant 24 h.

L'amine primaire **89c** n'est pas purifiée et une réaction de protection de l'amine par un groupement *tert*-butoxycarbonyle est réalisée sur le brut réactionnel. Le carbamate **90c** est hydrogéné quantitativement en alcool **91c** sous une pression d'hydrogène de 5 bars dans le méthanol, en présence de Pd/C à 10% pendant 72 h. La poursuite de la synthèse de la coniine est actuellement en cours de finalisation au laboratoire.

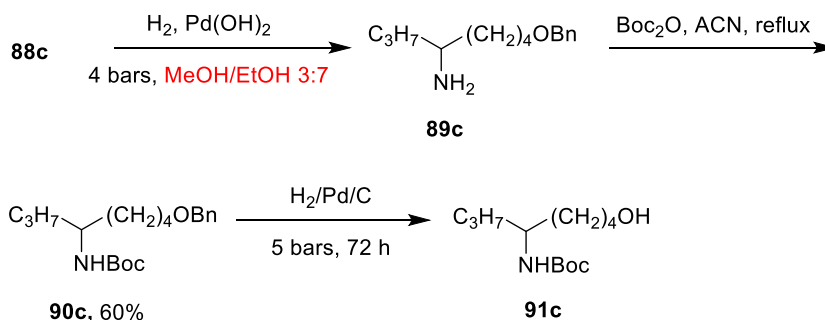


Schéma 45 : Synthèse de la *rac*-coniine à partir du précurseur **91c**

F. Essai de cyclisation en pyrrolidine

Un essai de cyclisation a néanmoins été réalisé sur le précurseur **88b** de la 2-heptyl-pyrrolidine (Schéma 46). Celui-ci a tout d'abord été débenzylé par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (avant optimisation avec le réactif de Pearlman). L'aminoalcool **92** a ensuite été protégé par action de Boc_2O en présence de DIPEA fournissant ainsi 69% du composé **91b**.

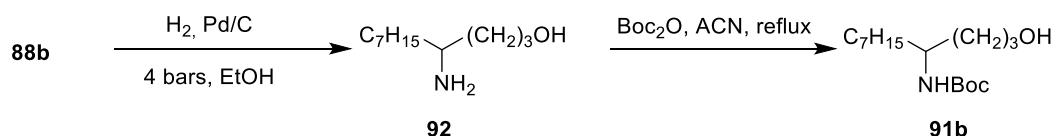


Schéma 46 : Synthèse du composé **91b**

Pour réaliser l'étape de cyclisation, la fonction alcool du composé **91b** a été substituée par un atome d'iode par la réaction d'Appel comme décrit pour la synthèse des dérivés iodés **78** pour former le composé **93** avec un rendement de 56 %.

Le produit **93** est ensuite dissous dans le THF puis 2 équivalents de NaH sont ajoutés au mélange réactionnel. Après 12 h d'agitation, quelques gouttes d'éthanol sont versées sur le milieu réactionnel pour neutraliser l'excès de NaH et la pyrrolidine **94** est obtenue avec un rendement de 70%. Cette étape de la synthèse n'a actuellement pas été optimisée mais donne déjà de bons rendements.

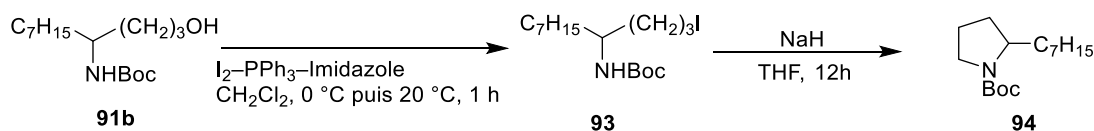


Schéma 47 : Synthèse de la N-Boc-2-heptyl-pyrrolidine **94**

Conclusion

Ces études préliminaires montrent que la stratégie retenue doit pouvoir mener à la synthèse des cibles choisies. Certaines étapes doivent cependant être améliorées tant en ce qui concerne les rendements, que la sélectivité. A ce titre, les travaux actuellement réalisés au laboratoire portent sur l'utilisation de nouveau groupements protecteurs de la fonction alcool terminale dans le but d'effectuer une déprotection sélective de l'atome d'azote lors de la réaction d'hydrogénolyse. Nous avons également remarqué que cette réaction doit être poursuivie pendant au moins 7 jours pour que la réaction aille à son terme. Dans ce cas, les amines primaires sont obtenues de manière quantitative sans purification ultérieure.

Scène 3 : Matériels et méthodes

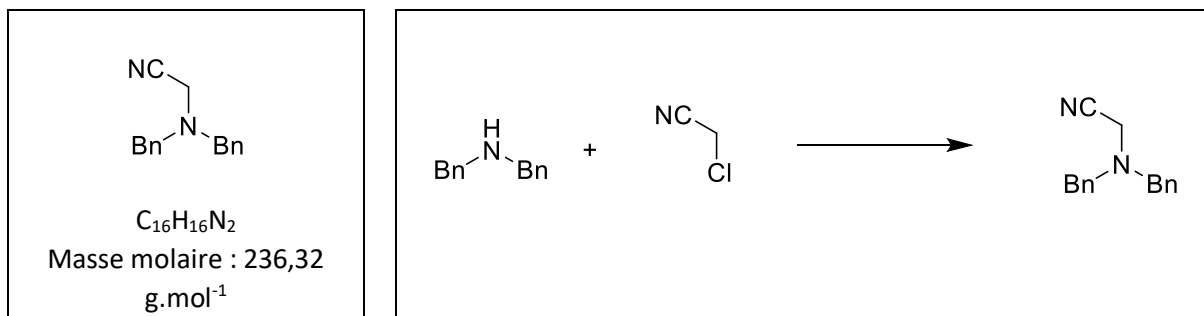
A. Méthodes d'analyse.

Les chromatographies sur couches minces ont été réalisées sur des plaques de silice Silica Gel 60 F254 Plates (Merck) et la révélation est faite par une solution de KMnO_4 à l'exception du 1-iodoheptane et du 1-iodotétradécane qui ont été révélés par de l'acide phosphomolybdique. Les chromatographies sur colonne ont été effectuées avec du gel de silice 60 ; 0,063-0,200 nm (Merck). Les mesures des points de fusion (PF en $^{\circ}\text{C}$) ont été effectuées sur un banc chauffant Köffler. Les spectres RMN ont été réalisés à 300 MHz (^1H) et 75 MHz (^{13}C). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par millions (ppm). Le solvant est indiqué entre parenthèse et les constantes de couplages (J) sont indiquées en Hz. L'indexation des spectres a été réalisée en utilisant les abréviations suivantes : s : singulet, d : doublet, t : triplet, q : quadruplet, m : multiplet, l : large.

B. Protocoles opératoires et analyse spectrale des composés obtenus.

1. Synthèse de l' α -aminonitrile **76**.

2-(dibenzylamino)-acétonitrile : **76**



Dans un tube de Schlenk, on verse 100 mL d'acétonitrile qui sont désaérés par barbotage d'argon pendant 15 mn. On introduit ensuite successivement: 10,0 g (9,7 mL, 50,69 mmol) de dibenzylamine ; 6,12 g (5,15 mL, 81,06 mmol, 1,60 equiv.) de chloroacétonitrile ; 9,82 g (13,28 mL, 75,98 mmol, 1,5 equiv.) de base de Hünig (DIPEA) et 0,5 g (10% en masse) de iodure de tétrabutylammonium. La solution est agitée pendant 72 h à température ambiante sous atmosphère d'argon et à l'abri de la lumière. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour conduire à une pâte qui est agitée dans un mélange biphasique d'éther diéthylique et d'eau contenant 2 g de bisulfite de sodium. Après décoloration de la solution, la phase organique est décantée puis évaporée sous vide. Le brut réactionnel est dissous dans 20 mL d'un mélange de dichlorométhane et de cyclohexane (1/1). La solution est déposée sur colonne de gel de silice (100 g) puis les composés sont élués successivement par un mélange d'éther de pétrole et d'éther diéthylique (95/5) puis 90/10. L'excès de chloroacétonitrile est élué dans les premières fractions, puis l' α -aminonitrile **76** est ensuite obtenu sous la forme d'une huile qui, après évaporation poussée des solvants pendant 2 h sous pression

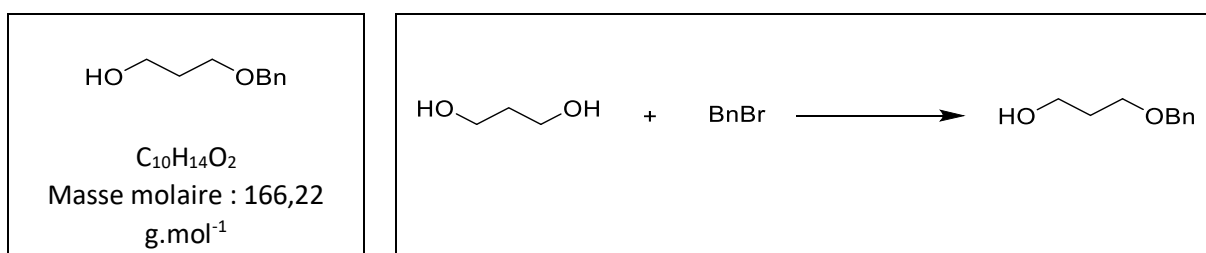
réduite, cristallise immédiatement à 20 °C pour conduire au composé **76** (10,6 g, 88%) qui est ensuite broyé au mortier sous la forme d'une poudre blanche qui fond à 53 °C. $R_f = 0,80$ (EP/E, 80 :20)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 3.40$ (s, 2 H), 3.78 (s, 4 H), 7.10–7.36 (m, 10 H) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 40.9, 58.5, 115.8, 128.4, 129.2, 129.5, 137.7$.

2. Synthèse des alcools **77a,b**.

3-(benzyloxy)-propan-1-ol : **77a**

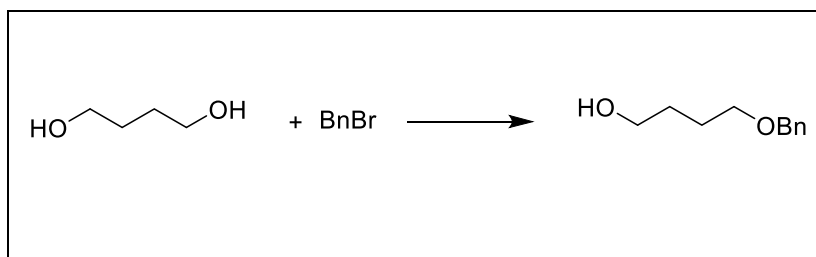
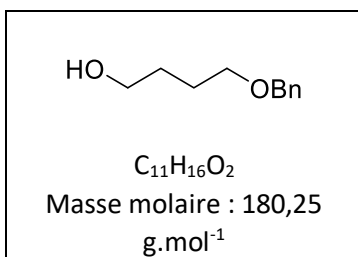


Dans un tube de Schlenk placé sous argon, on dissout 40 g (0,52 mole, 5,0 equiv.) de 1,3-propane-diol dans 100 ml de THF anhydre. On ajoute progressivement, à la spatule sous agitation vive et sous atmosphère d'argon, 5 g (0,12 mole, 1,2 eq) de NaH dispersé à 60% dans de la paraffine. La solution est agitée à température ambiante pendant 1 heure jusqu'à arrêt du dégagement d'hydrogène. On note la précipitation de l'alcoolate de sodium qui apparaît sous la forme d'une pâte incolore. On ajoute ensuite lentement à la seringue 18,1 g (0,10 mole, 12,6 ml, 1,0 equiv.) de bromure de benzyle à la suspension ainsi obtenue qui est laissée sous agitation pendant 12 h puis portée au reflux du THF pendant 4 h. Le solvant est évaporé sous vide puis le résidu obtenu est dissous dans de l'éther diéthylique. La phase organique est lavée 4 fois par 100 mL d'eau de manière à retirer l'excédent de 1,3-propane-diol. Le solvant organique est évaporé sous pression réduite puis l'huile (15,0 g) ainsi obtenue est soit purifiée par distillation sous pression réduite (70 °C, 10^{-2} mbar) soit par chromatographie sur colonne de gel de silice (EP/E, 50 :50) pour conduire à 12,25 g (70%) du composé **77a** sous la forme d'une huile incolore.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 1.87$ (quint., $J = 5.8$ Hz, 2 H), 2.38–2.35 (s, large, 1 H), 3.68 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H), 3.82 (t, $J = 5.8$ Hz, 2 H), 4.54 (s, 2 H), 7.26–7.37 (m, 5 H) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 32.2, 61.3, 69.0, 73.2, 127.69, 127.72, 128.5, 138.2$.

4-(benzyloxy)-butan-1-ol : 77b



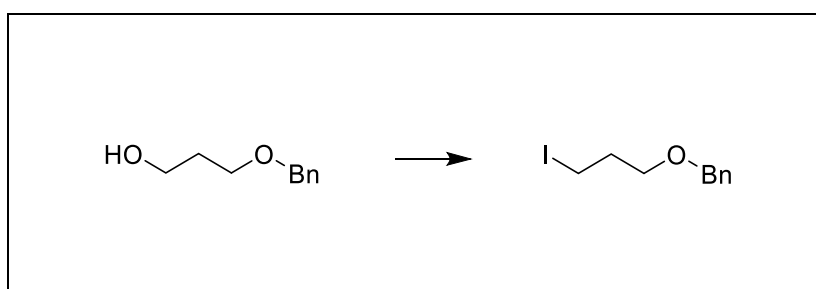
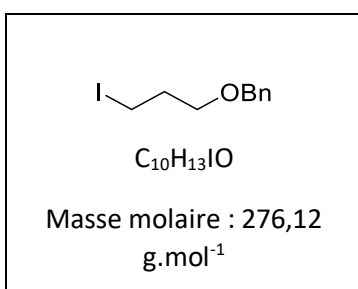
Dans un tube de Schlenk placé sous argon, on dissout 45 g (0,50 mole, 8,9 équiv.) de 1,4-butane-diol dans 100 ml de THF anhydre. La solution est refroidie à 0 °C puis on ajoute progressivement à la seringue sous agitation vive et sous atmosphère d'argon, 28 mL (0,07 mol, 1,25 équiv.) d'une solution de *n*-BuLi 2,5 M. La solution est ensuite agitée à température ambiante pendant 5 minutes. On note la précipitation de l'alcoolate de lithium au début de l'ajout de *n*-BuLi. La solution est portée à température ambiante puis on ajoute lentement à la seringue 9,6 g (56,1 mmol, 6,65 ml, 1,0 equiv.) de bromure de benzyle à la suspension ainsi obtenue qui est laissée sous agitation pendant 12 h puis portée au reflux du THF pendant 4 h. Le solvant est évaporé sous vide puis le résidu obtenu est dissous dans de l'éther diéthylique. La phase organique est lavée 4 fois par 100 mL d'eau de manière à retirer l'excédent de 1,4-butane-diol. Le solvant organique est évaporé sous pression réduite puis l'huile (9,0 g) ainsi obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (EP/E, 50 :50) pour conduire à 8,60 g (85%) du composé **77b** sous la forme d'une huile incolore.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 1.63–1.79 (m, 4 H), 2.38–2.35 (s, large, 1 H), 3.54 (t, *J* = 5.8 Hz, 2 H), 3.65 (t, *J* = 5.8 Hz, 2 H), 4.54 (s, 2 H), 7.26–7.37 (m, 5 H) ppm.

HRMS ($C_{11}H_{16}O_2$, ESI⁺, MeOH, [M + H]⁺) calculé pour 181,1150 ; trouvé 181,1223.

3. Synthèse des iodures d'alkyles **78a,b**.

((3-Iodo-propoxy)methyl)-benzene : 78a

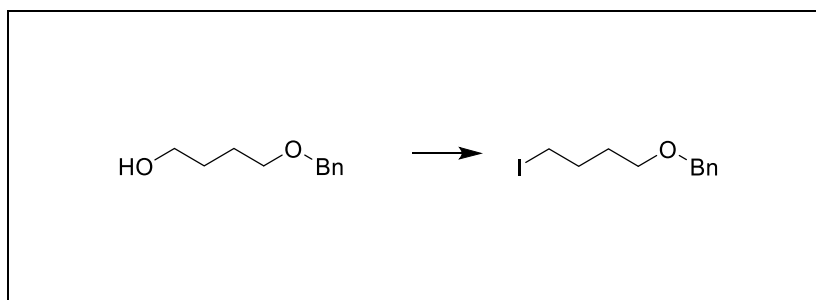
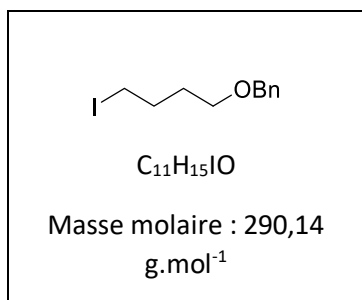


L'alcool **77a** (2,00 g, 12,03 mmol) est dissout dans 150 mL de dichlorométhane en présence de 1,51 g (22,18 mmol, 1,8 equiv) d'imidazole et de 3,8 g (14,49 mmol, 1,2 equiv) de triphénylphosphine. La solution est refroidie à 0 °C puis l'on ajoute progressivement 3,9 g (15,40 mmol, 1,3 equiv) d'iode. La solution est agitée à cette température pendant 5 minutes puis 1 h à température ambiante. L'excès d'iode est réduit par ajout de 1,0 g de sulfite de sodium dissous dans 100 mL d'eau. La phase organique est décantée puis concentrée pour conduire à une pâte qui est reprise dans le minimum d'un mélange d'éther diéthylique et d'éther de pétrole (1/1) jusqu'à précipitation quasi complète de l'oxyde de triphénylphosphine. Le résidu est filtré sur colonne de silice (éter diéthylique) pour conduire à l'iodure **78a** (2,30 g, 70%) qui est obtenu sous la forme d'une huile légèrement jaune $R_f = 0,54$ (éter de pétrole / éther diéthylique, 95:5)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 2.13$ (quint., $J = 7.0$ Hz, 2 H), 3.34 (t, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 3.58 (t, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 4.56 (s, 2 H), 7.30–7.40 (m, 5 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 3.6, 33.6, 69.6, 73.1, 127.7, 127.5, 128.5, 138.3$.

(4-Iodo-butoxymethyl)-benzene : 78b



L'alcool **77b** (2,00 g, 11,10 mmol) est dissout dans 150 mL de dichlorométhane en présence de 1,64 g (24,08 mmol) d'imidazole et de 4,11 g (15,67 mmol) de triphénylphosphine. La solution est refroidie à 0 °C puis l'on ajoute progressivement 4,28 g (16,86 mmol) d'iode. La solution est agitée à cette température pendant 5 minutes puis 1 h à température ambiante. L'excès d'iode est réduit par ajout de 1 g de sulfite de sodium dissout dans 100 mL d'eau. La phase organique est décantée puis concentrée pour conduire à une pâte qui est reprise dans un mélange (1/1) d'éther diéthylique et d'éther de pétrole jusqu'à précipitation quasi complète de l'oxyde de triphénylphosphine. Le résidu est filtré sur colonne de silice (éter diéthylique) pour conduire à l'iodure **78b** (2,76 g, 85%) qui est obtenu sous la forme d'une huile légèrement jaune $R_f = 0,48$ (éter de pétrole / éther diéthylique, 90:10)

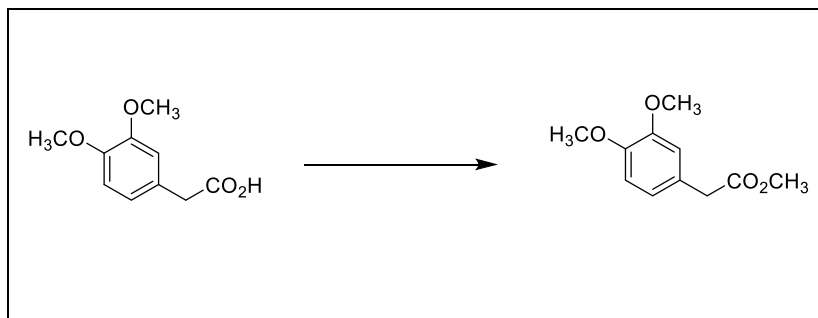
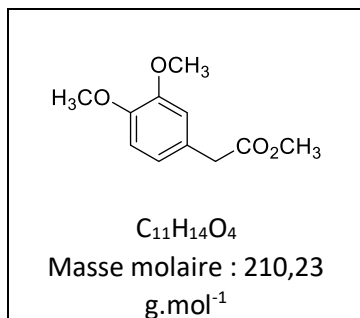
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 1.70$ –1.80 (m, 2 H), 1.92–2.03 (m, 2 H), 3.23 (t, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 3.52 (t, $J = 7.0$ Hz, 2 H), 4.53 (s, 2 H), 7.28–7.38 (m, 5 H).

HRMS ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{IO}$, ESI^+ , MeOH, $[\text{M} + \text{H}]^+$) calculé pour 291.0168 ; trouvé 291.0240.

Microanalyse. Calculée pour $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{IO}$ (290.0168): C, 45.54; H, 5.21. Trouvée: C, 45.56; H, 5.27.

4. Synthèse des précurseurs de la tylophorine **81**, *R*,R*-82*, *R*,R*-83*, **80**, **84**, **85** et **78e**

Méthyl 2-(3,4-diméthoxyphényl) acetate : **81**

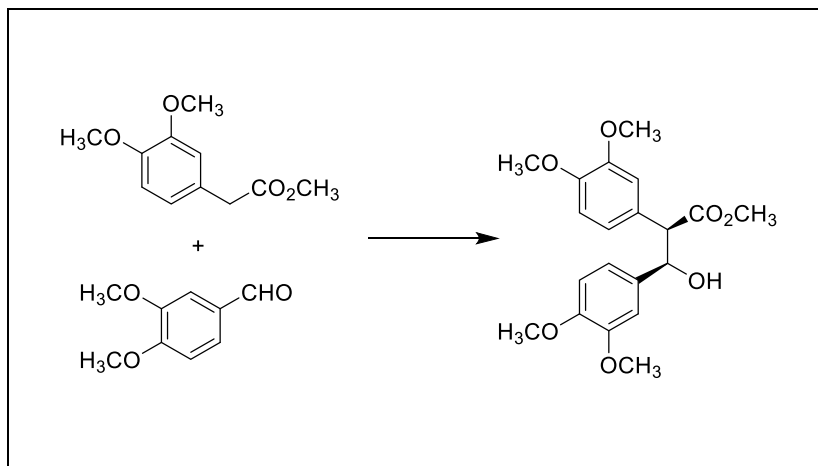
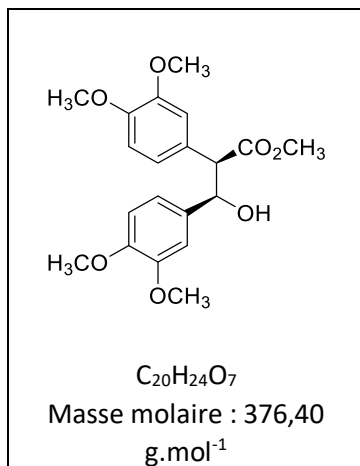


Dans un tube de Schlenk, on introduit successivement 30 mL de méthanol puis 5,0 g (25,5 mmol) d'acide 2-(3,4-diméthoxyphényl) acétique ainsi que 2,4 mL (3,9 g, 32,8 mmol) de $SOCl_2$. La solution est agitée pendant 12 h à température ambiante sous atmosphère d'argon. La solution est neutralisée par ajout de carbonate de potassium solide jusqu'à arrêt du dégagement de CO_2 . La solution est filtrée, puis le méthanol est évaporé sous pression réduite pour conduire à une huile qui est dissoute dans le dichlorométhane. La solution est déposée sur colonne de gel de silice puis l'ester **81** est élué par un mélange d'éther de pétrole et d'éther diéthylique (30/70). $R_f = 0,80$ (EP/E, 30:70).

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta = 3.53$ (s, 2 H), 3.65 (s, 3 H), 3.82 (s, 3 H), 3.84 (s, 3 H), 6.78 (s, 3 H) ppm.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) $\delta = 40.6, 51.9, 55.8, 55.8, 111.2, 112.4, 121.4, 126.5, 148.1, 148.9, 172.2$.

Méthyl (2*R*,3*R*)-2,3-bis(3,4-diméthoxyphényl)-3-hydroxypropanoate : *R*,R*-82*



Distillation de l'éthérate de trifluorure de bore.

De l'éthérate de trifluorure de bore ($\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$) (30 mL environ, solution légèrement brune) sont introduits dans un système à distillation qui est mis sous argon. Le ballon est chauffé à l'aide d'un décapeur thermique de façon à distiller une première fraction incolore d'environ 5 mL. Puis le reliquat est distillé à pression atmosphérique à une température d'environ 100 °C pour conduire à un liquide incolore. La fraction lourde (environ 5 mL) reste dans le flacon et est ensuite détruite par l'ajout d'éthanol à froid. La fraction distillée est ensuite conservée sous argon au maximum 1 mois. L'opération est à renouveler après 15 jours de stockage.

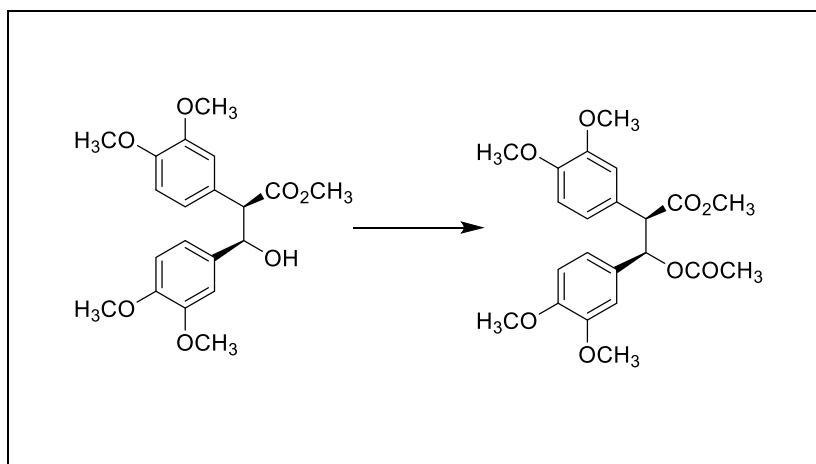
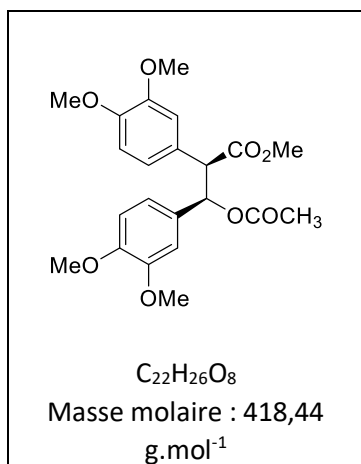
Condensation aldolique

Dans un tube de **Schlenk A** (placé 24 h à l'étuve et ayant subi 3 cycles vide–argon) on ajoute successivement 10 mL de THF anhydre et 1,33 mL (0,95 g, 9,39 mmol, 2,0 équiv.) de diisopropylamine distillée sur potasse. La solution est refroidie à –80 °C puis on ajoute lentement à la seringue 4,46 mL (7,14 mmol, 1,5 équiv.) d'une solution de *n*-BuLi 1,6 M. Le bain est ensuite réchauffé jusqu'à –30 °C puis à 0 °C pendant 15 minutes. On obtient alors une solution incolore légèrement opalescente qui est ensuite rapidement (10 secondes) transférée à l'aide d'une canule dans un tube de **Schlenk B** contenant 1,0 g (4,76 mmol, 1,0 équiv.) d'ester **81** dissous dans 15 mL de THF anhydre refroidi à –80 °C. On observe l'apparition immédiate d'un précipité jaune correspondant à la formation de l'énolate de lithium. La solution est agitée pendant environ 40 minutes, période au cours de laquelle la température du bain atteint environ –45 °C. Dans un tube de **Schlenk C** on ajoute successivement 10 mL de THF anhydre puis 0,63 g (3,79 mmol ; 0,8 équiv.) de vétraldéhyde et 0,10 mL (0,11 g, 0,77 mmol, 0,15 équiv.) d'éthérate de BF_3 récemment distillé (au maximum 30 jours après conservation au réfrigérateur à 5 °C). Le contenu est prélevé à l'aide d'une seringue et est introduit rapidement sur le contenu du Schlenk B à –80 °C. On constate la disparition de l'énolate formé précédemment suivi par l'apparition d'un précipité de couleur jaune claire correspondant à la formation de l'aldolate de lithium. Après 15 minutes d'agitation, la réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution demi-saturée de NH_4Cl (20mL, 10g/L) puis la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane après évaporation du THF (NB : l'emploi d'éther diéthylique en tant que solvant est proscrit à ce stade en raison de la précipitation de R^*, R^* -**82**). L'aldol **82** est obtenu avec un taux de conversion de 90% sous la forme de deux diastéréoisomères selon un rapport 1 :1. Le brut réactionnel est repris par 50 mL d'éther diéthylique pour conduire à un précipité blanc (0,57 g, 80%, calculé sur la proportion 1 :1 des diastéréoisomères). PF = 140 °C (éther diéthylique). R_f = 0,30 (E/EP, 80:20).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 2.53 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, OH), 3.57 (s, 3 H), 3.80 (d, J = 9.5 Hz, 1 H), 3.84 (s, 3 H), 3.88 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H), 5.20 (dd, J = 2.2, 9.5 Hz, 1 H), 6.80–6.85 (m, 3 H), 6.90–6.95 (m, 2 H) ppm.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 52.1, 55.8 (4 C), 59.2, 74.9, 109.7, 110.7, 111.1, 111.9, 119.0, 121.5, 127.1, 133.4, 148.7, 148.7, 148.9, 149.0, 173.0.

Méthyl (2*R*,3*R*)-3-acétoxy-2,3-bis(3,4-diméthoxyphényl)propanoate : *R*^{*},*R*^{*}-83

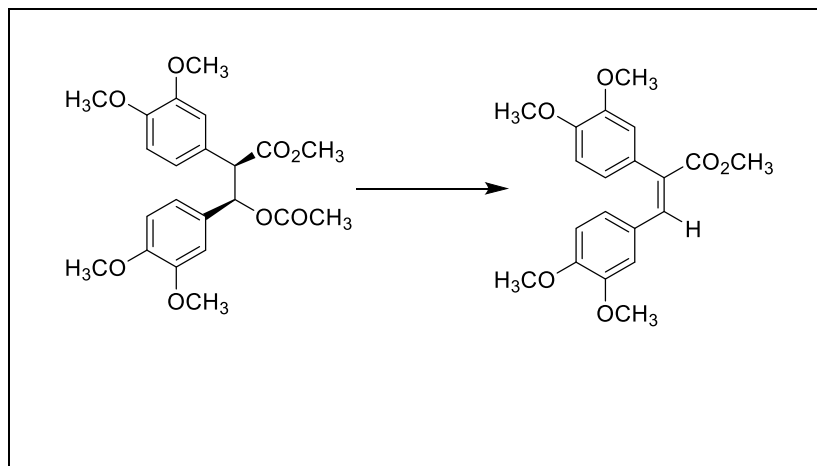
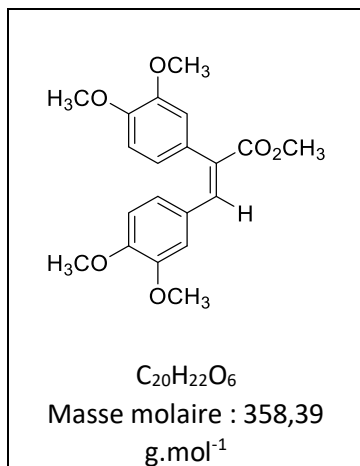


Dans un tube de Schlenk, on introduit successivement 5 mL de pyridine, 1,0 g (2,65 mmol) de *R*^{*},*R*^{*}-**82**, 32 mg (0,26 mmol, 0,1 equiv) de 4-DMAP ainsi que 0,75 mL (0,80 g, 7,84 mmol, 3 equiv.) d'anhydride acétique. La solution est agitée pendant 1 h à température ambiante. L'excès d'anhydride acétique est détruit par l'ajout d'un excès de méthanol (5 mL) après 1 heure d'agitation à température ambiante. La solution est rendue acide (pH = 1) par l'ajout d'une solution aqueuse d'HCl à 5%. Le résidu est extrait par 50 mL de dichlorométhane puis concentré sous vide pour conduire au composé *R*^{*},*R*^{*}-**83** (0,88 g, 80%) qui est obtenu sous la forme d'une poudre blanche qui est reprise dans un minimum d'éther diéthylique. PF = 174 °C, R_f = 0,40 (E/EP, 80:20).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 1.82 (s, 3 H), 3.52 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 3.91 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 4.15 (d, J = 9.5 Hz, 1 H), 6.40 (d, J = 9.5 Hz, 1 H), 6.80–6.85 (m, 2 H), 6.90–6.95 (m, 4 H) ppm.

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ = 20.9, 52.1, 55.8, 55.9, 55.9, 55.2, 75.2, 110.6, 110.8, 110.9, 111.44, 119.9, 121.2, 127.5, 130.7, 148.6, 148.7, 148.8, 149.0, 169.5, 171.3.

Méthyl (*E*)-2,3-bis(3,4-diméthoxyphényl)acrylate : 80

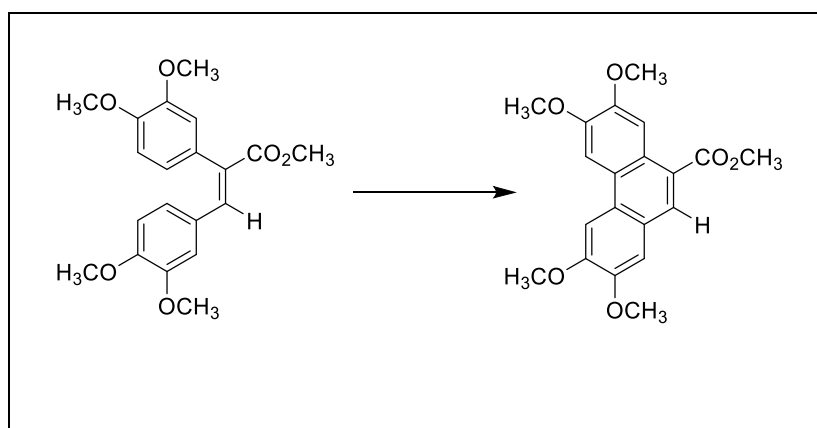
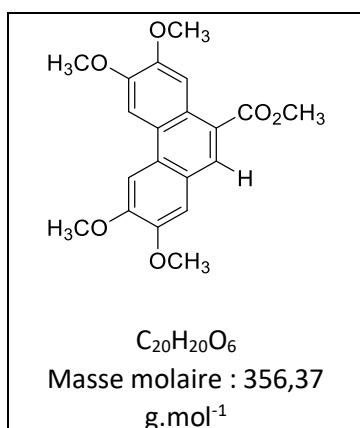


Dans un tube de Schlenk, on introduit successivement 10 mL de toluène, 1,0 g (2,39 mmol) de *R**,*R**-**83**, ainsi que 0,90 mL (0,89 g, 5,85 mmol, 2,45 equiv.) de DBU. La solution est agitée pendant 3 h au reflux du solvant. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de NH_4Cl puis le pH est ajusté à une valeur de 4–5 par ajout d'HCl à 5%. La phase aqueuse est extraite par 50 mL de dichlorométhane, puis l'ensemble des phases organiques sont séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous vide pour conduire au composé **65** (0,68 g, 80%) qui est obtenu sous la forme d'une poudre blanche qui est reprise dans un minimum d'éther diéthylique. PF = 130 °C, R_f = 0,65 (E/EP, 80:20).

RMN 1H (d_6 -DMSO, 300 MHz) δ = 3.36 (s, 3 H), 3.67 (s, 3 H), 3.71 (s, 3 H), 3.76 (s, 3 H), 6.55 (s, 1 H), 6.68 (d, J = 3 Hz, 1 H), 6.70–6.80 (m, 4 H), 7.00 (d, J = 3 Hz, 1 H), 7.65 (s, 1 H) ppm.

RMN ^{13}C (d_6 -DMSO, 75 MHz) δ = 54.6, 55.4, 55.6, 55.7, 56.0, 111.2, 110.2, 112.8, 113.3, 119.9, 121.2, 127.5, 130.7, 148.6, 148.7, 148.8, 149.0, 168.7.

Méthyl 2,3,6,7-tétraméthoxyphenanthrène-9-carboxylate : 84

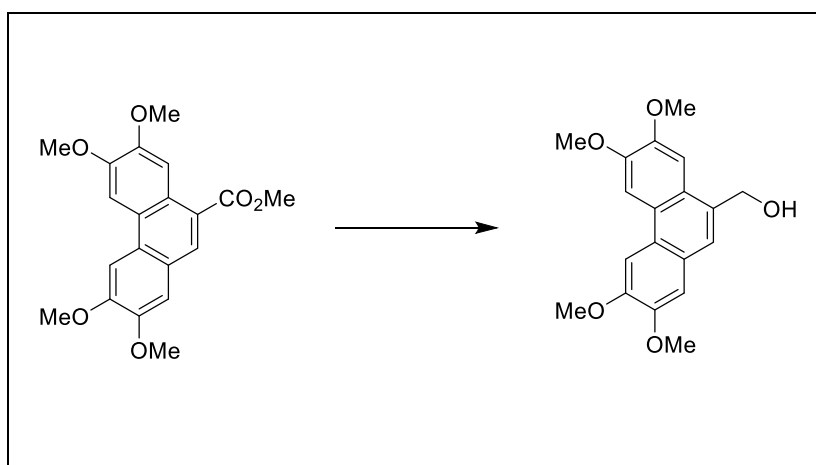
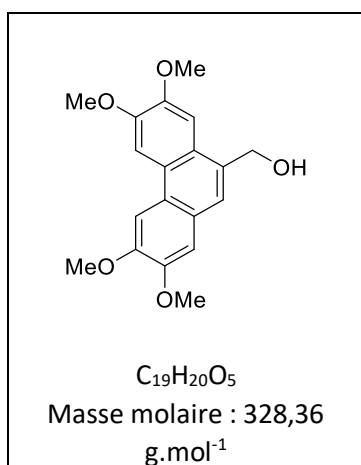


Dans un tube de Schlenk, on introduit successivement 20 mL de dichlorométhane, 1,23 g (3,43 mmol) d'ester **80**, ainsi que quelques gouttes d'acide méthane sulfonique. La solution est refroidie à l'aide d'un bain de glace, puis on ajoute 0,78 g (3,43 mmol, 1,0 equiv.) de DDQ ce qui provoque la coloration immédiate du milieu réactionnel. La solution est agitée à cette température pendant 30 minutes puis la réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution de K_2CO_3 . La phase organique est décantée puis la phase aqueuse est extraite par 50 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées puis séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous vide pour conduire au composé **84** (1,10 g, 90%) qui est obtenu sous la forme d'une poudre blanche qui est reprise dans un minimum d'éther diéthylique. PF = 201 °C, R_f = 0,65 (E/EP, 80:20).

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 4.01 (s, 3 H), 4.03 (s, 3 H), 4.08 (s, 3 H), 4.12 (s, 3 H), 4.13 (s, 3 H), 7.26 (s, 1 H), 7.75 (s, 1 H), 7.79 (s, 1 H), 8.41 (s, 1 H), 6.64 (d, J = 3 Hz, 1 H) ppm.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 52.0, 55.8, 55.9, 55.9, 56.0, 102.5, 102.7, 106.8, 109.3, 119.9, 122.1, 124.2, 124.5, 125.1, 127.1, 130.3, 149.0, 149.3, 151.3, 168.2.

(2,3,6,7-tétraméthoxyphénanthrène-9-yl)méthanol : 85

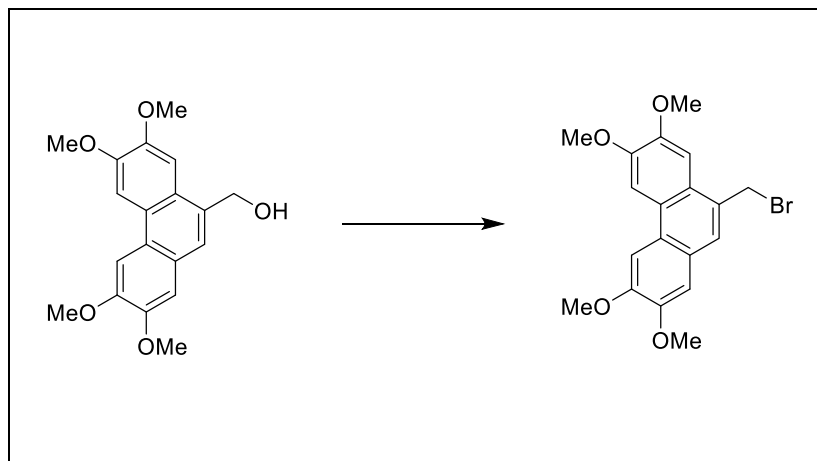
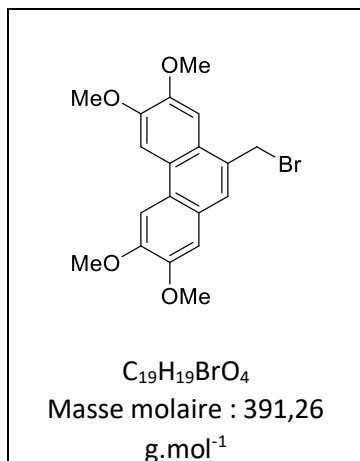


Dans un tube de Schlenk, on introduit successivement 40 mL de THF puis 1,65 g (4,63 mmol) d'ester **84**. On ajoute à température ambiante à cette suspension 15 ml (15 mmol, 3,2 equiv.) d'une solution 1 M de $LiAlH_4$ dans le THF. La solution est agitée pendant une nuit puis la réaction est arrêtée par l'ajout lent de 60 mL d'HCl 2 M. La phase aqueuse est extraite deux fois par 80 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées puis séchées sur $MgSO_4$ et concentrées sous vide pour conduire à l'alcool **85** (1,46 g, 95%) qui est obtenu sous la forme d'une poudre blanche qui est reprise dans un minimum d'éther diéthylique. PF = 170 °C, R_f = 0,30 (E/EtOAc, 50:50).

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 1.60 (s, 1 H, large), 4.02 (s, 3 H), 4.06 (s, 3 H), 4.12 (s, 3 H), 4.13 (s, 3 H), 5.12 (s, 2 H), 7.19 (s, 1 H), 7.53 (s, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.76 (s, 1 H), 7.83 (s, 1 H) ppm.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 55.6, 55.7, 55.7, 55.8, 64.1, 102.3, 102.8, 104.4, 108.0, 125.1, 124.2, 124.6, 125.6, 131.8, 148.2, 148.3, 148.5, 148.8.

9-(bromométhyl)-2,3,6,7-tetraméthoxyphénanthrène : 78e



Dans un tube de Schlenk, on introduit successivement 12 mL de THF puis 0,2 g (0,6 mmol) d'alcool **85**. La solution est refroidie à 0 °C, puis on ajoute lentement 0,9 mL (0,9 mmol, 1,5 equiv.) d'une solution molaire de PBr_3 dans le dichlorométhane. La solution est agitée pendant 4 h à cette température puis la réaction est arrêtée par l'ajout lent de 10 mL d'eau et de glace. La phase aqueuse est extraite deux fois par 15 mL de dichlorométhane, puis les phases organiques sont rassemblées puis lavées 5 fois par de l'eau jusqu'à pH neutre. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis concentrée à 25 °C sous pression réduite pour conduire au dérivé bromé **78e** (0,22 g, 94%) qui est obtenu sous la forme d'une poudre grise qui est reprise dans un minimum d'éther diéthylique. PF = 220 °C (décomposition), R_f = 0,80 (E/EtOAc, 50:50). NB : Le composé s'hydrolyse partiellement en alcool sur la plaque de silice.

RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ = 4.02 (s, 3 H), 4.10 (s, 3 H), 4.12 (s, 3 H), 4.13 (s, 3 H), 5.00 (s, 2 H), 7.19 (s, 1 H), 7.53 (s, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.76 (d, J = 3 Hz, 1 H) ppm.

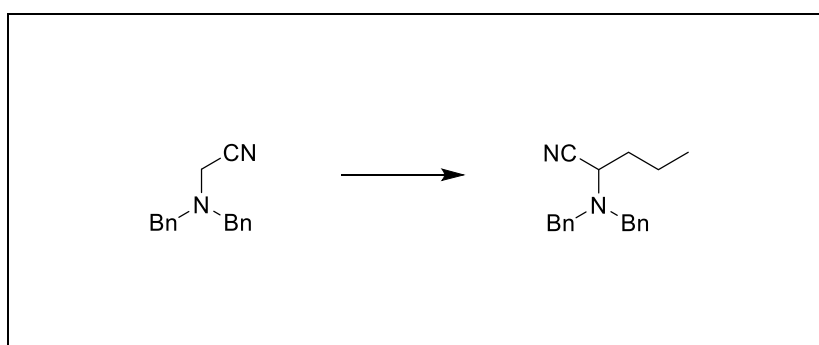
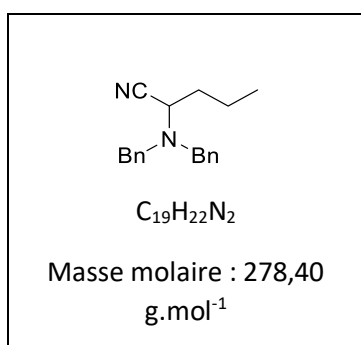
RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ = 34.1, 56.3, 56.3, 56.4, 103.1, 103.7, 105.3, 108.7, 124.4, 125.6, 126.0, 126.7, 129.1, 149.0, 149.4, 149.6, 150.3.

5. Protocole général de synthèse des α -amino nitriles **86a-f**, protocole A.

Dans un tube de Schlenk A (placé 24 h à l'étuve et ayant subi 3 cycles vide-argon) on ajoute successivement 10 mL de THF anhydre et 1,60 mL (1,15 g, 11,40 mmol, 1,4 équiv.) de diisopropylamine distillée sur potasse. La solution est refroidie à -80 °C puis on ajoute lentement à la seringue 6,50 mL (10,40 mmol, 1,25 équiv.) d'une solution de *n*-BuLi 1,6 M. Le bain est ensuite réchauffé jusqu'à 0 °C sur une période de 1 h et maintenu à cette température pendant 15 min. On obtient alors une solution incolore légèrement opalescente qui est ensuite rapidement (10 s) transférée à l'aide d'une canule dans un tube de Schlenk B contenant 2,0 g (8,46 mmol) d' α -aminonitrile **76** dissous dans 15 mL de THF anhydre refroidi à -90 °C. On observe l'apparition immédiate d'une coloration jaune-orangée qui vire rapidement au rouge vermillon entre -30 °C et -15 °C après deux heures d'agitation environ. La

solution est ensuite refroidie à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ par ajout d'azote liquide dans le bain d'éthanol, puis l'iodure d'alkyle (1,1 équiv.) est ajouté à la seringue ou bien à la pipette Pasteur à la solution précédente. On observe une décoloration de la solution qui vire alors du rouge au jaune clair. On constate également l'apparition d'un précipité de LiI transitoirement entre $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le mélange est réchauffé jusqu'à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis la réaction est arrêtée par les ajouts successifs de 100 mL d'éther diéthylique et 20 mL d'eau. Les phases organiques sont décantées, séchées sur MgSO_4 puis concentrées sous vide pour conduire à une pâte légèrement jaune qui est purifiée sur colonne de gel de silice dans les conditions d'élution précisées ci-dessous.

2-(dibenzylamino)-pentanenitrile : 86a

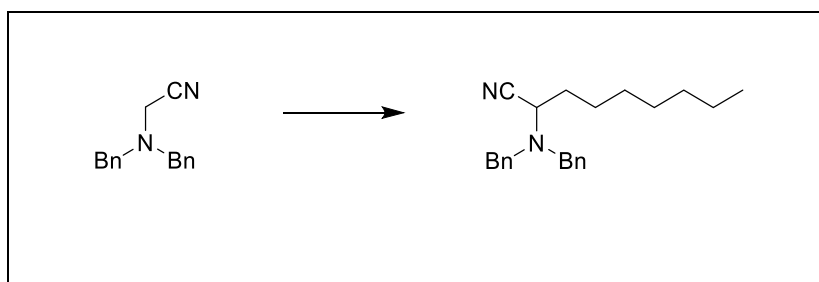
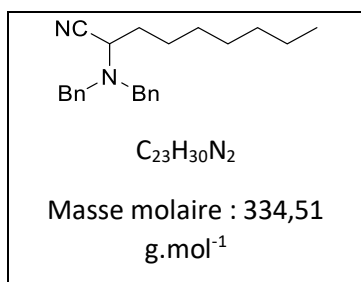


Le composé **86a** a été obtenu selon le protocole A par déprotonation (LDA, 1,25 équiv.) de 2 g d' α -aminonitrile **76**. Le carbanion a été condensé sur 1,1 équivalent de 1-iodopropane commercial (1,6 g). Le brut réactionnel (2,5 g) est dissous dans le minimum de toluène et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/éther diéthylique, 95 :5) pour conduire à 2,03 g (87%) d' α -amino nitrile **86a** sous la forme d'une huile visqueuse incolore. $R_f = 0,8$ (EP/E = 95 :5).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 0.84$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.30–1.60 (m, 2 H), 1.70–1.90 (m, 2 H), 3.39 (d, $J = 13.8$ Hz, 2 H), 3.59 (t, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 3.97 (d, $J = 13.8$ Hz, 2 H), 7.28–7.38 (m, 10 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 13.3, 19.1, 33.4, 52.5, 55.4, 117.7, 127.6, 128.6, 128.8, 137.9$.

2-(dibenzylamino)-nonanenitrile : 86b

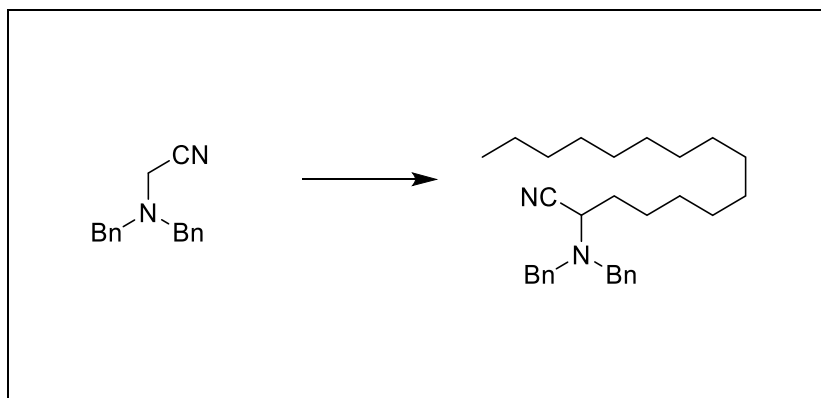
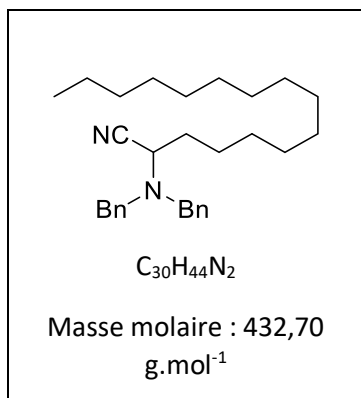


Le composé **86b** a été obtenu selon le protocole A par déprotonation (LDA, 1,25 équiv.) de 3 g d'α-aminonitrile **76**. Le carbanion a été condensé sur 1,1 équivalent de 1-iodoheptane commercial (3,16 g). Le brut réactionnel (4,85 g) est dissous dans le minimum de mélange éluant et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/éther diéthylique, 98 :2) pour conduire à 2,40 g (85%) d'α-aminonitrile **86b** sous la forme d'une huile visqueuse incolore. $R_f = 0,50$ (EP/E = 95 :5). NB : Le 1-iodoheptane est élué dans les premières fractions et révélé à l'acide phosphomolybdique.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 0.90$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.10–1.50 (m, 10 H), 1.70–1.90 (m, 2 H), 3.39 (d, $J = 13.8$ Hz, 2 H), 3.55 (t, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 3.97 (d, $J = 13.8$ Hz, 2 H), 7.28–7.38 (m, 10 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 14.2, 22.7, 25.8, 28.8, 29.2, 31.5, 31.9, 53.0, 55.7, 118.4, 128.3, 128.6, 128.8, 138.8$.

2-(dibenzylamino)-hexadecanenitrile : **86c**



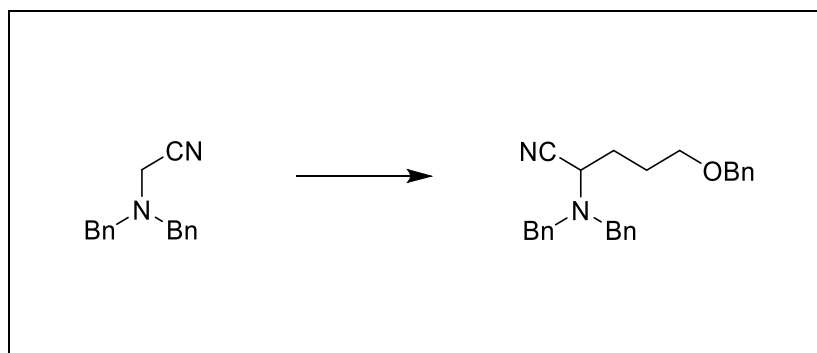
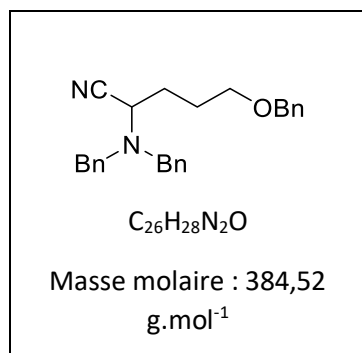
Le composé **86c** a été obtenu selon le protocole A par déprotonation (LDA, 1,25 équiv.) de 1,5 g d'α-aminonitrile **76**. Le carbanion a été condensé sur 0,8 équivalents de 1-iodotétradécane **78c** (1,64 g) synthétisé au laboratoire.¹ Le brut réactionnel (2,7 g) est dissous dans le minimum de mélange éluant et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/éther diéthylique, 98 :2) pour conduire à 1,60 g (73%, calculé sur le réactif en défaut **78c**) d'α-aminonitrile **86c** qui est obtenu sous la forme d'une huile visqueuse incolore. $R_f = 0,70$ (EP/E = 98 :2). NB : Le 1-iodotétradécane est élué dans les premières fractions et est révélé par de l'acide phosphomolybdique.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 0.91$ (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 1.10–1.50 (m, 26 H), 1.70–1.90 (m, 2 H), 3.38 (d, $J = 13.8$ Hz, 2 H), 3.58 (t, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 3.95 (d, $J = 13.8$ Hz, 2 H), 7.28–7.38 (m, 10 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 14.2, 22.7, 25.7, 28.7, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.7, 31.3, 31.4, 52.7, 55.4, 118.7, 127.5, 128.5, 128.8, 138.8$.

¹ L'agent alkylant **78c** est ici utilisé en défaut afin d'éviter la formation de la nonacosane-15-one après purification sur colonne de gel de silice.

5-(benzyloxy)-2-(dibenzylamino)-pentanenitrile : 86d



Le composé **86d** a été obtenu selon le protocole A par déprotonation (LDA, 1,25 équiv.) de 2,5 g d' α -aminonitrile **76**. Le carbanion a été condensé sur 1,2 équivalent du composé **78a** (3,50 g) synthétisé au laboratoire. Le brut réactionnel (3,90 g) est dissous dans le minimum de toluène et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/éther diéthylique, 95 :5) pour conduire à 2,70 g (66%) d' α -aminonitrile **86d** qui est obtenu sous la forme d'une huile très visqueuse qui se solidifie au refroidissement sous la forme d'un solide blanc (qui est ensuite broyé au mortier sous la forme d'une poudre blanche). PF = 63 °C. R_f = 0,25 (EP/E = 97 :3). NB : Le composé **78a** est élué dans les premières fractions suivi de l' α -aminonitrile **86d**.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 1.60–2.00 (m, 4 H), 3.30–3.40 (m, 2 H), 3.39 (d, J = 13.8 Hz, 2 H), 3.62 (t, J = 7.0 Hz, 1 H), 3.95 (d, J = 13.8 Hz, 2 H), 4.40 (s, 2H), 7.28–7.38 (m, 15 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 26.0, 28.1, 52.4, 55.3, 68.9, 73.0, 117.5, 127.5, 127.6, 128.4, 128.8, 137.8, 138.2.

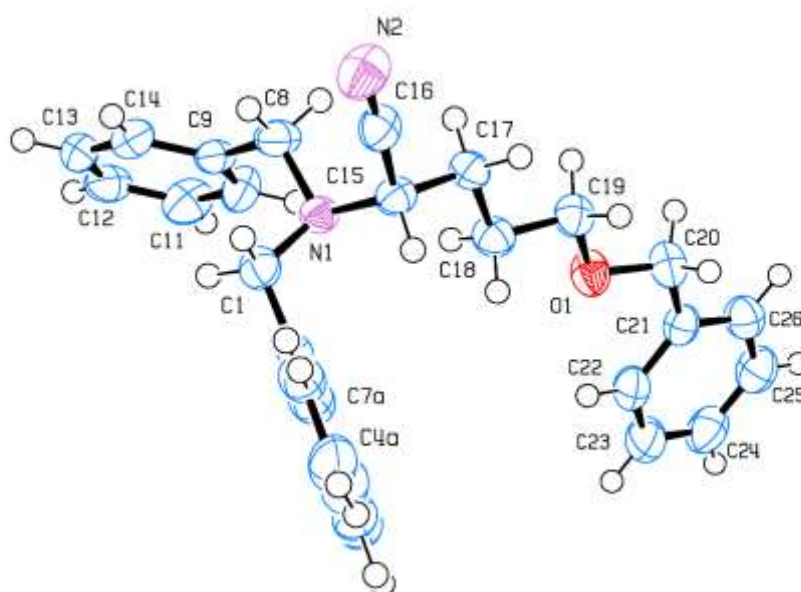


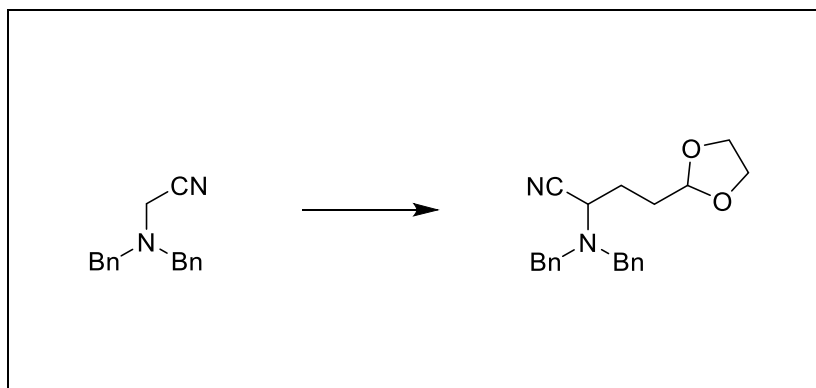
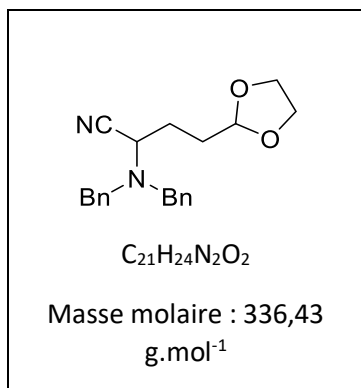
Figure 139. Diagramme ORTEP du composé **86d**.

Des cristaux du composé **86d** ont été obtenus par cristallisation lente dans le toluène.

Tableau 47. Paramètres cristallographiques du composé **86d**.

	86d
Formule brute	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O
Masse moléculaire	384,5
Système Cristallin	triclinique
Groupe d'espace	P –1
a [Å]	6,7348(7)
b [Å]	9,7408(11)
c [Å]	17,941(2)
α [°]	80,663(5)
β [°]	82,950(4)
γ [°]	70,353(4)
V [Å ³]	1090,8(2)
Z	2
ρ _{calc.} [g.cm ⁻³]	1,171
F(000)	412
μ(Mo-Kα) [cm ⁻¹]	0,72
T [K]	150
Taille du cristal (mm)	0,58*0,42*0,36
Domaine de hkl	–8, 8 ; –12, 12 ; –23, 23
Réflexions mesurées	17348
Réflexions indépendantes [I>σ(I)]	3590(>2σ)
R final	0,0517

2-(dibenzylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-butanenitrile : 86e



Le composé **86e** a été obtenu selon le protocole A par déprotonation (LDA, 1,25 équiv.) de 1,88 g d' α -aminonitrile **76**. Le carbanion a été condensé sur 1,2 équivalents du dérivé iodé **78d** (2,15 g) synthétisé selon un protocole préalablement utilisé au laboratoire. Le brut réactionnel (3,0 g) est dissous dans le minimum de cyclohexane et purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/éther diéthylique, 90 :10) pour conduire à 1,70 g (63%) d' α -aminonitrile **86e** qui est obtenu sous la forme d'une huile très visqueuse. $R_f = 0,50$ (EP/E = 90 :10).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 1.70–1.80 (m, 1 H), 1.80–2.10 (m, 3 H), 3.38 (d, J = 13.6 Hz, 2 H), 3.70 (t, J = 7.0 Hz, 1 H), 3.78–3.90 (m, 4 H), 3.97 (d, J = 13.6 Hz, 2 H), 4.80 (t, J = 4.2 Hz, 1 H), 7.28–7.38 (m, 10 H).

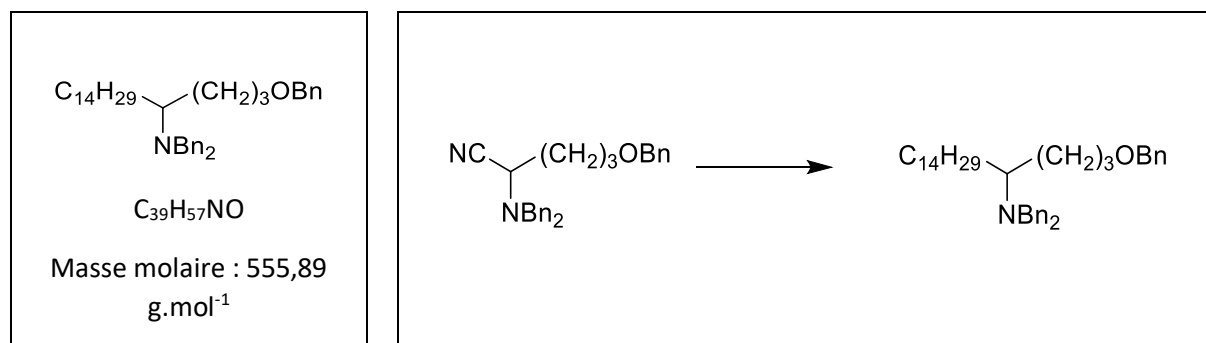
RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ = 25.3, 29.5, 52.5, 55.3, 64.9, 65.0, 103.2, 117.4, 127.6, 128.6, 128.8, 137.8.

6. *Protocole général de synthèse des amines 88a-c protocole B.*

Dans un tube de Schlenk A (placé 24 h à l'étuve et ayant subi 3 cycles vide-argon) on ajoute successivement 10 mL de THF anhydre et 1,5 équiv de diisopropylamine distillée sur potasse. La solution est refroidie à –80 °C puis on ajoute lentement à la seringue 1,3 équiv. d'une solution de *n*-BuLi 1,6 M. Le bain est ensuite réchauffé jusqu'à 0 °C sur une période de 1 h et maintenu à cette température pendant 15 min. On obtient alors une solution incolore légèrement opalescente qui est ensuite rapidement (10 s) transférée à l'aide d'une canule dans un tube de Schlenk B contenant l' α -aminonitrile **86(a-c)** dissous dans 15 mL de THF anhydre refroidi à –90 °C. On observe l'apparition immédiate d'une coloration jaune-orangée qui vire *lentement* au rouge vermillon à une température comprise entre –30 °C et 0 °C. Après deux heures d'agitation environ, la solution est refroidie à –80 °C par ajout d'azote liquide dans le bain d'éthanol, puis l'iodure d'alkyle **78(b-c)** (1,2 équiv.) est ajouté à la seringue à la solution précédente. On observe une décoloration de la solution qui vire alors du rouge au jaune clair. Le mélange est réchauffé jusqu'à 0 °C puis la réaction est arrêtée par l'ajout de 15 mL

d'éthanol. On ajoute ensuite 4 équiv. de NaBH_4 , puis la solution est agitée pendant 12 h à température ambiante puis portée au reflux du mélange THF/éthanol (1/1) pendant 3 h. Les solvants sont évaporés pour conduire à une pâte qui est agitée dans un mélange d'éther diéthylique et une solution aqueuse d'ammoniaque à 30%. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis concentrée sous vide pour conduire à une huile qui est purifiée sur colonne de gel de silice dans les conditions d'élution précisées ci-dessous.

N,N*-(dibenzyl-1-(benzyloxy)-octadécan-4-amine : **88a*

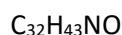
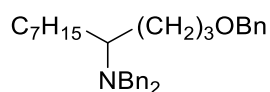


Le composé **88a** a été obtenu par application du protocole B par déprotonation (LDA, 1,3 équiv.) de 1,50 g (3,90 mmol) d' α -aminonitrile **86d** et alkylation du carbanion correspondant par 1,65 g (1,3 équiv.) de 1-iodotétradécane. Le brut réactionnel est ensuite repris par 30 mL d'éthanol et 590 mg (15,6 mmol, 4 equiv.) de NaBH_4 sont ajoutés pour réaliser la décyanation réductrice. Ce qui a conduit à une huile visqueuse qui est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/éther diéthylique, 98:2) pour conduire à l'amine **88a** (0,35 g, 16%) qui est obtenue sous la forme d'une huile très visqueuse. Remarque : le pentadécane obtenu par réduction du 1-iodotétradécane est élué dans les premières fractions.

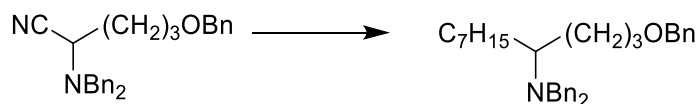
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3 H), 1.10–1.50 (m, 27 H), 1.60–1.80 (m, 5 H), 2.48 (quint., J = 6.7 Hz, 1 H), 3.36 (t, J = 6.22 Hz, 2 H), 3.53 (d, J = 13.6 Hz, 2 H), 3.63 (d, J = 13.6 Hz, 2 H), 4.47 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 7.20–7.40 (m, 15 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 14.2, 22.7, 26.4, 27.3, 29.2, 29.4, 29.7, 29.8, 29.9, 32.0, 53.2, 56.8, 70.5, 72.9, 126.6, 127.5, 127.7, 128.1, 128.4, 128.9, 138.7, 140.8.

***N,N*-(dibenzyl-1-(benzyloxy)-undecan-4-amine : 88b**



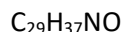
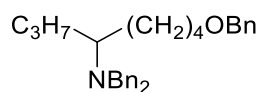
Masse molaire : 457,70
g.mol⁻¹



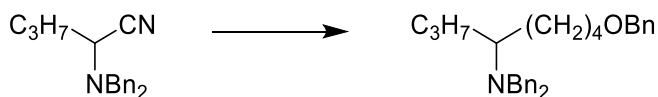
Le composé **88b** a été obtenu par application du protocole B par déprotonation (LDA, 1,3 équiv.) de 1,0 g (2,60 mmol) d'α-aminonitrile **86d** et alkylation du carbanion correspondant par 1,06 g (1,8 équiv.) de 1-iodoheptane. Le brut réactionnel est ensuite repris par 20 mL d'éthanol et 500 mg (13,2 mmol, 4 équiv.) de NaBH₄ sont ajoutés pour réaliser la décyation réductrice. Ce qui a conduit à une huile visqueuse qui est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éther de pétrole/éther diéthylique, 98:2) pour conduire à l'amine **88b** (0,56 g, 47%) qui est obtenue sous la forme d'une huile très visqueuse.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 0.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 3 H), 1.10–1.45 (m, 14 H), 1.50–1.85 (m, 5 H), 2.45 (quint., *J* = 6.4 Hz, 1 H), 3.36 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 3.53 (d, *J* = 13.7 Hz, 2 H), 3.63 (d, *J* = 13.7 Hz, 2 H), 4.47 (d, *J* = 2.1 Hz, 2 H) 7.20–7.40 (m, 15 H).

***N,N*-(dibenzyl-8-(benzyloxy)-octan-4-amine : 88c**



Masse molaire : 415,62
g.mol⁻¹



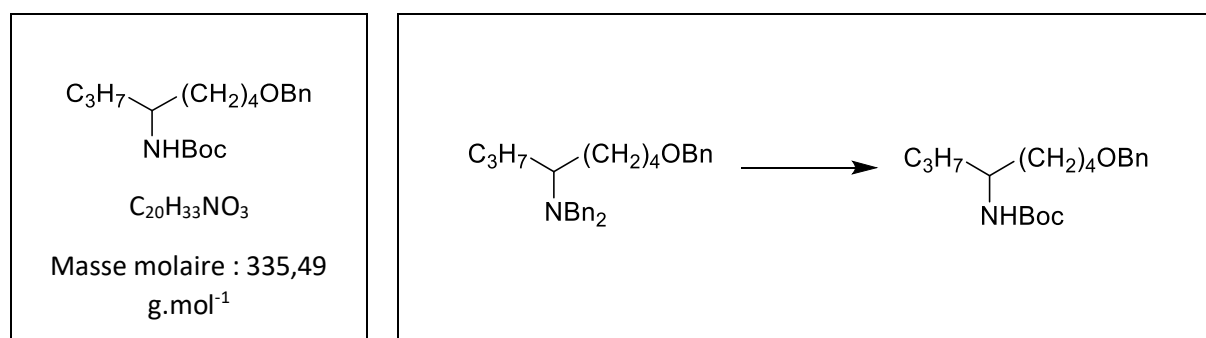
Le composé **88c** a été obtenu par application du protocole B par déprotonation (LDA, 1,3 équiv.) de 2,0 g (7,18 mmol) d'α-aminonitrile **86a** et alkylation du carbanion correspondant par 2,50 g (8,60 mmol, 1,2 équiv.) de iodure d'alkyle **78b**. Le brut réactionnel est ensuite repris par 15 mL d'éthanol et 1,10 g (29,08 mmol, 4 équiv.) de NaBH₄ sont ajoutés pour réaliser la décyation réductrice. Ce qui a conduit à une huile visqueuse qui est purifiée par chromatographie sur gel de silice (éther de

pétrole/éther diéthylique, 98:2) pour conduire à l'amine **88c** (2,82 g, 95%) qui est obtenue sous la forme d'une huile incolore. *Remarque* : L'amine **88c** est obtenue en présence de 5% de butoxyméthylbenzène qui provient de la réduction du dérivé iodé **78b**. Ce composé peut être partiellement séparé du mélange réactionnel par chromatographie sur colonne de gel de silice (éther de pétrole/éther diéthylique : 98 :2).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 0.84 (t, J = 7.2 Hz, 3 H), 1.15–1.66 (m, 10 H), 2.45 (quint., J = 6.7 Hz, 1 H), 3.45 (t, J = 6.1 Hz, 2 H), 3.57 (s, 4 H), 4.52 (s, 2H), 7.20–7.40 (m, 15 H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ = 14.3, 20.4, 23.8, 29.6, 29.9, 31.9, 53.4, 56.9, 70.4, 72.9, 126.6, 127.6, 128.1, 128.4, 128.9, 138.8, 140.9.

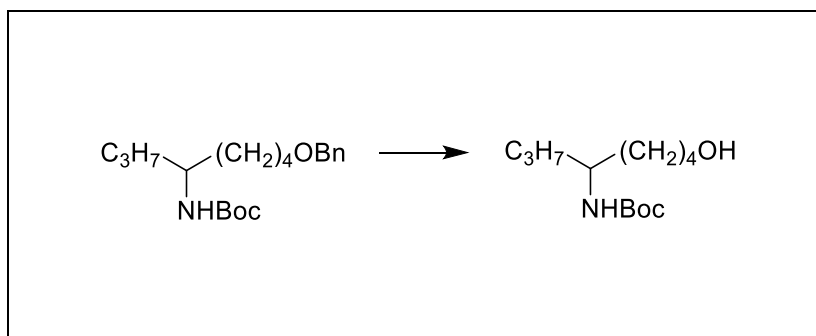
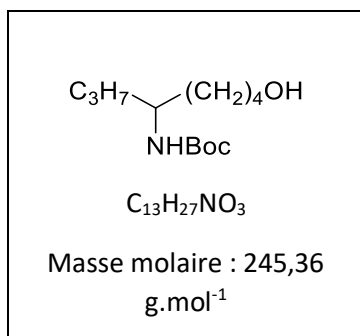
tert*-butyl (8-(benzyloxy)octan-4-yl)carbamate : **90c*



Dans un hydrogénateur basse pression, on introduit successivement 0,8 g (1,93 mmol) d'amine **88c** dissoute dans 15 mL d'un mélange d'éthanol et de méthanol en proportion 7 :3. A cette solution, sont ajoutés 80 mg (10% en masse) de catalyseur de Pearlman à 20% [Pd(OH)₂/C]. L'oxygène est retiré par 3 ventilations successives d'azote et d'hydrogène dont la pression est portée à 5 bars. La solution est agitée à température ambiante pendant 24 h. La solution est filtrée sur Büchner puis les solvants sont évaporés sous vide pour conduire à 0,5 g d'une huile visqueuse. L'analyse par RMN ¹H montre que ce mélange est composé de l'amine primaire **89c** et de l'amine de départ **88c** en proportion 80 :20. Ce mélange est ensuite porté 12 h au reflux de l'acétonitrile (30 mL) en présence de Boc₂O (0,9 g, 4,12 mmol, 2,1 equiv) et de base de Hünig. L'excès de Boc₂O est ensuite hydrolysé en agitant le mélange réactionnel dans 20 mL d'un mélange de NaOH 2 M et de THF (20 :40) à température ambiante pendant une heure après évaporation de l'acétonitrile. Après extraction à l'éther, le brut réactionnel est concentré sous vide pour conduire à une huile visqueuse qui est purifiée par chromatographie sur colonne de silice (EP/E, 85 :15). L'amine de départ (**88c**, 170 mg) est éluée en premier (R_f = 0,5) suivie d'un produit non identifié (R_f = 0,55, 100 mg) et du carbamate **90c** (0,4 g, 60%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 0.84 (t, J = 7.2 Hz, 3 H), 1.15–1.66 (m, 10 H), 1.50 (s, 9 H), 3.50 (t, J = 6.1 Hz, 2 H), 3.50 (s, 1 H, large), 4.20 (d, J = 4 Hz, 1 H), 4.50 (s, 2 H), 7.20–7.40 (m, 5 H).

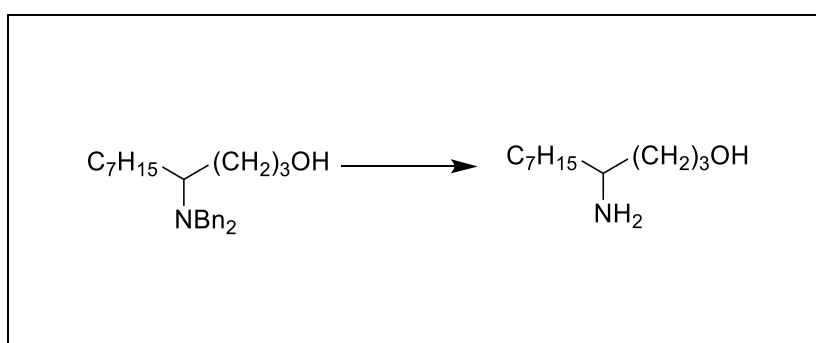
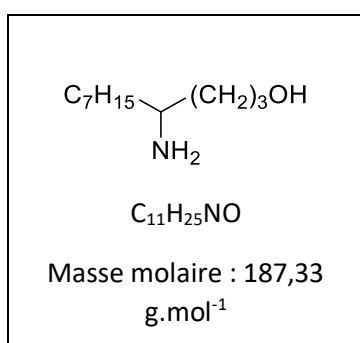
tert-butyl (8-hydroxyoctan-4-yl)carbamate : 91c



Dans un hydrogénateur basse pression, on introduit successivement 0,25 g (0,75 mmol) de carbamate **90c** dissout dans 5 mL de méthanol. A cette solution, sont ajoutés 50 mg (20% en masse) de Pd/C à 10%. L'oxygène est retiré du milieu réactionnel par 3 ventilations successives à l'aide d'un flux d'azote et d'hydrogène dont la pression est portée à 5 bars. La solution est agitée à température ambiante pendant 48 h. La solution est filtrée sur Büchner puis les solvants sont évaporés sous vide pour conduire à 0,20 g d'une huile visqueuse. $R_f = 0,5$ (EP/E, 50 :50).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 0.84$ (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H), 1.20–1.66 (m, 10 H), 1.40 (s, 9 H), 3.50 (s, 1 H, large), 3.51 (t, $J = 6.1$ Hz, 2 H), 3.50 (s, 1 H, large).

4-aminoundecan-1-ol : 92

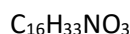
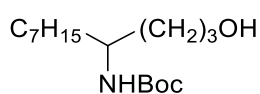


Dans un hydrogénateur basse pression, on introduit successivement 0,4 g (0,87 mmol) d'amine **88b** dissoute dans 15 mL d'éthanol. A cette solution, sont ajoutés 80 mg (20% en masse) de palladium sur charbon. L'oxygène est retiré par 3 ventilations successives d'azote et d'hydrogène dont la pression est portée à 4 bars. La solution est agitée à température ambiante pendant 12 h. La solution est filtrée sur Büchner puis le solvant est évaporé sous vide. L'analyse par RMN ^1H du brut réactionnel montre que seule la fonction amine a été débenzylée. Il a donc été remis en solution dans 10 mL d'éthanol,

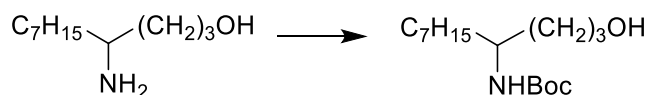
avec 100 mg de Pd/C et une pression de 4 bars d'hydrogène a de nouveau été appliquée pendant 24h. Au vu de l'analyse par RMN ^1H , le produit débenzylé **92** (0,18 g) semble avoir été obtenu sous sa forme carbonatée.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 0.87 (t, J = 6.6 Hz, 3 H), 1.15–1.50 (m, 10 H), 1.55–2.00 (m, 6 H), 2.65–3.00 (s, 2 H, large), 3.24 (s, 1H), 3.70 (m, 2 H), 8.23 (s, 1H, large).

tert*-butyl (1-hydroxyundecan-4-yl)carbamate : **91b*



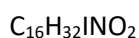
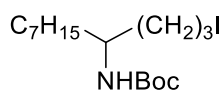
Masse molaire : 287,44
g.mol $^{-1}$



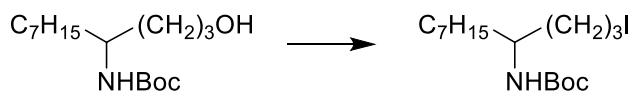
Le composé **92** débenzylé (0,18 g, 0,96 mmol) est dissous dans 10 mL d'acétonitrile en présence de Boc_2O (0,25 g, 1,15 mmol, 1,2 equiv) et de base de Hünig (0,37 g, 2,86 mmol, 3 equiv.). L'acétonitrile est évaporé puis après extraction à l'éther, le brut réactionnel est concentré sous vide pour conduire à une huile visqueuse qui est purifiée par chromatographie sur colonne de silice (100% éther diéthylique). Le carbamate **91b** est obtenu avec un rendement de 69 % (0,19 g).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 0.89 (t, J = 6.7 Hz, 3 H), 1.20–1.40 (m, 10 H), 1.45 (s, 9 H), 1.50–1.69 (m, 4 H), 1.80 (s, 1H, large), 3.59 (s, 1H, large), 3.68 (t, J = 6.1 Hz, 2H).

tert*-butyl (1-iodoundecan-4-yl)carbamate : **93*



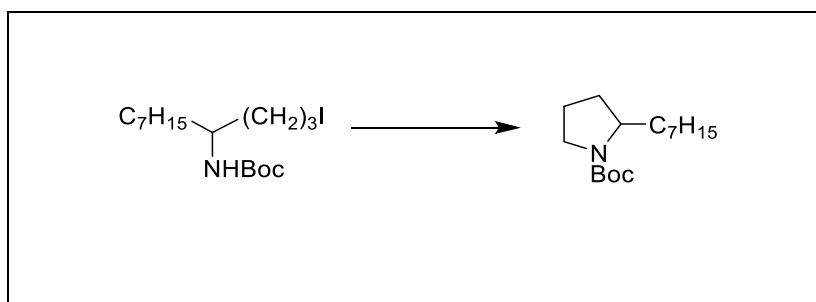
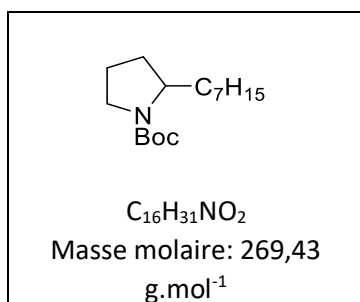
Masse molaire : 397,34
g.mol $^{-1}$



L'alcool **91b** (0,45 g, 1,56 mmol) est dissout dans 10 mL de dichlorométhane en présence de 0,19 g (2,79 mmol, 1,8 equiv) d'imidazole et de 0,475 g (2,04 mmol, 1,3 equiv) de triphénylphosphine. La solution est refroidie à 0 °C puis l'on ajoute progressivement 0,67 g (2,64 mmol, 1,7 equiv) d'iode. La solution est agitée à cette température pendant 5 minutes puis 1 h à température ambiante. L'excès d'iode est réduit par ajout de 1,0 g de sulfite de sodium dissous dans 100 mL d'eau. La phase organique est décantée, lavée à l'eau puis concentrée pour conduire à une pâte qui est reprise dans le minimum d'un mélange d'éther diéthylique et d'éther de pétrole (1/1) jusqu'à précipitation quasi complète de l'oxyde de triphénylphosphine. Le résidu est filtré sur colonne de silice (EP/E, 90/10) pour conduire à l'iodure **93** (0,35 g, 56%).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 0.80–0.90 (m, 8 H), 1.19–1.37 (m, 10 H), 1.40–1.49 (m, 8 H), 1.52–1.69 (m, 2 H), 1.73–1.94 (m, 2 H), 3.21 (td, J = 6.8, 3.1 Hz, 1 H).

tert*-butyl 2-heptylpyrrolidine-1-carboxylate : **94*



Dans un tube de Schlenk placé sous argon, on dissout 0,35 g (0,88 mmole) de l'iodure **93** dans 3 ml de THF anhydre. On ajoute progressivement, à la spatule sous agitation vive et sous atmosphère d'argon, 0,07 g (1,75 mmole, 2 eq) de NaH dispersé à 60% dans de la paraffine. La solution est agitée à température ambiante pendant 12h. L'excès de NaH est neutralisé par l'ajout de quelques gouttes d'éthanol jusqu'à l'arrêt du dégagement gazeux puis d'un millilitre d'éthanol. Le solvant est ensuite évaporé sous vide pour conduire à 165 mg de produit cyclisé **94** (70 %).

NMR ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ = 0.89 (m, 3 H), 1.20–1.40 (m, 10 H), 1.48 (s, 9 H), 1.60–1.98 (m, 6 H), 3.25–3.42 (m, 2 H), 3.73 (s, large, 1 H).

Conclusion et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'étude des bactéries associées aux lichens a dans un premier temps été réalisée sur la souche **DP94**, dont l'extrait brut a présenté une activité cytotoxique intéressante. Elle a débuté par des travaux d'optimisation des conditions de culture de cette souche dans le but d'isoler le ou le(s) composé(s) actif(s). Cela nous a permis de sélectionner un milieu de culture (TY) et une durée de culture (4 jours après la phase stationnaire) les plus appropriés pour favoriser la production de composés cytotoxiques. Le plan d'expérience appliqué par la suite pour optimiser les autres paramètres de culture (température, pH, pourcentage d'inoculum et vitesse d'agitation) nous a permis de démontrer qu'une température à 37°C est optimale pour améliorer l'activité des extraits bactériens lors de la culture en bioréacteur. Les autres paramètres n'ont cependant pas montré, d'un point de vue statistique, d'influence significative sur cette activité. Ce plan d'expérience doit donc être renouvelé en fixant la température à 37 °C et en réajustant les valeurs des autres paramètres de culture (pH, volume d'inoculum...). On peut également envisager d'utiliser un autre type de plan d'expérience ou d'analyse statistique parmi ceux qui sont décrits dans la review de Mandenius et Brundin [282].

Nous avons poursuivi notre étude en réalisant l'isolement des composés produits par notre souche **DP94**. Cela a mené à la purification de 17 composés dont 13 sont identifiés. Ce sont tous des composés azotés parmi lesquels 9 dicétopipérazines (**4**, **7-9**, **12-14**, **20-21**), 3 dérivés de base puriques (**10**, **11** et **22**) et 1 dérivé de l'indole (**1**). Un des dérivés de l'adénosine, le composé **10**, présente une faible activité cytotoxique qui diminue lorsque les essais sont répétés. Cela nous laisse envisager la possibilité que ce composé ait un rôle dans l'activité des extraits mais qu'il subit une dégradation de type hydrolyse. Une méthode de fractionnement différente, la CPC nous a permis de travailler sur des fractions actives constituées de peu de composés. Après isolement et analyses structurales, ces composés se sont révélés comme étant de la méthyl-adénosine et de l'uracile, laissant supposer que les composés actifs sont des antimétabolites de types dérivés puriques et pyrimidiniques.

En ce qui concerne le ciblage des composés actifs une première analyse par PLSDA des données de spectrométrie de masse des extraits obtenus a été entreprise mais n'a pas mis en évidence de différence significative entre les échantillons actifs et inactifs. Ces résultats impliquent que, soit les composés actifs sont présents en trop faible quantité, soit ils ne s'ionisent pas dans nos conditions analytiques par HPLC/MS. La recherche des composés responsables de l'activité cytotoxique issus de fractions par réseaux moléculaires a permis de mettre en évidence plusieurs métabolites potentiellement actifs mais présents en trop faible quantité pour permettre leur isolement. Pour cibler ces composés, une culture en plus grande quantité est envisageable en utilisant des paramètres de culture qui auront été préalablement sélectionnés par un autre plan d'expérience, toujours dans le but de favoriser la production de ou des métabolites actifs. La mise en évidence des différents ions responsables, d'un point de vue statistique, de la séparation des fractions actives et inactives, permettra de mieux cibler les futurs travaux d'isolement.

Les composés identifiés lors de ces études n'expliquent donc pas l'activité cytotoxique des extraits bruts, ce qui souligne certaines limites de notre étude.

- Il est connu que certains métabolites actifs produits par des bactéries (comme les dérivés phénoxazine de type dactinomycine...) peuvent atteindre des masses molaires de 1200-1300 Da. Notre spectromètre de masse utilisé en routine pour nos analyses ayant une

fenêtre de détection allant jusqu'à 1200 Da il est donc possible que le poids moléculaire de nos composés actifs soient dans cette gamme de PM > 1200 Da.

- Lors des travaux de fractionnement nous avons également observé une diminution voire parfois une perte de l'activité qui peut être expliquée par une synergie de plusieurs composés au sein de l'extrait brut. Cette hypothèse est notamment appuyée par les résultats obtenus lors du fractionnement de l'extrait de résine de l'expérience 3 du plan d'expérience (IV. B. Analyse statistique par PLS-DA). Deux groupes de fractions actives sont distingués, séparant ainsi deux types de composés actifs suivant leur polarité. L'analyse statistique confirme la différence entre ces deux groupes soulignant la possibilité de présence d'au moins deux familles de composés actifs dans notre extrait total et donc une potentielle synergie entre ces deux groupes.
- Enfin la perte ou la diminution de l'activité lors des fractionnements peut également être expliquée par une dégradation des composés actifs, notamment par hydrolyse, comme cela semble être le cas pour le composé **10** ou le dérivé de l'uracile. Ce composé **10** perd son activité lors des répétitions des tests de cytotoxicité témoignant d'une possible hydrolyse en adénosine dans le DMSO.

Tous ces travaux nous montrent que la souche **DP94** possède une grande plasticité de production. Elle produit un grand nombre de composés, dont plusieurs possèdent une activité cytotoxique. Sa production est également grandement influencée par les conditions de culture qui lui sont appliquées. La recherche des composés actifs peut être poursuivie par le renouvellement d'un plan d'expérience avec une adaptation des valeurs de chaque paramètre observé. Lorsque les conditions adéquates seront définies, une culture à grande échelle suivie d'un fractionnement ciblé sur les composés mis en évidence par réseaux moléculaires ou par analyse chimiométrique pourra être réalisée. L'identification de certains composés isolés reste encore à terminer. De plus, l'évaluation des propriétés antibiotiques de tous les composés isolés présente un intérêt majeur, du fait des propriétés biologiques précédemment décrites et de leur implication dans le « quorum-sensing » et devra donc être réalisée.

Lors de ce doctorat, nous avons également effectué des études pour déterminer les interactions possibles entre les deux principaux partenaires de la symbiose lichénique et les souches bactériennes associées aux lichens et ceci de deux manières. Nous nous sommes appuyés pour cela sur l'étude de la communication chimique entre bactéries et lichens, par l'intermédiaire de l'influence des composés lichéniques sur la croissance et le métabolisme des bactéries d'une part et sur la capacité bactérienne à les biotransformer d'autre part. Tout d'abord l'effet de l'acide usnique sur plusieurs souches bactériennes a confirmé un effet d'inhibition de la croissance des bactéries à Gram-positif ainsi qu'une modification du métabolisme de certaines d'entre elles. La souche productrice d'acide usnique (**MOLA1488**) est elle-même inhibée par ce composé. Il est donc probablement produit dans un but d'auto-régulation de la population bactérienne par la souche **MOLA1488**. La production de ce composé par le lichen est déjà expliquée pour son rôle photoprotecteur mais on peut y ajouter un rôle dans le contrôle de la colonisation bactérienne du thalle lichénique.

La seconde partie a consisté en une étude de biotransformation de composés lichéniques par trois souches bactériennes, représentatives des trois phyla bactériens les plus présents dans le thalle lichénique. Elle a permis de constater que les trois souches étudiées possèdent un potentiel de biotransformation de ce type de composés polyphénoliques. De nombreux dérivés ont été détectés et leur identification nécessite de réaliser l'étude sur un grand volume de culture. Cependant les dérivés

obtenus diffèrent en fonction de la souche étudiée ce qui montre qu'elles n'ont pas les mêmes capacités de biotransformation. Ces bactéries ont-elles développé cette capacité du fait de leur environnement ? S'agit-il d'un mécanisme de défense contre des composés potentiellement toxiques ? Ou utilisent-elles ces composés comme source de carbone ? L'identification des composés et des modifications structurales réalisées par les bactéries peuvent apporter des éléments de réponse à ces questions. L'analyse en cours par réalisation de réseaux moléculaires sur tous les extraits obtenus après biotransformation pourra déjà confirmer que les composés détectés sont bien des dérivés de l'acide usnique ou du MOC. Il est évident que la réalisation de cette étude sur une grande quantité de culture est nécessaire à la finalisation de ce travail. Les composés biotransformés pourront ainsi être identifiés et testés notamment pour leur activité antibiotique (notamment les dérivés de l'acide usnique).

Enfin, une stratégie de synthèse de composés azotés bioactifs a été établie lors de ces travaux. Elle a notamment permis la synthèse de la *N*-Boc-2-heptylpyrrolidine, démontrant la possibilité de synthétiser des alcaloïdes de type pyrrolidine. Elle doit donc permettre de synthétiser les cibles sélectionnées (bgugaine, coniine et tylophorine) mais diverses étapes d'optimisation sont encore nécessaires notamment par le biais de l'utilisation de nouveaux groupements protecteurs de la fonction alcool terminale. Certains dérivés ont été envisagés pour réaliser des essais de biotransformation par des souches bactériennes associées aux lichens. Ce type d'étude aurait permis de caractériser les capacités de biotransformation de nos souches envers des produits extérieurs à leur environnement. De plus, elle aurait permis d'accéder à une nouvelle diversité structurale. Enfin les composés sélectionnés possèdent tous un carbone asymétrique, l'utilisation d'enzymes bactériennes pour effectuer les étapes de synthèse énantiosélective représenterait un grand intérêt en termes de stéréosélectivité, de limitation du nombre d'étapes et de rendement.

Pour conclure, les travaux décrits dans ce manuscrit ont permis de développer des stratégies pour l'obtention de composés azotés bioactifs. Les bactéries associées aux lichens, organismes encore peu étudiés, permettent l'isolement de ce type de composés. Le profil chimique de souches bactériennes a été étudié et les propriétés biologiques des composés isolés ont été mises en évidence. La capacité de biotransformation de bactéries associées aux lichens a également été évaluée. Enfin, nous avons décrit une méthode d'obtention de composés azotés potentiellement bioactifs par synthèse.

Références bibliographiques

Références :

1. OMS | Cancer <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/> (accessed Apr 28, 2017).
2. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (3), 629–661.
3. Shukla, V.; Joshi, G.P.; Rawat, M.S.M. Lichens as a Potential Natural Source of Bioactive Compounds: A Review. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9* (2), 303–314.
4. Shrestha, G.; Clair, L.L.S. Lichens: A Promising Source of Antibiotic and Anticancer Drugs. *Phytochem. Rev.* **2013**, *12* (1), 229–244.
5. Suzuki, M.T.; Parrot, D.; Berg, G.; Grube, M.; Tomasi, S. Lichens as Natural Sources of Biotechnologically Relevant Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100* (2), 583–595.
6. Parrot, D.; Antony-Babu, S.; Intertaglia, L.; Grube, M.; Tomasi, S.; Suzuki, M.T. Littoral Lichens as a Novel Source of Potentially Bioactive Actinobacteria. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15839.
7. Selbmann, L.; Zucconi, L.; Ruisi, S.; Grube, M.; Cardinale, M.; Onofri, S. Culturable Bacteria Associated with Antarctic Lichens: Affiliation and Psychrotolerance. *Polar Biol.* **2010**, *33* (1), 71–83.
8. Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2005**, *58* (1), 1–26.
9. Bilyk, O.; Luzhetskyy, A. Metabolic Engineering of Natural Product Biosynthesis in Actinobacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *42*, 98–107.
10. Bates, S.T.; Cropsey, G.W.G.; Caporaso, J.G.; Knight, R.; Fierer, N. Bacterial Communities Associated with the Lichen Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77* (4), 1309–1314.
11. Lee, Y.M.; Kim, E.H.; Lee, H.K.; Hong, S.G. Biodiversity and Physiological Characteristics of Antarctic and Arctic Lichens-Associated Bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30* (10), 2711–2721.
12. Van Haluwyn, C.; Lerond, M. *Guide Des Lichens*, Editions Lechevalier.; Paris, 1993.
13. Ozenda, P.; Clauzade, G. *Les Lichens : Etude Biologique et Flore Illustrée*, Masson et Cie, Editeurs.; 1970.
14. Grube, M.; Cardinale, M.; de Castro, J.V.; Müller, H.; Berg, G. Species-Specific Structural and Functional Diversity of Bacterial Communities in Lichen Symbioses. *ISME J.* **2009**, *3* (9), 1105–1115.
15. Spribille, T.; Tuovinen, V.; Resl, P.; Vanderpool, D.; Wolinski, H.; Aime, M.C.; Schneider, K.; Stabentheiner, E.; Toome-Heller, M.; Thor, G.; Mayrhofer, H.; Johannesson, H.; McCutcheon, J.P. Basidiomycete Yeasts in the Cortex of Ascomycete Macrolichens. *Science* **2016**, *353* (6298), 488–492.
16. Lexique AFL http://www.afl-lichenologie.fr/Afl/Lexique/Lexiq_I_02.htm (accessed Jul 5, 2017).
17. Grube, M.; Berg, G. Microbial Consortia of Bacteria and Fungi with Focus on the Lichen Symbiosis. *Fungal Biol. Rev.* **2009**, *23* (3), 72–85.
18. Uphof, J.C.T. Purple Bacteria as Symbionts of a Lichen. *Science* **1925**, *61* (1568), 67–67.
19. Andrews, M.; Andrews, M.E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (4).
20. Histoire de la bactériologie. <http://www.cosmovisions.com/bacteriologieChrono.htm> (accessed Aug 7, 2017).
21. Bactérie. *Wikipédia*; 2017.
22. Bertrand, J.-C.; Caumette, P.; Lebaron, P.; Matheron, R.; Normand, P. *Ecologie Microbienne : Microbiologie Des Milieux Naturels et Anthropisés*, PUPPA-Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour.; Pau, France, 2011.
23. Protista. *Wikipédia*; 2017.

24. Futura. Bactérie <http://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-bacterie-101/> (accessed Aug 7, 2017).
25. Identification bactérienne par la coloration de GRAM - biotechnologie <http://www.technobio.fr/article-16615932.html> (accessed Aug 7, 2017).
26. Cardinale, M.; Vieira de Castro, J.; Müller, H.; Berg, G.; Grube, M. In Situ Analysis of the Bacterial Community Associated with the Reindeer Lichen *Cladonia Arbuscula* Reveals Predominance of Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2008**, *66* (1), 63–71.
27. Eymann, C.; Lassek, C.; Wegner, U.; Bernhardt, J.; Fritsch, O.A.; Fuchs, S.; Otto, A.; Albrecht, D.; Schiefelbein, U.; Cernava, T.; Aschenbrenner, I.; Berg, G.; Grube, M.; Riedel, K. Symbiotic Interplay of Fungi, Algae, and Bacteria within the Lung Lichen *Lobaria Pulmonaria* L. Hoffm. as Assessed by State-of-the-Art Metaproteomics. *J. Proteome Res.* **2017**, *16* (6), 2160–2173.
28. Grube, M.; Cernava, T.; Soh, J.; Fuchs, S.; Aschenbrenner, I.; Lassek, C.; Wegner, U.; Becher, D.; Riedel, K.; Sensen, C.W.; Berg, G. Exploring Functional Contexts of Symbiotic Sustain within Lichen-Associated Bacteria by Comparative Omics. *ISME J.* **2015**, *9* (2), 412–424.
29. Honegger, R.; Axe, L.; Edwards, D. Bacterial Epibionts and Endolichenic Actinobacteria and Fungi in the Lower Devonian Lichen *Chlorolichenomycites Salopensis*. *Fungal Biol.* **2013**, *117* (7), 512–518.
30. Cardinale, M.; Grube, M.; Castro, J.V.; Müller, H.; Berg, G. Bacterial Taxa Associated with the Lung Lichen *Lobaria Pulmonaria* Are Differentially Shaped by Geography and Habitat. *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, *329* (2), 111–115.
31. Cardinale, M.; Steinová, J.; Rabensteiner, J.; Berg, G.; Grube, M. Age, Sun and Substrate: Triggers of Bacterial Communities in Lichens. *Environ. Microbiol. Rep.* **2012**, *4* (1), 23–28.
32. Cardinale, M.; Puglia, A.M.; Grube, M. Molecular Analysis of Lichen-Associated Bacterial Communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *57* (3), 484–495.
33. Gtari, M.; Ghodhbane-Gtari, F.; Nouiou, I.; Beauchemin, N.; Tisa, L.S. Phylogenetic Perspectives of Nitrogen-Fixing Actinobacteria. *Arch. Microbiol.* **2012**, *194* (1), 3–11.
34. Liba, C. m.; Ferrara, F. i. s.; Manfio, G. p.; Fantinatti-Garboggini, F.; Albuquerque, R. c.; Pavan, C.; Ramos, P. I.; Moreira-Filho, C. a.; Barbosa, H. r. Nitrogen-Fixing Chemo-Organotrophic Bacteria Isolated from Cyanobacteria-Deprived Lichens and Their Ability to Solubilize Phosphate and to Release Amino Acids and Phytohormones. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101* (5), 1076–1086.
35. Ellis, C.J.; Crittenden, P.D.; Scrimgeour, C.M.; Ashcroft, C.J. Translocation of ¹⁵N Indicates Nitrogen Recycling in the Mat-Forming Lichen *Cladonia Portentosa*. *New Phytol.* **2005**, *168* (2), 423–434.
36. Cernava, T.; Müller, H.; Aschenbrenner, I.A.; Grube, M.; Berg, G. Analyzing the Antagonistic Potential of the Lichen Microbiome against Pathogens by Bridging Metagenomic with Culture Studies. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*.
37. Garrity, G.M.; Boone, D.R.; Castelholtz, R.W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*; Georges Garrity, David R. Boone and Castenholz Richard W., 2001.
38. Barka, E.A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; Wezel, G.P. van. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80* (1), 1–43.
39. Ventura, M.; Canchaya, C.; Tauch, A.; Chandra, G.; Fitzgerald, G.F.; Chater, K.F.; van Sinderen, D. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2007**, *71* (3), 495–548.
40. Bérdy, J. Thoughts and Facts about Antibiotics: Where We Are Now and Where We Are Heading. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2012**, *65* (8), 385–395.
41. Fiches modèles OMS d'information à l'usage des prescripteurs: Médicaments utilisés dans les mycobactérioses: Tuberculose: Streptomycine <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Js5512f/2.6.html> (accessed Oct 2, 2017).
42. Pubchem. geldanamycin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5288382> (accessed Oct 2, 2017).

43. Kahan, J.S.; Kahan, F.M.; Goegelman, R.; Currie, S.A.; Jackson, M.; Stapley, E.O.; Miller, T.W.; Miller, A.K.; Hendlin, D.; Mochales, S.; others. Thienamycin, a New β -Lactam Antibiotic I. Discovery, Taxonomy, Isolation and Physical Properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1979**, *32* (1), 1–12.
44. Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd edition.; Wiley, A John Wiley and Sons, Ltd., Publication: Chichester, West Sussex, United Kingdom, 2009.
45. Pubchem. lincomycin <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3000540> (accessed Oct 2, 2017).
46. Jizba, J.; Sedmera, P.; Zima, J.; Beran, M.; Blumauerová, M.; Kandybin, N.V.; Samoukina, G.V. Macrotetrolide Antibiotics Produced by *Streptomyces Globisporus*. *Folia Microbiol. (Praha)* **1991**, *36* (5), 437–443.
47. Ōmura, S.; Crump, A. Ivermectin: Panacea for Resource-Poor Communities? *Trends Parasitol.* **2014**, *30* (9), 445–455.
48. Isono, K.; Nagatsu, J.; Kobinata, K.; Sasaki, K.; Suzuki, S. Studies on Polyoxins, Antifungal Antibiotics: Part V. Isolation and Characterization of Polyoxins C, D, E, F, G, H and I. *Agric. Biol. Chem.* **1967**, *31* (2), 190–199.
49. Masukawa, H.; Tanaka, N.; Umezawa, H. Inhibition by Kasugamycin of Protein Synthesis in *Piricularia Oryzae*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1968**, *21* (1), 73–74.
50. Robson, G.D.; Kuhn, P.J.; Trinci, A.P.J. Effects of Validamycin A on the Morphology, Growth and Sporulation of *Rhizoctonia Cerealis*, *Fusarium Culmorum* and Other Fungi. *Microbiology* **1988**, *134* (12), 3187–3194.
51. Davis, H.L.; Hoff, D.D. von; Henney, J.E.; Rozenzweig, M. The Role of Antitumor Antibiotics in Current Oncologic Practice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1978**, *1* (2), 83–90.
52. Kumazawa, J.; Yagisawa, M. The History of Antibiotics: The Japanese Story. *J. Infect. Chemother.* **2002**, *8* (2), 125–133.
53. Grein, A. Antitumor Anthracyclines Produced by *Streptomyces Peucetius*. *Adv. Appl. Microbiol.* **1987**, *32*, 203–214.
54. Dactinomycin Monograph for Professionals <https://www.drugs.com/monograph/dactinomycin.html> (accessed Jul 26, 2017).
55. Umezawa, H.; Ishizuka, M.; Maeda, K.; Takeuchi, T. Studies on Bleomycin. *Cancer* **1967**, *20* (5), 891–895.
56. Wei, R.-B.; Xi, T.; Li, J.; Wang, P.; Li, F.-C.; Lin, Y.-C.; Qin, S. Lobophorin C and D, New Kijanimicin Derivatives from a Marine Sponge-Associated Actinomycetal Strain AZS17. *Mar. Drugs* **2011**, *9* (3), 359–368.
57. Braña, A.F.; Sarmiento-Vizcaíno, A.; Osset, M.; Pérez-Victoria, I.; Martín, J.; de Pedro, N.; de la Cruz, M.; Díaz, C.; Vicente, F.; Reyes, F.; García, L.A.; Blanco, G. Lobophorin K, a New Natural Product with Cytotoxic Activity Produced by *Streptomyces* Sp. M-207 Associated with the Deep-Sea Coral *Lophelia Pertusa*. *Mar. Drugs* **2017**, *15* (5).
58. Ding, L.; Maier, A.; Fiebig, H.-H.; Görls, H.; Lin, W.-H.; Peschel, G.; Hertweck, C. Divergolides A–D from a Mangrove Endophyte Reveal an Unparalleled Plasticity in Ansa-Macrolide Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (7), 1630–1634.
59. Lu, C.; Shen, Y. A New Macrolide Antibiotic with Antitumor Activity Produced by *Streptomyces* Sp. CS, a Commensal Microbe of *Maytenus Hookeri*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2003**, *56* (4), 415–418.
60. Li, J.; Lu, C.; Shen, Y. Macrolides of the Bafilomycin Family Produced by *Streptomyces* Sp. CS. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2010**, *63* (10), 595–599.
61. Xu, D.-B.; Ye, W.-W.; Han, Y.; Deng, Z.-X.; Hong, K. Natural Products from Mangrove Actinomycetes. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (5), 2590–2613.
62. Guo, Z.K.; Liu, S.B.; Jiao, R.H.; Wang, T.; Tan, R.X.; Ge, H.M. Angucyclines from an Insect-Derived Actinobacterium *Amycolatopsis* Sp. HCa1 and Their Cytotoxic Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (24), 7490–7493.
63. Carr, G.; Derbyshire, E.R.; Caldera, E.; Currie, C.R.; Clardy, J. Antibiotic and Antimalarial Quinones from Fungus-Growing Ant-Associated *Pseudonocardia* Sp. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (10), 1806–1809.

64. Schneemann, I.; Kajahn, I.; Ohlendorf, B.; Zinecker, H.; Erhard, A.; Nagel, K.; Wiese, J.; Imhoff, J.F. Mayamycin, a Cytotoxic Polyketide from a Streptomyces Strain Isolated from the Marine Sponge Halichondria Panicea. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (7), 1309–1312.
65. Sousa, T. da S.; Jimenez, P.C.; Ferreira, E.G.; Silveira, E.R.; Braz-Filho, R.; Pessoa, O.D.L.; Costa-Lotufo, L.V. Anthracyclines from Micromonospora Sp. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (3), 489–493.
66. Motohashi, K.; Takagi, M.; Shin-ya, K. Tetracenoquinocin and 5-Iminoaranciamycin from a Sponge-Derived Streptomyces Sp. Sp080513GE-26. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (4), 755–758.
67. Igarashi, Y.; Trujillo, M.E.; Martínez-Molina, E.; Yanase, S.; Miyanaga, S.; Obata, T.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Fujita, T.; Furumai, T. Antitumor Anthraquinones from an Endophytic Actinomycete Micromonospora Lupini Sp. Nov. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (13), 3702–3705.
68. Igarashi, Y.; Yanase, S.; Sugimoto, K.; Enomoto, M.; Miyanaga, S.; Trujillo, M.E.; Saiki, I.; Kuwahara, S. Lupinacin C, an Inhibitor of Tumor Cell Invasion from Micromonospora Lupini. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (4), 862–865.
69. Taechowisan, T.; Lu, C.; Shen, Y.; Lumyong, S. Antitumor Activity of 4-Arylcoumarins from Endophytic Streptomyces Aureofaciens CMUAc130. *J. Cancer Res. Ther.* **2007**, *3* (2), 86–91.
70. Ueda, J.; Khan, S.T.; Takagi, M.; Shin-ya, K. JBIR-58, a New Salicylamide Derivative, Isolated from a Marine Sponge-Derived Streptomyces Sp. SpD081030ME-02. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2010**, *63* (5), 267–269.
71. Kim, N.; Shin, J.C.; Kim, W.; Hwang, B.Y.; Kim, B.S.; Hong, Y.-S.; Lee, D. Cytotoxic 6-Alkylsalicylic Acids from the Endophytic Streptomyces Laceyi. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2006**, *59* (12), 797–800.
72. Shin, H.J.; Lee, H.-S.; Lee, J.S.; Shin, J.; Lee, M.A.; Lee, H.-S.; Lee, Y.-J.; Yun, J.; Kang, J.S. Violapyrones H and I, New Cytotoxic Compounds Isolated from Streptomyces Sp. Associated with the Marine Starfish Acanthaster Planci. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (6), 3283–3291.
73. Lin, C.; Lu, C.; Shen, Y. Three New 2-Pyrone Derivatives from Mangrove Endophytic Actinomycete Strain Nocardiopsis Sp. A00203. *Rec Nat Prod* **2010**, *4* (4), 176–179.
74. Igarashi, Y.; Miura, S.; Fujita, T.; Furumai, T. Pterocidin, a Cytotoxic Compound from the Endophytic Streptomyces Hygroscopicus. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2006**, *59* (3), 193–195.
75. Simmons, L.; Kaufmann, K.; Garcia, R.; Schwär, G.; Huch, V.; Müller, R. Bendigoles D–F, Bioactive Sterols from the Marine Sponge-Derived Actinomadura Sp. SBMs009. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (22), 6570–6575.
76. Kwon, Y.; Kim, S.-H.; Shin, Y.; Bae, M.; Kim, B.-Y.; Lee, S.K.; Oh, K.-B.; Shin, J.; Oh, D.-C. A New Benzofuran Glycoside and Indole Alkaloids from a Sponge-Associated Rare Actinomycete, Amycolatopsis Sp. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (4), 2326–2340.
77. Charan, R.D.; Schlingmann, G.; Janso, J.; Bernan, V.; Feng, X.; Carter, G.T. Diazepinomicin, a New Antimicrobial Alkaloid from a Marine Micromonospora Sp. [†]. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67* (8), 1431–1433.
78. Abdelmohsen, U.R.; Szesny, M.; Othman, E.M.; Schirmeister, T.; Grond, S.; Stopper, H.; Hentschel, U. Antioxidant and Anti-Protease Activities of Diazepinomicin from the Sponge-Associated Micromonospora Strain RV115. *Mar. Drugs* **2012**, *10* (10), 2208–2221.
79. Lorente, A.; Pla, D.; Cañedo, L.M.; Albericio, F.; Álvarez, M. Isolation, Structural Assignment, and Total Synthesis of Barmumycin. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (24), 8508–8515.
80. Wardecki, T.; Brötz, E.; Ford, C.D.; Loewenich, F.D. von; Rebets, Y.; Tokovenko, B.; Luzhetskyy, A.; Merfort, I. Endophytic Streptomyces in the Traditional Medicinal Plant Arnica Montana L.: Secondary Metabolites and Biological Activity. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2015**, *108* (2), 391–402.
81. Conti, R.; Chagas, F.O.; Caraballo-Rodríguez, A.M.; Melo, W.G. da P.; do Nascimento, A.M.; Cavalcanti, B.C.; de Moraes, M.O.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L.V.; Krogh, R.; Andricopulo, A.D.; Lopes, N.P.; Pupo, M.T. Endophytic Actinobacteria from the Brazilian Medicinal Plant Lychnophora Ericoides Mart. and the Biological Potential of Their Secondary Metabolites. *Chem. Biodivers.* **2016**, *13* (6), 727–736.

82. Khan, S.T.; Izumikawa, M.; Motohashi, K.; Mukai, A.; Takagi, M.; Shin-Ya, K. Distribution of the 3-Hydroxyl-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Gene and Isoprenoid Production in Marine-Derived Actinobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *304* (1), 89–96.
83. Liu, R.; Cui, C.-B.; Duan, L.; Gu, Q.-Q.; Zhu, W.-M. Potent in Vitro Anticancer Activity of Metacycloprodigiosin and Undecylprodigiosin from a Sponge-Derived Actinomycete *Saccharopolyspora* Sp. Nov. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28* (12), 1341–1344.
84. Ding, L.; Münch, J.; Goerls, H.; Maier, A.; Fiebig, H.-H.; Lin, W.-H.; Hertweck, C. Xiamycin, a Pentacyclic Indolosesquiterpene with Selective Anti-HIV Activity from a Bacterial Mangrove Endophyte. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (22), 6685–6687.
85. Ezra, D.; Castillo, U.F.; Strobel, G.A.; Hess, W.M.; Porter, H.; Jensen, J.B.; Condrón, M.A.M.; Teplow, D.B.; Sears, J.; Maranta, M.; Hunter, M.; Weber, B.; Yaver, D. Coronamycins, Peptide Antibiotics Produced by a Verticillate *Streptomyces* Sp. (MSU-2110) Endophytic on *Monstera* Sp. *Microbiology* **2004**, *150* (4), 785–793.
86. Romero, F.; Espliego, F.; Perez Baz, J.; Garcia de Quesada, T.; Gravalos, D.; De La Calle, F.; Fernandez-Puentes, J.L. Thiocoraline, a New Depsipeptide with Antitumor Activity Produced by a Marine Micromonospora. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1997**, *50* (9), 734–737.
87. Dawson, S.; Malkinson, J.P.; Paumier, D.; Searcey, M. Bisintercalator Natural Products with Potential Therapeutic Applications: Isolation, Structure Determination, Synthetic and Biological Studies. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (1), 109–126.
88. Wyche, T.P.; Hou, Y.; Braun, D.; Cohen, H.C.; Xiong, M.P.; Bugni, T.S. First Natural Analogs of the Cytotoxic Thiodepsipeptide Thiocoraline A from a Marine *Verrucosipora* Sp. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (16), 6542–6547.
89. Wicke, C.; Hüners, M.; Wray, V.; Nimtz, M.; Bilitewski, U.; Lang, S. Production and Structure Elucidation of Glycoglycerolipids from a Marine Sponge-Associated Microbacterium Species. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (5), 621–626.
90. Tan, G.-Y.; Liu, T. Rational Synthetic Pathway Refactoring of Natural Products Biosynthesis in Actinobacteria. *Metab. Eng.* **2017**, *39*, 228–236.
91. Thuan, N.H.; Pandey, R.P.; Sohng, J.K. Recent Advances in Biochemistry and Biotechnological Synthesis of Avermectins and Their Derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98* (18), 7747–7759.
92. Aschenbrenner, I.A.; Cardinale, M.; Berg, G.; Grube, M. Microbial Cargo: Do Bacteria on Symbiotic Propagules Reinforce the Microbiome of Lichens? *Environ. Microbiol.* **2014**, *16* (12), 3743–3752.
93. Bjelland, T.; Grube, M.; Hoem, S.; Jorgensen, S.L.; Daae, F.L.; Thorseth, I.H.; Øvreås, L. Microbial Metacommunities in the Lichen–rock Habitat. *Environ. Microbiol. Rep.* **2011**, *3* (4), 434–442.
94. González, I.; Ayuso-Sacido, A.; Anderson, A.; Genilloud, O. Actinomycetes Isolated from Lichens: Evaluation of Their Diversity and Detection of Biosynthetic Gene Sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *54* (3), 401–415.
95. Yamamura, H.; Ashizawa, H.; Nakagawa, Y.; Hamada, M.; Ishida, Y.; Otoguro, M.; Tamura, T.; Hayakawa, M. *Actinomycetospora* *Rishiriensis* Sp. Nov., Isolated from a Lichen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2011**, *61* (11), 2621–2625.
96. Cardinale, M.; Grube, M.; Berg, G. *Frondihabitans* *Cladoniophilus* Sp. Nov., an Actinobacterium of the Family Microbacteriaceae Isolated from Lichen, and Emended Description of the Genus *Frondihabitans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2011**, *61* (12), 3033–3038.
97. Yamamura, H.; Ashizawa, H.; Nakagawa, Y.; Hamada, M.; Ishida, Y.; Otoguro, M.; Tamura, T.; Hayakawa, M. *Actinomycetospora* *Iriomotensis* Sp. Nov., a Novel Actinomycete Isolated from a Lichen Sample. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2011**, *64* (4), 289–292.
98. Singh, S.B.; Garrity, G.M.; Genilloud, O.; Lingham, R.; Martin, I.; Nallin-Omstead, M.; Silverman, K.C.; Zink, D.L. Inhibitor Compounds of Farnesyl-Protein Transferase and Chemotherapeutic Compositions Containing the Same, Produced by Strain ATCC 55532, 1997.
99. Davies, J.; Wang, H.; Taylor, T.; Warabi, K.; Huang, X.-H.; Andersen, R.J. Uncialamycin, A New Eneidyne Antibiotic. *Org. Lett.* **2005**, *7* (23), 5233–5236.

100. Nicolaou, K.C.; Chen, J.S.; Zhang, H.; Montero, A. Asymmetric Synthesis and Biological Properties of Uncialamycin and 26-Epi-Uncialamycin. *Angew. Chem.* **2008**, *120* (1), 191–195.
101. Williams, D.E.; Bottriell, H.; Davies, J.; Tietjen, I.; Brockman, M.A.; Andersen, R.J. Unciaphenol, an Oxygenated Analogue of the Bergman Cyclization Product of Uncialamycin Exhibits Anti-HIV Activity. *Org. Lett.* **2015**, *17* (21), 5304–5307.
102. Williams, D.E.; Davies, J.; Patrick, B.O.; Bottriell, H.; Tarling, T.; Roberge, M.; Andersen, R.J. Cladoniamides A–G, Tryptophan-Derived Alkaloids Produced in Culture by Streptomyces Uncialis. *Org. Lett.* **2008**, *10* (16), 3501–3504.
103. Motohashi, K.; Takagi, M.; Yamamura, H.; Hayakawa, M.; Shin-ya, K. A New Angucycline and a New Butenolide Isolated from Lichen-Derived Streptomyces Spp. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2010**, *63* (9), 545–548.
104. Parrot, D.; Legrave, N.; Delmail, D.; Grube, M.; Suzuki, M.; Tomasi, S. Review – Lichen-Associated Bacteria as a Hot Spot of Chemodiversity: Focus on Uncialamycin, a Promising Compound for Future Medicinal Applications. *Planta Med.* **2016**, *82* (13), 1143–1152.
105. Nocardia species (Nocardiosis) - Infectious Disease and Antimicrobial Agents <http://www.antimicrobe.org/b117.asp> (accessed Jul 27, 2017).
106. Laurent, F.; Mick, V.; Boiron, P. Clinique et Biologie de La Nocardiose. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **1999**, *57* (5), 545–554.
107. Luo, Q.; Hiessl, S.; Steinbüchel, A. Functional Diversity of Nocardia in Metabolism. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16* (1), 29–48.
108. Cricchio, R.; Antonini, P.; Sartori, G. Thiazorifamycins. III Biosynthesis of Ryfamycins P, Q and Verde, Novel Metabolites from a Mutant of Nocardia Mediterranea. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33* (8), 842–846.
109. Kavitha, A.; Prabhakar, P.; Narasimhulu, M.; Vijayalakshmi, M.; Venkateswarlu, Y.; Venkateswara Rao, K.; Balaraju Subba Raju, V. Isolation, Characterization and Biological Evaluation of Bioactive Metabolites from Nocardia Levis MK-VL_113. *Microbiol. Res.* **2010**, *165* (3), 199–210.
110. Kavitha, A.; Prabhakar, P.; Vijayalakshmi, M.; Venkateswarlu, Y. Production of Bioactive Metabolites by Nocardia Levis MK-VL_113. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *49* (4), 484–490.
111. Hara, S.; Ishikawa, N.; Hara, Y.; Nehira, T.; Sakai, K.; Gono, T.; Ishibashi, M. Nabscessins A and B, Aminocyclitol Derivatives from Nocardia Abscessus IFM 10029T. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (2), 565–568.
112. 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* (7), 619–627.
113. Roullier, C.; Bertrand, S.; Blanchet, E.; Peigné, M.; Robiou du Pont, T.; Guittou, Y.; Pouchus, Y.; Grovel, O. Time Dependency of Chemodiversity and Biosynthetic Pathways: An LC-MS Metabolomic Study of Marine-Sourced Penicillium. *Mar. Drugs* **2016**, *14* (5), 103.
114. Isik, K.; Chun, J.; Hah, Y.C.; Goodfellow, M. Nocardia Salmonicida Nom. Rev., a Fish Pathogen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1999**, *49* (2), 833–837.
115. Maldonado, L.; Hookey, J.V.; Ward, A.C.; Goodfellow, M. The Nocardia Salmonicida Clade, Including Descriptions of Nocardia Cummidelens Sp. Nov., Nocardia Fluminea Sp. Nov. and Nocardia Soli Sp. Nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2000**, *78* (3–4), 367–377.
116. Croissance bacterienne - Cours de biologie, sur eBiologie <http://www.ebiologie.fr/cours/s/56/croissance-bacterienne> (accessed Aug 13, 2017).
117. Collégiale des Enseignants de bactériologie-virologie-hygiène. Croissance des bactéries http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_4b/site/html/cours.pdf (accessed Aug 13, 2017).
118. Croissance bactérienne http://ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours_td/microbiosv3/COURS%20SV3/CROISSANCE%20BACTERIENNE.pdf (accessed Aug 13, 2017).

119. Abdel-Hameed, E.-S.S.; Bazaid, S.A.; Shohayeb, M.M.; El-Sayed, M.M.; El-Wakil, E.A. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus Erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *Eur. J. Med. Plants* **2012**, *2* (2), 93–112.
120. Bhattacharya, A.; Das, S.; Majumder, P.; Batish, A. Estimating the Effect of Cutting Parameters on Surface Finish and Power Consumption during High Speed Machining of AISI 1045 Steel Using Taguchi Design and ANOVA. *Prod. Eng.* **2009**, *3* (1), 31–40.
121. Shankar, T.; Muthusubramanian, S.; Gandhidasan, R. A Chromanone Alkaloid from *Derris Ovalifolia* Stem. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23* (17), 1652–1656.
122. McKay, M.J.; Carroll, A.R.; Quinn, R.J.; Hooper, J.N.A. 1,2-Bis(1 *H* -Indol-3-Yl)ethane-1,2-Dione, an Indole Alkaloid from the Marine Sponge *Smenospongia* Sp. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (4), 595–597.
123. Wang, P.; Kong, F.; Wei, J.; Wang, Y.; Wang, W.; Hong, K.; Zhu, W. Alkaloids from the Mangrove-Derived Actinomycete *Jishengella Endophytica* 161111. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (1), 477–490.
124. Wu, S.J.; Fotso, S.; Li, F.; Qin, S.; Laatsch, H. Amorphane Sesquiterpenes from a Marine *Streptomyces* sp., 1. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (2), 304–306.
125. Gutierrez-Lugo, M.-T.; Woldemichael, G.M.; Singh, M.P.; Suarez, P.A.; Maiese, W.M.; Montenegro, G.; Timmermann, B.N. Isolation of Three New Naturally Occurring Compounds from the Culture of *Micromonospora* Sp. P1068. *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19* (7), 645–652.
126. Li, X.; Dobretsov, S.; Xu, Y.; Xiao, X.; Hung, O.S.; Qian, P. Antifouling Diketopiperazines Produced by a Deep-Sea Bacterium, *Streptomyces Fungicidicus*. *Biofouling* **2006**, *22* (3), 187–194.
127. Alshaibani, M.M.; Zin, N.M.; Jalil, J.; Sidik, N.M.; Ahmad, S.J.; Kamal, N.; Edrada-Ebel, R. Isolation, Purification, and Characterization of Five Active Diketopiperazine Derivatives from Endophytic *Streptomyces* SUK 25 with Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27* (7), 1249–1256.
128. Wattana-Amorn, P.; Charoenwongsa, W.; Williams, C.; Crump, M.P.; Apichaisataienchote, B. Antibacterial Activity of cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(D -Pro-L-Tyr) from *Streptomyces* Sp. Strain 22-4 against Phytopathogenic Bacteria. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30* (17), 1980–1983.
129. Cho, J.Y.; Kang, J.Y.; Hong, Y.K.; Baek, H.H.; Shin, H.W.; Kim, M.S. Isolation and Structural Determination of the Antifouling Diketopiperazines from Marine-Derived *Streptomyces Praecox* 291-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76* (6), 1116–1121.
130. Cheenpracha, S.; Borris, R.P.; Tran, T.T.; Jee, J.M.; Seow, H.F.; Cheah, H.-Y.; Ho, C.C.; Chang, L.C. Three New Amides from *Streptomyces* Sp. H7372. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22* (2), 223–229.
131. Perrone, P.; Daverio, F.; Valente, R.; Rajyaguru, S.; Martin, J.A.; Lévêque, V.; Pogam, S.L.; Najera, I.; Klumpp, K.; Smith, D.B.; McGuigan, C. First Example of Phosphoramidate Approach Applied to a 4'-Substituted Purine Nucleoside (4'-Azidoadenosine): Conversion of an Inactive Nucleoside to a Submicromolar Compound versus Hepatitis C Virus. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (22), 5463–5470.
132. McCarthy Jr, J.R.; Robins, R.K.; Robins, M.J. Purine Nucleosides. XXII. Synthesis of Angustmycin A (Decoyinine) and Related Unsaturated Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (18), 4993–4999.
133. Yang, X.-Q.; Yang, Y.-B.; Zhou, H.; He, G.-W.; Zhao, L.-X.; Xu, L.-H.; Ding, Z.-T. New Megastigmane Glycoside and Alkaloids from *Streptomyces* Sp. YIM 63342. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27* (13), 1191–1196.
134. Noël, A.; Ferron, S.; Rouaud, I.; Gouault, N.; Hurvois, J.-P.; Tomasi, S. Isolation and Structure Identification of Novel Brominated Diketopiperazines from *Nocardia ignorata*—A Lichen-Associated Actinobacterium. *Molecules* **2017**, *22* (3), 371.
135. Smaoui, S.; Mathieu, F.; Elleuch, L.; Coppel, Y.; Merlina, G.; Karray-Rebai, I.; Mellouli, L. Taxonomy, Purification and Chemical Characterization of Four Bioactive Compounds from New *Streptomyces* Sp. TN256 Strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28* (3), 793–804.
136. Qi, S.-H.; Xu, Y.; Gao, J.; Qian, P.-Y.; Zhang, S. Antibacterial and Antilarval Compounds from Marine bacterium *Pseudomonas Rhizosphaerae*. *Ann. Microbiol.* **2009**, *59* (2), 229.

137. Tommonaro, G.; Abbamondi, G.R.; Iodice, C.; Tait, K.; Rosa, S.D. Diketopiperazines Produced by the Halophilic Archaeon, *Haloterrigena Hispanica*, Activate AHL Bioreporters. *Microb. Ecol.* **2012**, *63* (3), 490–495.
138. Stierle, A.C.; Cardellina, J.H.; Strobel, G.A. Maculosin, a Host-Specific Phytotoxin for Spotted Knapweed from *Alternaria Alternata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85* (21), 8008–8011.
139. Holden, M.T.G.; Ram Chhabra, S.; De Nys, R.; Stead, P.; Bainton, N.J.; Hill, P.J.; Manefield, M.; Kumar, N.; Labatte, M.; England, D.; Rice, S.; Givskov, M.; Salmond, G.P.C.; Stewart, G.S.A.B.; Bycroft, B.W.; Kjelleberg, S.; Williams, P. Quorum-Sensing Cross Talk: Isolation and Chemical Characterization of Cyclic Dipeptides from *Pseudomonas Aeruginosa* and Other Gram-Negative Bacteria. *Mol. Microbiol.* **1999**, *33* (6), 1254–1266.
140. Degrassi, G.; Aguilar, C.; Bosco, M.; Zahariev, S.; Pongor, S.; Venturi, V. Plant Growth-Promoting *Pseudomonas Putida* WCS358 Produces and Secretes Four Cyclic Dipeptides: Cross-Talk with Quorum Sensing Bacterial Sensors. *Curr. Microbiol.* **2002**, *45* (4), 250–254.
141. Nishanth Kumar, S.; Mohandas, C.; Nambisan, B. Purification, Structural Elucidation and Bioactivity of Tryptophan Containing Diketopiperazines, from *Comamonas Testosteroni* Associated with a Rhabditid Entomopathogenic Nematode against Major Human-Pathogenic Bacteria. *Peptides* **2014**, *53*, 48–58.
142. Rhee, K.-H. Cyclic Dipeptides Exhibit Synergistic, Broad Spectrum Antimicrobial Effects and Have Anti-Mutagenic Properties. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24* (5), 423–427.
143. Nishanth Kumar, S.; Mohandas, C.; Siji, J. v.; Rajasekharan, K. n.; Nambisan, B. Identification of Antimicrobial Compound, Diketopiperazines, from a *Bacillus* Sp. N Strain Associated with a Rhabditid Entomopathogenic Nematode against Major Plant Pathogenic Fungi. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113* (4), 914–924.
144. Rhee, K.-H. In Vitro Activity of Cyclic Dipeptides Against Gram-Positive and GramNegative Anaerobic Bacteria and Radioprotective Effect on Lung Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *16* (1), 158–162.
145. Yan, P.-S.; Song, Y.; Sakuno, E.; Nakajima, H.; Nakagawa, H.; Yabe, K. Cyclo(L-Leucyl-L-Prolyl) Produced by *Achromobacter Xylooxidans* Inhibits Aflatoxin Production by *Aspergillus Parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70* (12), 7466–7473.
146. Rhee, K.-H. Purification and Identification of an Antifungal Agent from *Streptomyces* Sp. KH-614 Antagonistic to Rice Blast Fungus, *Pyricularia Oryzae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *13* (6), 984–988.
147. Kumar, S.N.; Siji, J.V.; Nambisan, B.; Mohandas, C. Activity and Synergistic Antimicrobial Activity Between Diketopiperazines Against Bacteria In Vitro. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168* (8), 2285–2296.
148. Adénosine <https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/mediateurs/medicaments-impact-purinergique-antagonistes-atp/adenosine/> (accessed Aug 20, 2017).
149. McCarthy, J.R.; Robins, M.J.; Robins, R.K. The Synthesis of Unsaturated Adenine Nucleosides Related to Angustmycin A. *Chem. Commun. Lond.* **1967**, *0* (11), 536–537.
150. Jost, M.; Simpson, J.H.; Drennan, C.L. The Transcription Factor CarH Safeguards Use of Adenosylcobalamin as a Light Sensor by Altering the Photolysis Products. *Biochemistry (Mosc.)* **2015**, *54* (21), 3231–3234.
151. Martínez-Luis, S.; Gómez, J.F.; Spadafora, C.; Guzmán, H.M.; Gutiérrez, M. Antitrypanosomal Alkaloids from the Marine Bacterium *Bacillus Pumilus*. *Molecules* **2012**, *17* (9), 11146–11155.
152. Chen, J.-T.; Su, H.-J.; Huang, J.-W. Isolation and Identification of Secondary Metabolites of *Clitocybe Nuda* Responsible for Inhibition of Zoospore Germination of *Phytophthora Capsici*. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (30), 7341–7344.
153. Inoue, H.; Yajima, Y.; Kawano, G.; Nagasawa, H.; Sakuda, S. Isolation of Indole-3-Aldehyde as a Growth Inhibitor of *Legionella Pneumophila* from Diaion HP-20 Resins Used to Culture the Bacteria. *Biocontrol Sci.* **2004**, *9* (1–2), 39–41.
154. Rajalaxmi, M.; Beema Shafreen, R.; Iyer, P.M.; Sahaya Vino, R.; Balamurugan, K.; Pandian, S.K. An in Silico, in Vitro and in Vivo Investigation of Indole-3-Carboxaldehyde Identified from the

- Seawater Bacterium *Marinomonas* Sp. as an Anti-Biofilm Agent against *Vibrio Cholerae* O1. *Biofouling* **2016**, 32 (4), 439–450.
155. Rajalaxmi, M.; Amsa Devi, V.; Karutha Pandian, S. In Vitro Evaluation of Indole-3-Carboxaldehyde on *Vibrio Parahaemolyticus* Biofilms. *Biologia (Bratisl.)* **2016**, 71 (3).
 156. Borthwick, A.D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chem. Rev.* **2012**, 112 (7), 3641–3716.
 157. Stark, T.; Hofmann, T. Structures, Sensory Activity, and Dose/Response Functions of 2,5-Diketopiperazines in Roasted Cocoa Nibs (*Theobroma Cacao*). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (18), 7222–7231.
 158. Hibbing, M.E.; Fuqua, C.; Parsek, M.R.; Peterson, S.B. Bacterial Competition: Surviving and Thriving in the Microbial Jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, 8 (1), 15–25.
 159. Ghoul, M.; Mitri, S. The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends Microbiol.* **2016**, 24 (10), 833–845.
 160. An, D.; Danhorn, T.; Fuqua, C.; Parsek, M.R. Quorum Sensing and Motility Mediate Interactions between *Pseudomonas Aeruginosa* and *Agrobacterium Tumefaciens* in Biofilm Cocultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (10), 3828–3833.
 161. Amensalisme | Biodiversité positive <http://www.biodiversite-positive.fr/lexique/amensalisme/> (accessed Aug 31, 2017).
 162. Casida, L.E. Interaction of *Agromyces Ramosus* with Other Bacteria in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, 46 (4), 881–888.
 163. *Micavibrio aeruginosavorus* (strain ARL-13) <http://www.uniprot.org/proteomes/UP000009286> (accessed Aug 31, 2017).
 164. Jurkevitch, É.; Jacquet, S. *Bdellovibrio* et organismes apparentés - Des prédateurs bactériens hors du commun ! *médecine/sciences* **2017**, 33 (5), 519–527.
 165. Kadouri, D.E.; To, K.; Shanks, R.M.Q.; Doi, Y. Predatory Bacteria: A Potential Ally against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *PLOS ONE* **2013**, 8 (5), e63397.
 166. He, X.; McLean, J.S.; Edlund, A.; Yooseph, S.; Hall, A.P.; Liu, S.-Y.; Dorrestein, P.C.; Esquenazi, E.; Hunter, R.C.; Cheng, G.; Nelson, K.E.; Lux, R.; Shi, W. Cultivation of a Human-Associated TM7 Phylotype Reveals a Reduced Genome and Epibiotic Parasitic Lifestyle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, 112 (1), 244–249.
 167. Cellulose Degradation in the Rumen - MicrobeWiki https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Cellulose_Degradation_in_the_Rumen (accessed Sep 1, 2017).
 168. Elshahed, M.S.; McInerney, M.J. Benzoate Fermentation by the Anaerobic Bacterium *Syntrophus Aciditrophicus* in the Absence of Hydrogen-Using Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67 (12), 5520–5525.
 169. Thématiques de recherche <http://www.unige.ch/sciences/biologie/biveg/microbio/themes/XavierPerret/RecherchesXP.html> (accessed Sep 1, 2017).
 170. Futura. Bactéries : les relations symbiotiques <http://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/biologie-bacteries-leur-monde-nous-1433/page/7/> (accessed Sep 1, 2017).
 171. Roland, J.-C.; Bouteau, H.E.M.; Bouteau, F. *Atlas de biologie végétale - Tome 1 - 7ème édition*; Dunod, 2008.
 172. FMPMC-PS - Bactériologie - Niveau DCEM1 <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.2.2.html> (accessed Sep 2, 2017).
 173. Transformation-conjugaison et transduction <http://www.jpboiseret.eu/biologie/index.php/microbiologie/80-transformation-conjugaison-et-transduction> (accessed Sep 2, 2017).
 174. 22: La conjugaison bactérienne - BiOutils <https://www.bioutils.ch/protocoles/22-la-conjugaison-bacterienne> (accessed Sep 2, 2017).

175. Downie, J.A. The Roles of Extracellular Proteins, Polysaccharides and Signals in the Interactions of Rhizobia with Legume Roots. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34* (2), 150–170.
176. Nealson, K.H.; Platt, T.; Hastings, J.W. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System1. *J. Bacteriol.* **1970**, *104* (1), 313–322.
177. Williams, P.; Winzer, K.; Chan, W.C.; Cámara, M. Look Who's Talking: Communication and Quorum Sensing in the Bacterial World. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2007**, *362* (1483), 1119–1134.
178. Dunny, G.M.; Leonard, B.A. Cell-Cell Communication in Gram-Positive Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51* (1), 527–564.
179. Braga, R.M.; Dourado, M.N.; Araújo, W.L. Microbial Interactions: Ecology in a Molecular Perspective. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47* (Suppl 1), 86–98.
180. Kan, J.; Fang, R.; Jia, Y. Interkingdom Signaling in Plant-Microbe Interactions. *Sci. China Life Sci.* **2017**, *60* (8), 785–796.
181. De Sordi, L.; Mühlischlegel, F.A. Quorum Sensing and Fungal–bacterial Interactions in *Candida Albicans*: A Communicative Network Regulating Microbial Coexistence and Virulence. *FEMS Yeast Res.* **2009**, *9* (7), 990–999.
182. Reusser, F.; Koepsell, H.J.; Savage, G.M. Continuous Microbiological Transformation of Steroids. *Appl. Microbiol.* **1961**, *9* (4), 346–348.
183. Viot, D. La Glucose Isomérase de *Streptomyces Violaceoniger*, Université des Sciences et Techniques de Lille: Lille, 1984.
184. Les procédés de fabrication pour la production de bioéthanol <http://www.alcool-bioethanol.net/procedes-2/> (accessed Sep 7, 2017).
185. Silveira, M.M.; Wisbeck, E.; Lemmel, C.; Erzinger, G.; Lopes da Costa, J.P.; Bertasso, M.; Jonas, R. Bioconversion of Glucose and Fructose to Sorbitol and Gluconic Acid by Untreated Cells of *Zymomonas Mobilis*. *J. Biotechnol.* **1999**, *75* (2), 99–103.
186. Kuo, T.M.; Kaneshiro, T. Selection of Saprophytic Bacteria and Characterization of Their Fatty Acid Bioconversions during Compost Formation. *Applied Biocatalysis in Specialty Chemicals and Pharmaceuticals*; Saha, B. C., Demirjian, D. C., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2001; Vol. 776, pp 55–64.
187. Hosokawa, M.; Hou, C.T.; Weisleder, D. Bioconversion of n–3 and n–6 PUFA by *Clavibacter* Sp. ALA2. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80* (11), 1085–1091.
188. Uy, D. Etude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique : instabilité de la production de glutamate en procédé continu thermo-induit, INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE: Vandoeuvre-lès-Nancy, 2003.
189. Osterman, A.; Rodionov, D. Subsystem: Lysine Biosynthesis DAP Pathway.
190. Hubert, J.-C.; Wurtz, B. Régulation et signification physiologique de l'aspartate-ammonium lyase (aspartase) de *Pseudomonas fluorescens* type R. *Arch. Microbiol.* **1975**, *102* (1), 35–39.
191. Cao, Y.-D.; He, Y.-C.; Li, H.; Kai, G.-Y.; Xu, J.-H.; Yu, H.-L. Efficient Biosynthesis of Rare Natural Product Scopolamine Using *E. Coli* Cells Expressing a S14P/K97A Mutant of Hyoscyamine 6 β -Hydroxylase AaH6H. *J. Biotechnol.* **2015**, *211*, 123–129.
192. De Muynck, C.; Pereira, C.S.S.; Naessens, M.; Parmentier, S.; Soetaert, W.; Vandamme, E.J. The Genus *Gluconobacter* Oxydans : Comprehensive Overview of Biochemistry and Biotechnological Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2007**, *27* (3), 147–171.
193. Sarks, C.; Jin, M.; Sato, T.K.; Balan, V.; Dale, B.E. Studying the Rapid Bioconversion of Lignocellulosic Sugars into Ethanol Using High Cell Density Fermentations with Cell Recycle. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 73.
194. Parke, D. Positive Selection for Mutations Affecting Bioconversion of Aromatic Compounds in *Agrobacterium Tumefaciens*: Analysis of Spontaneous Mutations in the Protocatechuate 3,4-Dioxygenase Gene. *J. Bacteriol.* **2000**, *182* (21), 6145–6153.

195. Hwang, S.; Choi, C.Y.; Lee, E.Y. Enantioconvergent Bioconversion of P-Chlorostyrene Oxide to (R)-P-Chlorophenyl-1,2-Ethandiol by the Bacterial Epoxide Hydrolase of *Caulobacter Crescentus*. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30* (7), 1219–1225.
196. Jun, S.-Y.; Lewis, K.M.; Youn, B.; Xun, L.; Kang, C. Structural and Biochemical Characterization of EDTA Monooxygenase and Its Physical Interaction with a Partner Flavin Reductase. *Mol. Microbiol.* **2016**, *100* (6), 989–1003.
197. Tanaka, M.; Yamamoto, H.; Izumi, Y.; Yamada, H. Purification and Properties of Biotinyl-CoA Synthetase from *Mycoplasma* Sp. No. 166. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *251* (2), 479–486.
198. Osakai, M.; Izumi, Y.; Nakamura, K.; Yamada, H. Bacterial Degradation of Biotin and Dethiobiotin: Isolation and Identification of β -Hydroxy and Keto Metabolites. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50* (2), 311–316.
199. Marton, L.J.; Pegg, A.E. Polyamines as Targets for Therapeutic Intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1995**, *35* (1), 55–91.
200. Sakurada, K.; Ohta, T.; Fujishiro, K.; Hasegawa, M.; Aisaka, K. Acetyl polyamine Amidohydrolase from *Mycoplasma Ramea*: Gene Cloning and Characterization of the Metal-Substituted Enzyme. *J. Bacteriol.* **1996**, *178* (19), 5781–5786.
201. FERMENTATIONS - Encyclopædia Universalis <http://www.universalis-edu.com/passerelle.univ-rennes1.fr/encyclopedie/fermentations/> (accessed Sep 28, 2017).
202. Lee, N.-K.; Paik, H.-D. Bioconversion Using Lactic Acid Bacteria: Ginsenosides, GABA, and Phenolic Compounds. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27* (5), 869–877.
203. Maki, M.; Leung, K.T.; Qin, W. The Prospects of Cellulase-Producing Bacteria for the Bioconversion of Lignocellulosic Biomass. *Int. J. Biol. Sci.* **2009**, *5* (5), 500–516.
204. Fatehi, P. Recent Advancements in Various Steps of Ethanol, Butanol, and Isobutanol Productions from Woody Materials. *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29* (2), 297–310.
205. Wackett, L.P. Microbial-Based Motor Fuels: Science and Technology. *Microb. Biotechnol.* **2008**, *1* (3), 211–225.
206. Munasinghe, P.C.; Khanal, S.K. Biomass-Derived Syngas Fermentation into Biofuels: Opportunities and Challenges. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (13), 5013–5022.
207. Fernández-Naveira, Á.; Abubackar, H.N.; Veiga, M.C.; Kennes, C. Production of Chemicals from C1 Gases (CO, CO₂) by *Clostridium Carboxidivorans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33* (3), 43.
208. Kuo, L.-C.; Cheng, W.-Y.; Wu, R.-Y.; Huang, C.-J.; Lee, K.-T. Hydrolysis of Black Soybean Isoflavone Glycosides by *Bacillus Subtilis* Natto. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *73* (2), 314–320.
209. Vary, P.S.; Biedendieck, R.; Fuerch, T.; Meinhardt, F.; Rohde, M.; Deckwer, W.-D.; Jahn, D. *Bacillus Megaterium*—from Simple Soil Bacterium to Industrial Protein Production Host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76* (5), 957–967.
210. Sahoo, D.K.; Das, A.; Thatoi, H.; Mondal, K.C.; Mohapatra, P.K.D. Keratinase Production and Biodegradation of Whole Chicken Feather Keratin by a Newly Isolated Bacterium Under Submerged Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167* (5), 1040–1051.
211. Mohammed Sakr, M.; Mohamed Anwar Aboshanab, K.; Mabrouk Aboulwafa, M.; Abdel-Haleem Hassouna, N. Characterization and Complete Sequence of Lactonase Enzyme from *Bacillus Weihsenstephanensis* Isolate P65 with Potential Activity against Acyl Homoserine Lactone Signal Molecules. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*.
212. Mnif, I.; Mnif, S.; Sahnoun, R.; Maktouf, S.; Ayedi, Y.; Ellouze-Chaabouni, S.; Ghribi, D. Biodegradation of Diesel Oil by a Novel Microbial Consortium: Comparison between Co-Inoculation with Biosurfactant-Producing Strain and Exogenously Added Biosurfactants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22* (19), 14852–14861.
213. Wu, C.; Du, C.; Gubbens, J.; Choi, Y.H.; van Wezel, G.P. Metabolomics-Driven Discovery of a Prenylated Isatin Antibiotic Produced by *Streptomyces* Species MBT28. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (10), 2355–2363.

214. Yamada, S.; Miyagawa, T.-A.; Yamada, R.; Shiratori-Takano, H.; Sayo, N.; Saito, T.; Takano, H.; Beppu, T.; Ueda, K. Amide-Transforming Activity of *Streptomyces*: Possible Application to the Formation of Hydroxy Amides and Aminoalcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (14), 6223–6230.
215. Kim, H.-J.; Choi, K.-Y.; Jung, D.-H.; Jung, J.-Y.; Jung, E.; Yang, Y.-H.; Kim, B.-G.; Oh, M.-K. Transcriptomic Study for Screening Genes Involved in the Oxidative Bioconversions of *Streptomyces Avermitilis*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2013**, *36* (11), 1621–1630.
216. Davis, P.J.; Rizzo, J.D. Microbial Transformations of Warfarin: Stereoselective Reduction by *Nocardia Corallina* and *Arthrobacter* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43* (4), 884–890.
217. Hanne, L.F.; Kirk, L.L.; Appel, S.M.; Narayan, A.D.; Bains, K.K. Degradation and Induction Specificity in Actinomycetes That Degrade P-Nitrophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59* (10), 3505–3508.
218. El Sayed, K.A. Microbial Biotransformation of Veratramine. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (1), 149–151.
219. Hosny, M.; Johnson, H.A.; Ueltschy, A.K.; Rosazza, J.P.N. Oxidation, Reduction, and Methylation of Carnosic Acid by *Nocardia*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (9), 1266–1269.
220. Teniola, O.D.; Addo, P.A.; Brost, I.M.; Färber, P.; Jany, K.-D.; Alberts, J.F.; van Zyl, W.H.; Steyn, P.S.; Holzapfel, W.H. Degradation of Aflatoxin B1 by Cell-Free Extracts of *Rhodococcus Erythropolis* and *Mycobacterium Fluoranthenorans* Sp. Nov. DSM44556T. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *105* (2), 111–117.
221. Zeinali, M.; Vossoughi, M.; Ardestani, S. k. Degradation of Phenanthrene and Anthracene by *Nocardia Otitidiscaviarum* Strain TSH1, a Moderately Thermophilic Bacterium. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105* (2), 398–406.
222. Nhi-Cong, L.T.; Mikolasch, A.; Awe, S.; Sheikhany, H.; Klenk, H.-P.; Schauer, F. Oxidation of Aliphatic, Branched Chain, and Aromatic Hydrocarbons by *Nocardia Cyriacigeorgica* Isolated from Oil-Polluted Sand Samples Collected in the Saudi Arabian Desert. *J. Basic Microbiol.* **2010**, *50* (3), 241–253.
223. Veselá, A.B.; Franc, M.; Pelantová, H.; Kubáč, D.; Vejvoda, V.; Šulc, M.; Bhalla, T.C.; Macková, M.; Lovecká, P.; Janů, P.; Demnerová, K.; Martínková, L. Hydrolysis of Benzonitrile Herbicides by Soil Actinobacteria and Metabolite Toxicity. *Biodegradation* **2010**, *21* (5), 761–770.
224. Sharma, N.N.; Sharma, M.; Bhalla, T.C. An Improved Nitrilase-Mediated Bioprocess for Synthesis of Nicotinic Acid from 3-Cyanopyridine with Hyperinduced *Nocardia Globerula* NHB-2. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38* (9), 1235–1243.
225. Lievano, R.; Pérez, H.I.; Manjarrez, N.; Solís, A.; Solís-Oba, M. Hydrolysis of Ibuprofen Nitrile and Ibuprofen Amide and Deracemisation of Ibuprofen Using *Nocardia Corallina* B-276. *Molecules* **2012**, *17* (3), 3148–3154.
226. Hahn, V.; Sünwoldt, K.; Mikolasch, A.; Schauer, F. Two Different Primary Oxidation Mechanisms during Biotransformation of Thymol by Gram-Positive Bacteria of the Genera *Nocardia* and *Mycobacterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (3), 1289–1297.
227. Hahn, V.; Sünwoldt, K.; Mikolasch, A.; Schauer, F. Biotransformation of 4-Sec-Butylphenol by Gram-Positive Bacteria of the Genera *Mycobacterium* and *Nocardia* Including Modifications on the Alkyl Chain and the Hydroxyl Group. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (18), 8329–8339.
228. Choi, K.-Y.; Kim, T.; Koh, S.-K.; Roh, C.-H.; Pandey, B.P.; Lee, N.; Kim, B.-G. A-Ring Ortho-Specific Monohydroxylation of Daidzein by Cytochrome P450s of *Nocardia Farcinica* IFM10152. *Biotechnol. J.* **2009**, *4* (11), 1586–1595.
229. Crawford, R.L.; McCoy, E.; Harkin, J.M.; Kirk, T.K.; Obst, J.R. Degradation of Methoxylated Benzoic Acids by a *Nocardia* from a Lignin-Rich Environment: Significance to Lignin Degradation and Effect of Chloro Substituents. *Appl. Microbiol.* **1973**, *26* (2), 176–184.
230. Parrot, D.; Intertaglia, L.; Jehan, P.; Grube, M.; Suzuki, M.T.; Tomasi, S. Chemical Analysis of the Alphaproteobacterium Strain MOLA1416 Associated with the Marine Lichen *Lichina Pygmaea*. *Phytochemistry* **In press**.
231. Parrot, D.; Legrave, N.; Intertaglia, L.; Rouaud, I.; Legembre, P.; Grube, M.; Suzuki, M.T.; Tomasi, S. Cyaneodimycin, a Bioactive Compound Isolated from the Culture of *Streptomyces*

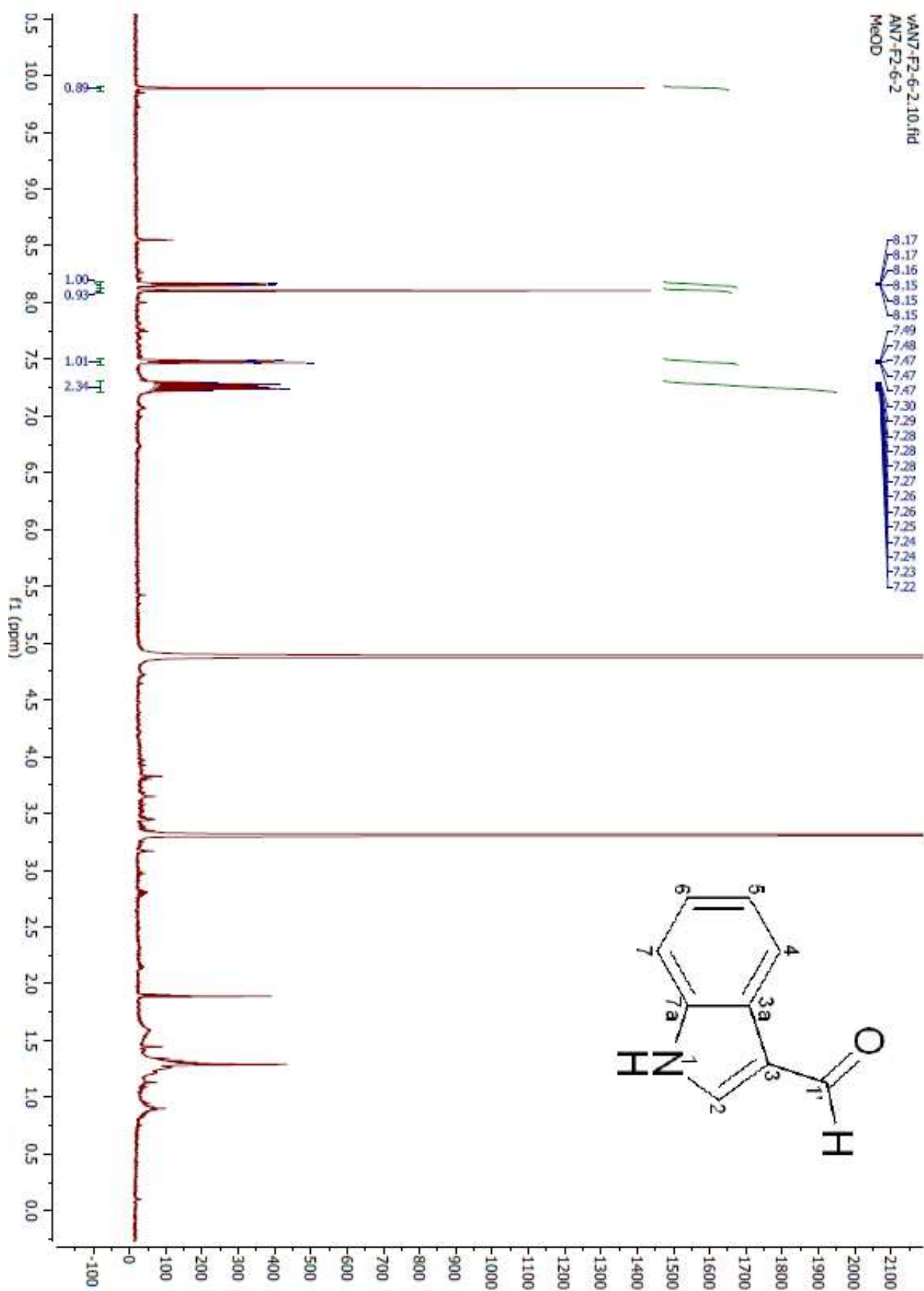
- Cyaneofuscatus* Associated with *Lichina Confinis*: Cyaneodimycin, a Bioactive Compound Isolated from the Culture of *Streptomyces Cyaneofuscatus* Associated with *Lichina Confinis*. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 2016 (23), 3977–3982.
232. Ingólfssdóttir, K. Usnic Acid. *Phytochemistry* **2002**, 61 (7), 729–736.
 233. Araújo, A.A.S.; de Melo, M.G.D.; Rabelo, T.K.; Nunes, P.S.; Santos, S.L.; Serafini, M.R.; Santos, M.R.V.; Quintans-Júnior, L.J.; Gelain, D.P. Review of the Biological Properties and Toxicity of Usnic Acid. *Nat. Prod. Res.* **2015**, 29 (23), 2167–2180.
 234. Lechner, S.; Mayr, R.; Francis, K.; Prüß, B.M.; Kaplan, T.; Wießner-Gunkel, E.; Stewart, G.S.A.B.; Scherer, S. *Bacillus Weiherstephanensis* Sp. Nov. Is a New Psychrotolerant Species of the *Bacillus Cereus* Group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1998**, 48 (4), 1373–1382.
 235. Huneck, S.; Yoshimura, I. *Identification of Lichen Substances*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, 1996.
 236. Olvera-Vargas, H.; Leroy, S.; Rivard, M.; Oturan, N.; Oturan, M.; Buisson, D. Microbial Biotransformation of Furosemide for Environmental Risk Assessment: Identification of Metabolites and Toxicological Evaluation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, 23 (22), 22691–22700.
 237. Boufridi, A.; Petek, S.; Evanno, L.; Beniddir, M.A.; Debitus, C.; Buisson, D.; Poupon, E. Biotransformations versus Chemical Modifications: New Cytotoxic Analogs of Marine Sesquiterpene Ilimaquinone. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57 (44), 4922–4925.
 238. Bruneton, J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*; Lavoisier, 2009.
 239. Melhaoui, A.; Mallea, M.; Jossang, A.; Bodo, B. Antibiotic and Antifungal Pyrrolidine Alkaloids, from *Arisarum Vulgare*. *Nat. Prod. Lett.* **1993**, 2 (3), 237–242.
 240. Melhaoui, A.; Belouali, H. DNA Affinity of Active Alkaloids from *Arisarum Vulgare* Targ. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, 62 (1), 67–71.
 241. Majik, M.S.; Naik, D.; Bhat, C.; Tilve, S.; Tilvi, S.; D'Souza, L. Synthesis of (R)-Norbgugaine and Its Potential as Quorum Sensing Inhibitor against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (8), 2353–2356.
 242. Rakba, N.; Melhaoui, A.; Loyer, P.; Guy Delcros, J.; Morel, I.; Lescoat, G. Bgugaine, a Pyrrolidine Alkaloid from *Arisarum Vulgare*, Is a Strong Hepatotoxin in Rat and Human Liver Cell Cultures. *Toxicol. Lett.* **1999**, 104 (3), 239–248.
 243. Lamkadem, M.; Melhaoui, A.; Mimouni, J.; Fontonge, R. Cytotoxic Effect and Electrophysiologic Activity of (R)-Bgugaine, an Alkylpyrrolidine Alkaloid against MRC-5 Fibroblasts. *Toxicon* **2001**, 39 (4), 485–490.
 244. La cigüe dans la mort de Socrate <http://le-poison-dans-la-litterature-tpe.e-monsite.com/pages/la-cigüe-dans-la-mort-de-socrate.html> (accessed Aug 8, 2017).
 245. Reynolds, T. Hemlock Alkaloids from Socrates to Poison Aloes. *Phytochemistry* **2005**, 66 (12), 1399–1406.
 246. Govindachari, T.R.; Pai, B.R.; Nagarajan, K. Chemical Examination of *Tylophora Asthmatica*. Part I. *J. Chem. Soc. Resumed* **1954**, 0 (0), 2801–2803.
 247. Schmelzer, G.H.; Gurib-Fakim, A. *Medicinal Plants 2*; PROTA: Wageningen, Netherlands, 2008.
 248. Wang, K.; Su, B.; Wang, Z.; Wu, M.; Li, Z.; Hu, Y.; Fan, Z.; Mi, N.; Wang, Q. Synthesis and Antiviral Activities of Phenanthroindolizidine Alkaloids and Their Derivatives[†]. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58 (5), 2703–2709.
 249. Wen, T.; Wang, Z.; Meng, X.; Wu, M.; Li, Y.; Wu, X.; Zhao, L.; Wang, P.; Yin, Z.; Li-Ling, J.; Wang, Q. Synthesis of Novel Tylophorine Derivatives and Evaluation of Their Anti-Inflammatory Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, 5 (9), 1027–1031.
 250. Lee, Y.-Z.; Huang, C.-W.; Yang, C.-W.; Hsu, H.-Y.; Kang, I.-J.; Chao, Y.-S.; Chen, I.-S.; Chang, H.-Y.; Lee, S.-J. Isolation and Biological Activities of Phenanthroindolizidine and Septicine Alkaloids from the Formosan *Tylophora Ovata*. *Planta Med.* **2011**, 77 (17), 1932–1938.
 251. Yang, C.-W.; Lee, Y.-Z.; Hsu, H.-Y.; Wu, C.-M.; Chang, H.-Y.; Chao, Y.-S.; Lee, S.-J. C-Jun-Mediated Anticancer Mechanisms of Tylophorine. *Carcinogenesis* **2013**, 34 (6), 1304–1314.
 252. Louafi, F.; Hurvois, J.-P.; Chibani, A.; Roisnel, T. Synthesis of Tetrahydroisoquinoline Alkaloids via Anodic Cyanation as the Key Step. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (16), 5721–5724.

253. Benmekhbi, L.; Louafi, F.; Roisnel, T.; Hurvois, J.-P. Synthesis of Tetrahydroisoquinoline Alkaloids and Related Compounds through the Alkylation of Anodically Prepared α -Amino Nitriles. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (15), 6721–6739.
254. Jossang, A.; Melhaoui, A.; Bodo, B. Enantioselective Total Synthesis of Irniine and Bgugaine, Bioactive 2-Alkylpyrrolidine Alkaloids. *Heterocycles* **1996**, *43* (4), 755–766.
255. Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. A Simplified Procedure for the Stereospecific Transformation of 1,2-Diols into Epoxides. *Tetrahedron* **1992**, *48* (48), 10515–10530.
256. Takahata, H.; Ihara, K.; Kubota, M.; Momose, T. New Asymmetric Synthesis of Enantiomeric Pairs of the 2-Substituted Pyrrolidines Bgugaine and Irniine. *Heterocycles* **1997**, *46*, 349–356.
257. Enders, D.; Thiebes, C. Efficient Stereoselective Syntheses of Piperidine, Pyrrolidine, and Indolizidine Alkaloids. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73* (3), 573–578.
258. Miyata, O.; Takahashi, S.; Tamura, A.; Ueda, M.; Naito, T. Novel Synthesis of Substituted Pyrrolidines and Piperidines via Radical Addition–ionic Cyclization Reaction of Oxime Ethers. *Tetrahedron* **2008**, *64* (7), 1270–1284.
259. Majik, M.S.; Parameswaran, P.S.; Tilve, S.G. A Concise Synthesis of (R)-Bgugaine, a Pyrrolidine Alkaloid from *Arisarum Vulgare*. *J. Chem. Res.* **2008**, *2008* (3), 121–122.
260. Xiao, K.-J.; Wang, Y.; Ye, K.-Y.; Huang, P.-Q. Versatile One-Pot Reductive Alkylation of Lactams/Amides via Amide Activation: Application to the Concise Syntheses of Bioactive Alkaloids ($\pm$)-Bgugaine, ($\pm$)-Coniine, (+)-Preussin, and (–)-Cassine. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16* (43), 12792–12796.
261. Shu, C.; Liu, M.-Q.; Wang, S.-S.; Li, L.; Ye, L.-W. Gold-Catalyzed Oxidative Cyclization of Chiral Homopropargyl Amides: Synthesis of Enantioenriched γ -Lactams. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (7), 3292–3299.
262. Girard, N.; Gautier, C.; Malassene, R.; Hurvois, J.-P.; Moinet, C.; Toupet, L. Dearomatization of N-Phenyl-2,6-Dialkylpiperidines: Practical Synthesis of ($\pm$)-Solenopsin A and ($\pm$)-Dihydropinidine. *Synlett* **2004**, No. 11, 2005–2009.
263. Airiau, E.; Girard, N.; Pizzeti, M.; Salvadori, J.; Taddei, M.; Mann, A. Hydroformylation of Alkenylamines. Concise Approaches toward Piperidines, Quinolizidines, and Related Alkaloids. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (24), 8670–8673.
264. Reddy, B.V.S.; Chaya, D.N.; Yadav, J.S.; Grée, R. A Concise and Diastereoselective Synthesis of Piperidine and Indolizidine Alkaloids via Aza-Prins Cyclization. *Synthesis* **2012**, *44* (02), 297–303.
265. Dion, I.; Vincent-Rocan, J.-F.; Zhang, L.; Cebrowski, P.H.; Lebrun, M.-E.; Pfeiffer, J.Y.; Bédard, A.-C.; Beauchemin, A.M. Studies on Difficult Intramolecular Hydroaminations in the Context of Four Syntheses of Alkaloid Natural Products. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (24), 12735–12749.
266. Vu, V.H.; Jouanno, L.-A.; Cheignon, A.; Roisnel, T.; Dorcet, V.; Sinbandhit, S.; Hurvois, J.-P. Modified Fry Cyanation of a Chiral Pyridinium Salt: Asymmetric Syntheses of (–)-Coniine and (–)-Solenopsin A. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (24), 5464–5474.
267. Chacko, S.; Ramapanicker, R. Proline Catalyzed, One-Pot Three Component Mannich Reaction and Sequential Cyclization toward the Synthesis of 2-Substituted Piperidine and Pyrrolidine Alkaloids. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (15), 2023–2026.
268. Govindachari, T.R.; Lakshmikantham, M.V.; Rajadurai, S. Chemical Examination of *Tylophora asthmatica*—IV. *Tetrahedron* **1961**, *14* (3), 284–287.
269. Lahm, G.; Stoye, A.; Opatz, T. A Five-Step Synthesis of ($\pm$)-Tylophorine via a Nitrile-Stabilized Ammonium Ylide. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (15), 6620–6623.
270. Xu, X.; Liu, Y.; Park, C.-M. Rhodium(III)-Catalyzed Intramolecular Annulation through C–H Activation: Total Synthesis of ($\pm$)-Antofine, ($\pm$)-Septicine, ($\pm$)-Tylophorine, and Rosettacin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (37), 9372–9376.
271. Yao, T.; Zhang, H.; Zhao, Y. Synthesis of 9,10-Phenanthrenes via Palladium-Catalyzed Aryne Annulation by O-Halostyrenes and Formal Synthesis of ($\pm$)-Tylophorine. *Org. Lett.* **2016**, *18* (11), 2532–2535.

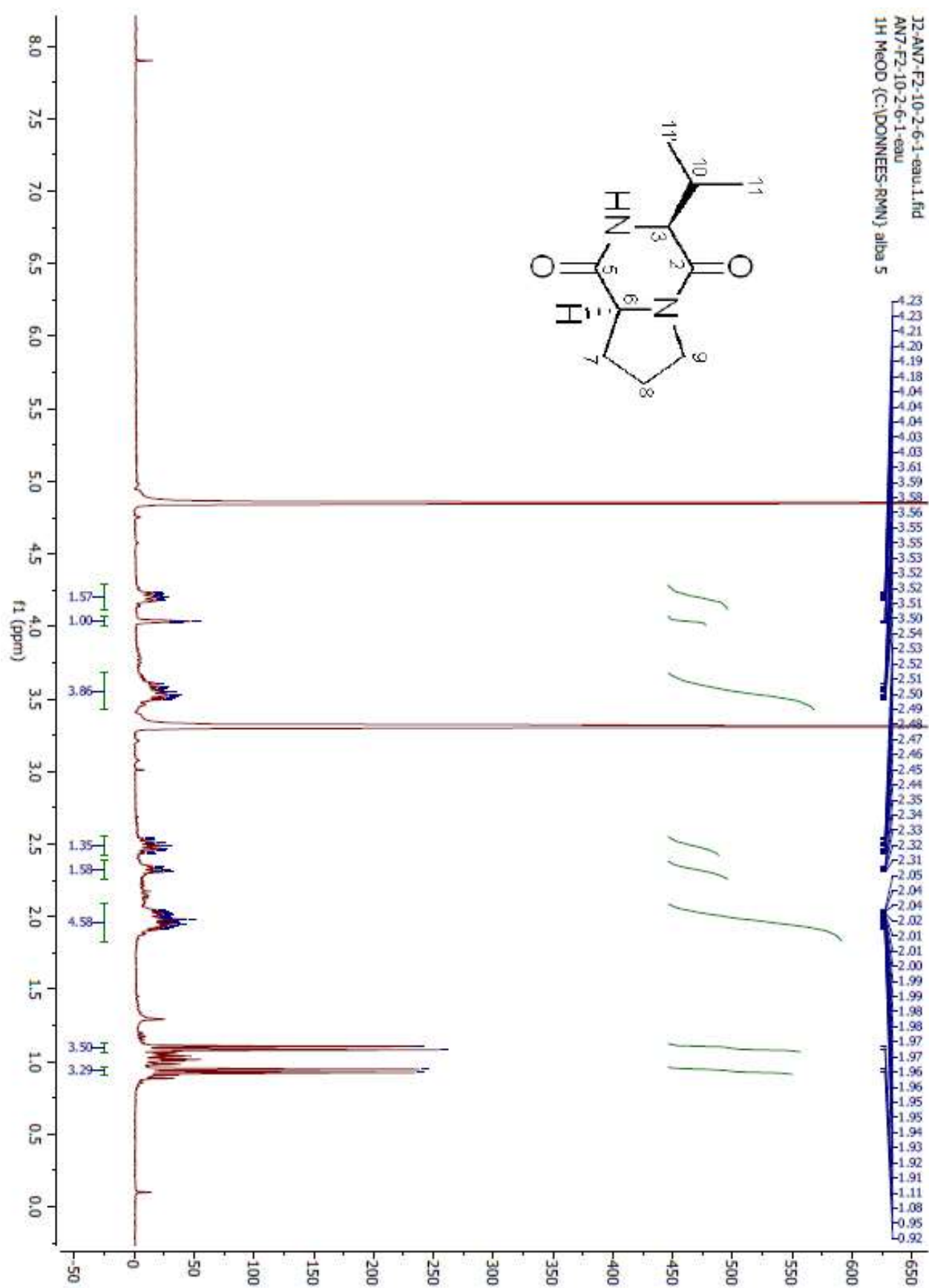
272. Liu, G.-Q.; Reimann, M.; Opatz, T. Total Synthesis of Phenanthroindolizidine Alkaloids by Combining Iodoaminocyclization with Free Radical Cyclization. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (14), 6142–6148.
273. Stork, G.; Ozorio, A.A.; Leong, A.Y.W. N,N-Diethylaminoacetonitrile a Generally Useful Latent Acyl Carbanion. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (52), 5175–5178.
274. Leclerc, E.; Vrancken, E.; Mangeney, P. Diastereoselective Aldolization of α -Aminonitriles. Diastereoselective Synthesis of β -Amino Alcohols and β,γ -Diamino Alcohols. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (25), 8928–8937.
275. Guillaume, D.; Brum-Bousquet, M.; Aitken, D.J.; Husson, H.-P. Cyclopropanation of Dibenzylaminoacetonitrile: Evaluation of 1,2-Dibromides and Cyclic 1,2-Sulfates as Dielectrophiles. *Bull. Société Chim. Fr.* **1994**, *131*, 391–396.
276. Bahde, R.J.; Rychnovsky, S.D. Cyclization via Carbolithiation of α -Amino Alkylolithium Reagents. *Org. Lett.* **2008**, *10* (18), 4017–4020.
277. Appel, R. Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P=N Linkage. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14* (12), 801–811.
278. Garegg, P.J. Some Aspects of Regio-, Stereo-, and Chemoselective Reactions in Carbohydrate Chemistry. *Pure Appl. Chem.* **1984**, *56* (7), 845–858.
279. Garegg, P.J.; Regberg, T.; Stawiński, J.; Strömberg, R. A Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Study of the Conversion of Hydroxy Groups into Iodo Groups in Carbohydrates Using the Iodine–triphenylphosphine–imidazole Reagent. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1987**, *0* (3), 271–274.
280. Trost, B.M.; Waser, J.; Meyer, A. Total Synthesis of (–)-Pseudolaric Acid B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (47), 14556–14557.
281. Nickel, A.; Maruyama, T.; Tang, H.; Murphy, P.D.; Greene, B.; Yusuff, N.; Wood, J.L. Total Synthesis of Ingenol. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (50), 16300–16301.
282. Mandenius, C.-F.; Brundin, A. Bioprocess Optimization Using Design-of-Experiments Methodology. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *24* (6), 1191–1203.

ANNEXES

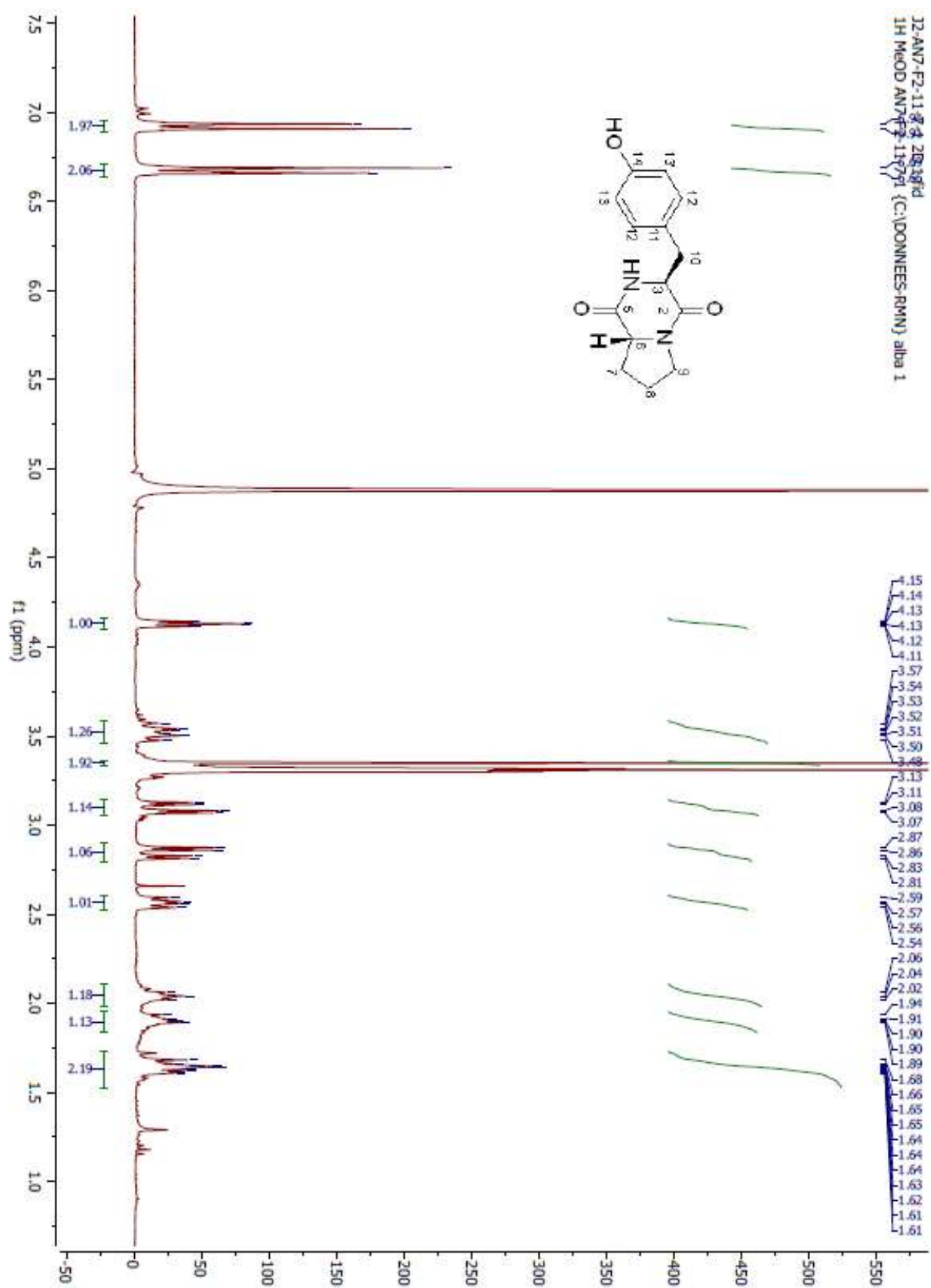
ANNEXE 1 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **1** (Indole-3-carboxaldéhyde) dans le CD_3OD



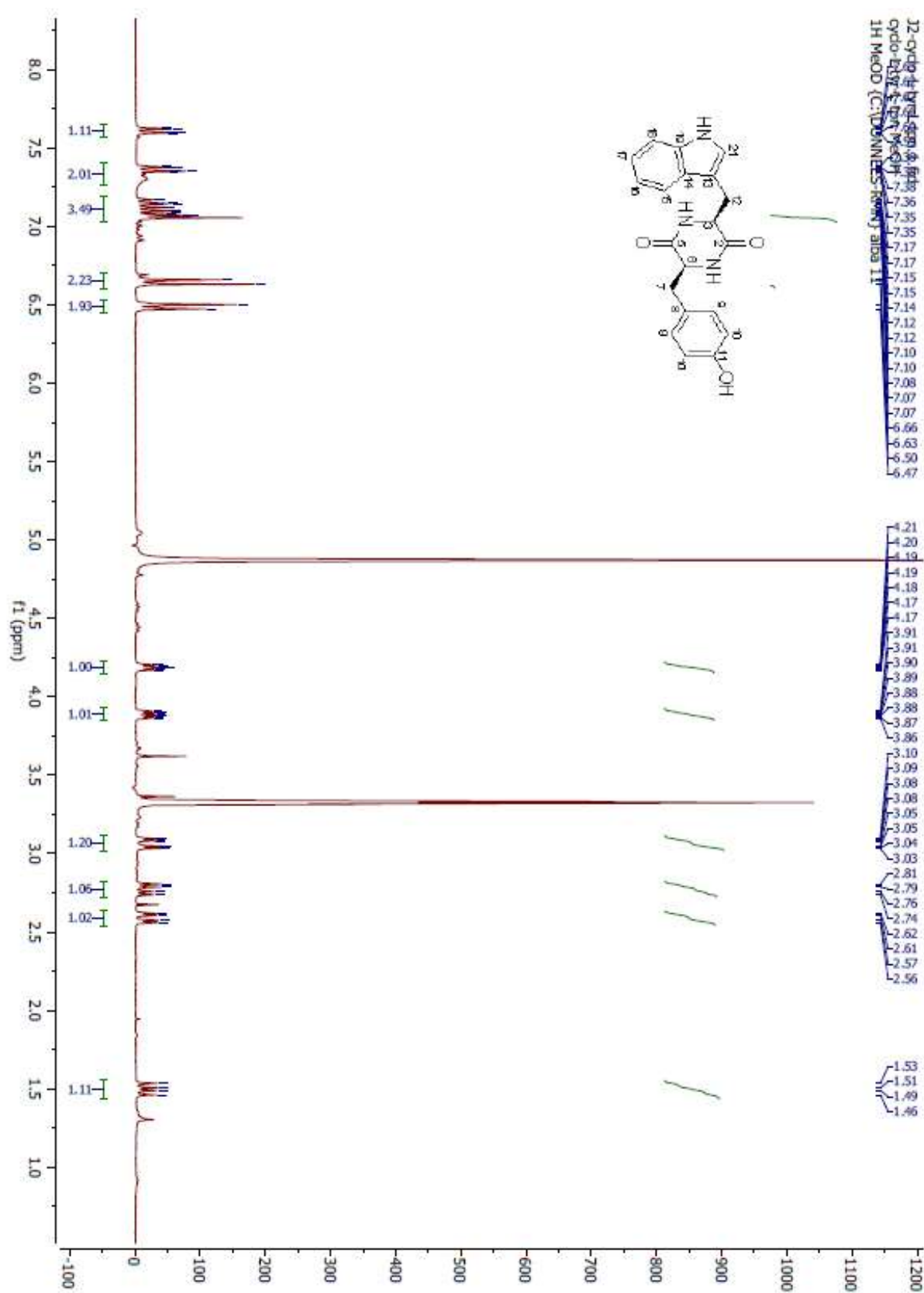
ANNEXE 2 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **4** (cyclo (L-Val-L-Pro)) dans le CD_3OD



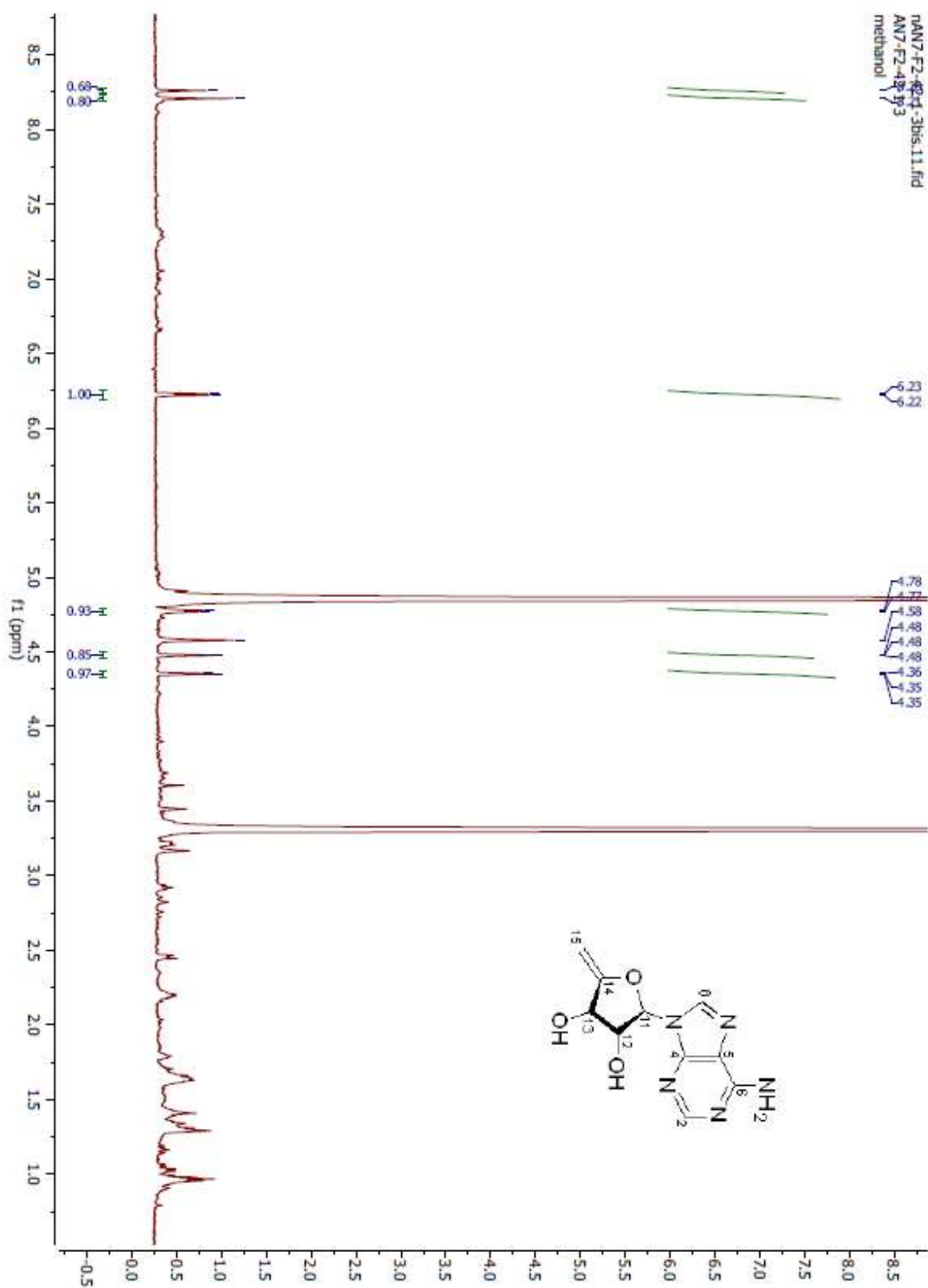
ANNEXE 3 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **7** (cyclo (L-Tyr-D-Pro)) dans le CD_3OD



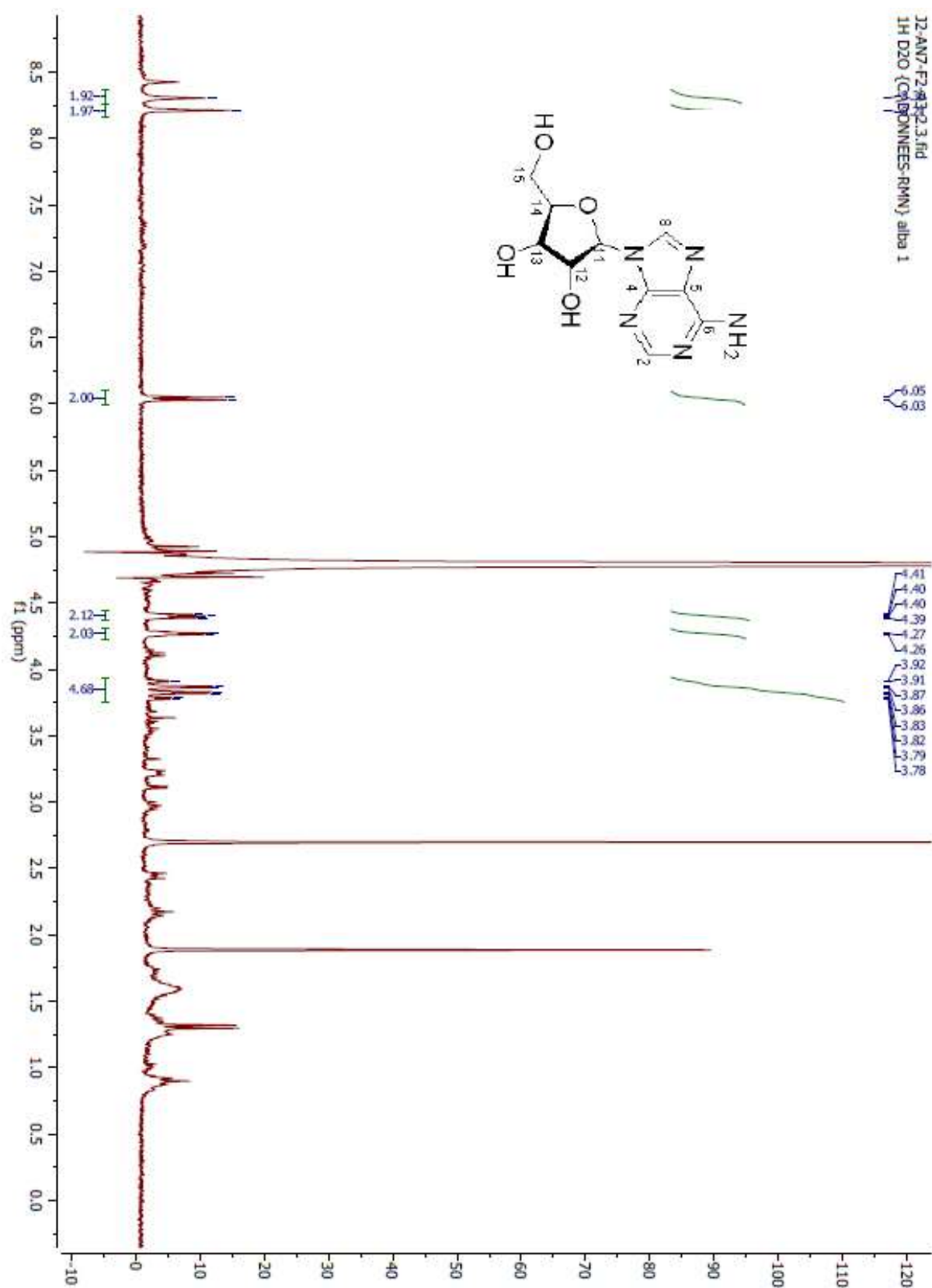
ANNEXE 4 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **9** (cyclo (L-Tyr-L-Tpn)) dans le CD_3OD



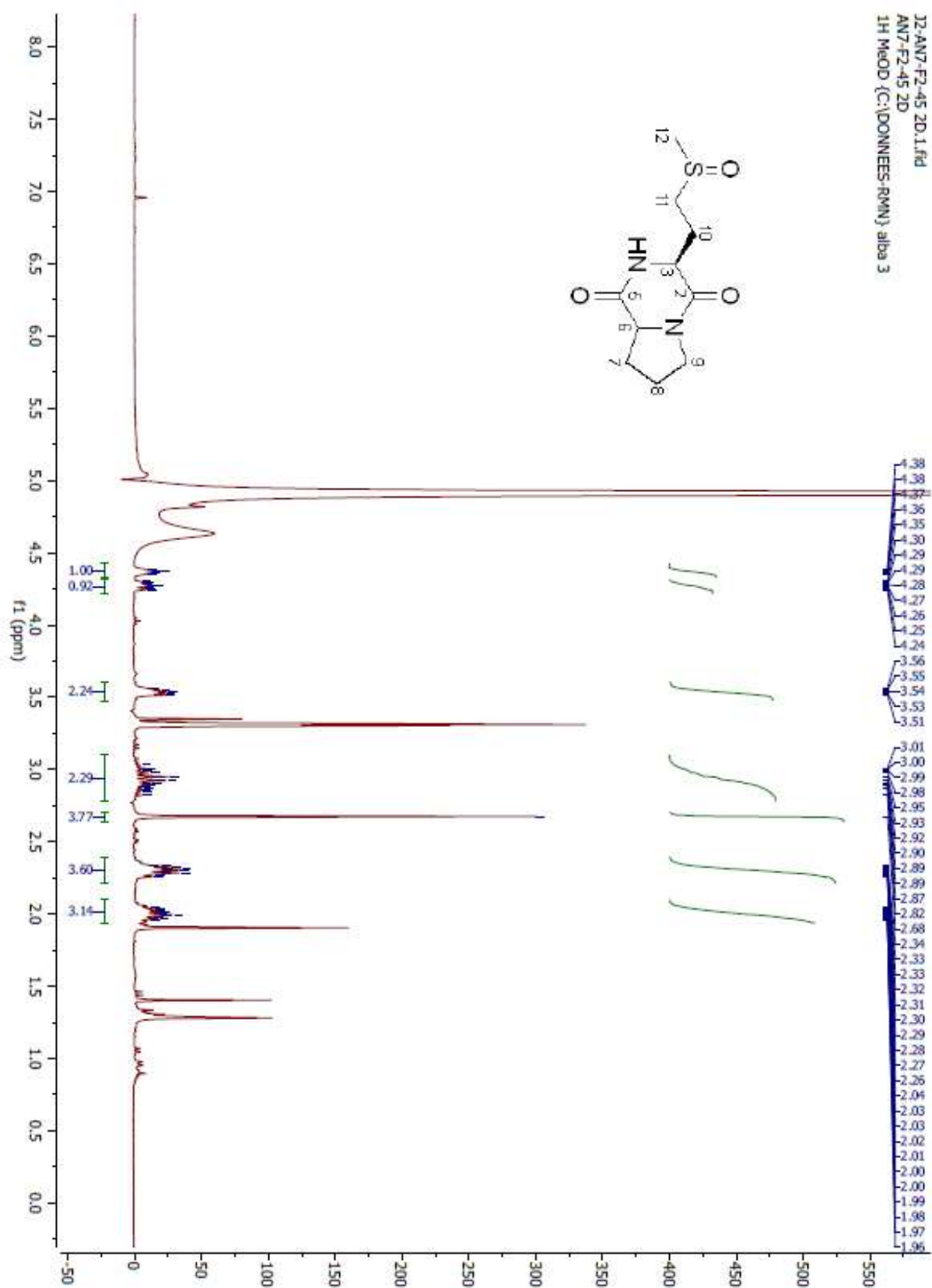
ANNEXE 5 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **10** (1-(5-Deoxy- β -D-erythro-pent-4-enofuranosyl)) dans le CD_3OD



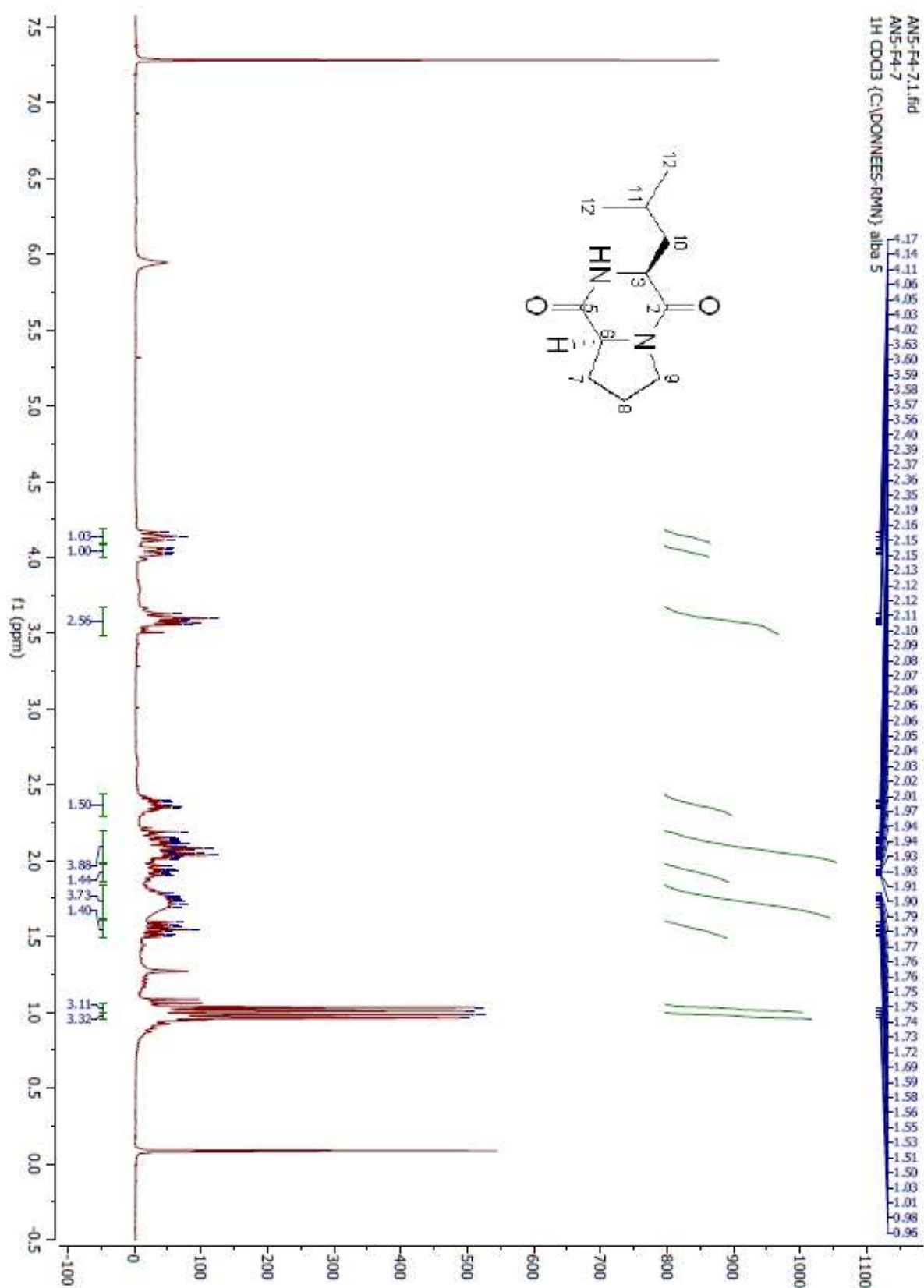
ANNEXE 6 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **11** (Adénosine) dans le D_2O



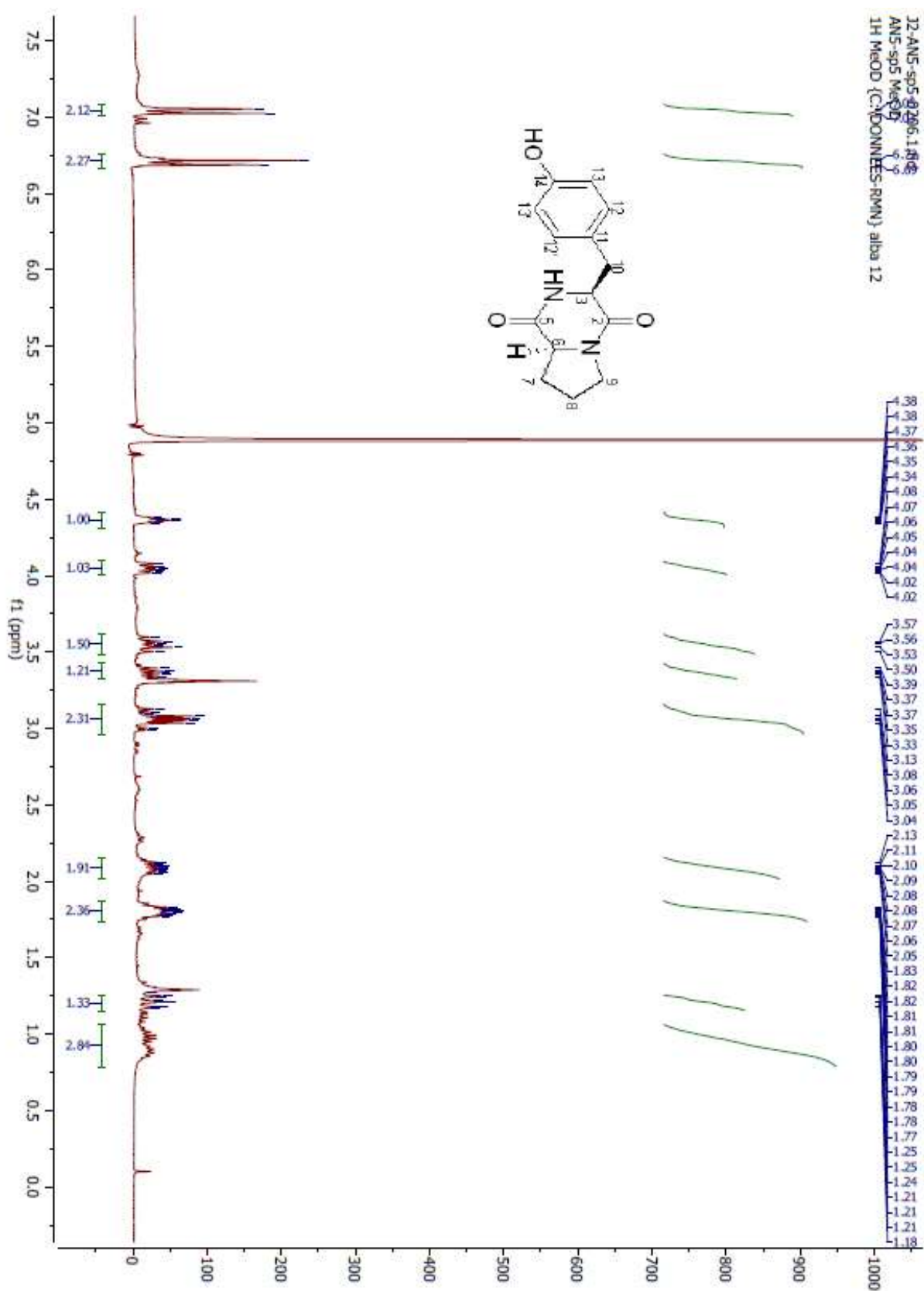
ANNEXE 7 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **12** (Cyclo (L-OMet-L-Pro)) dans le CD_3OD



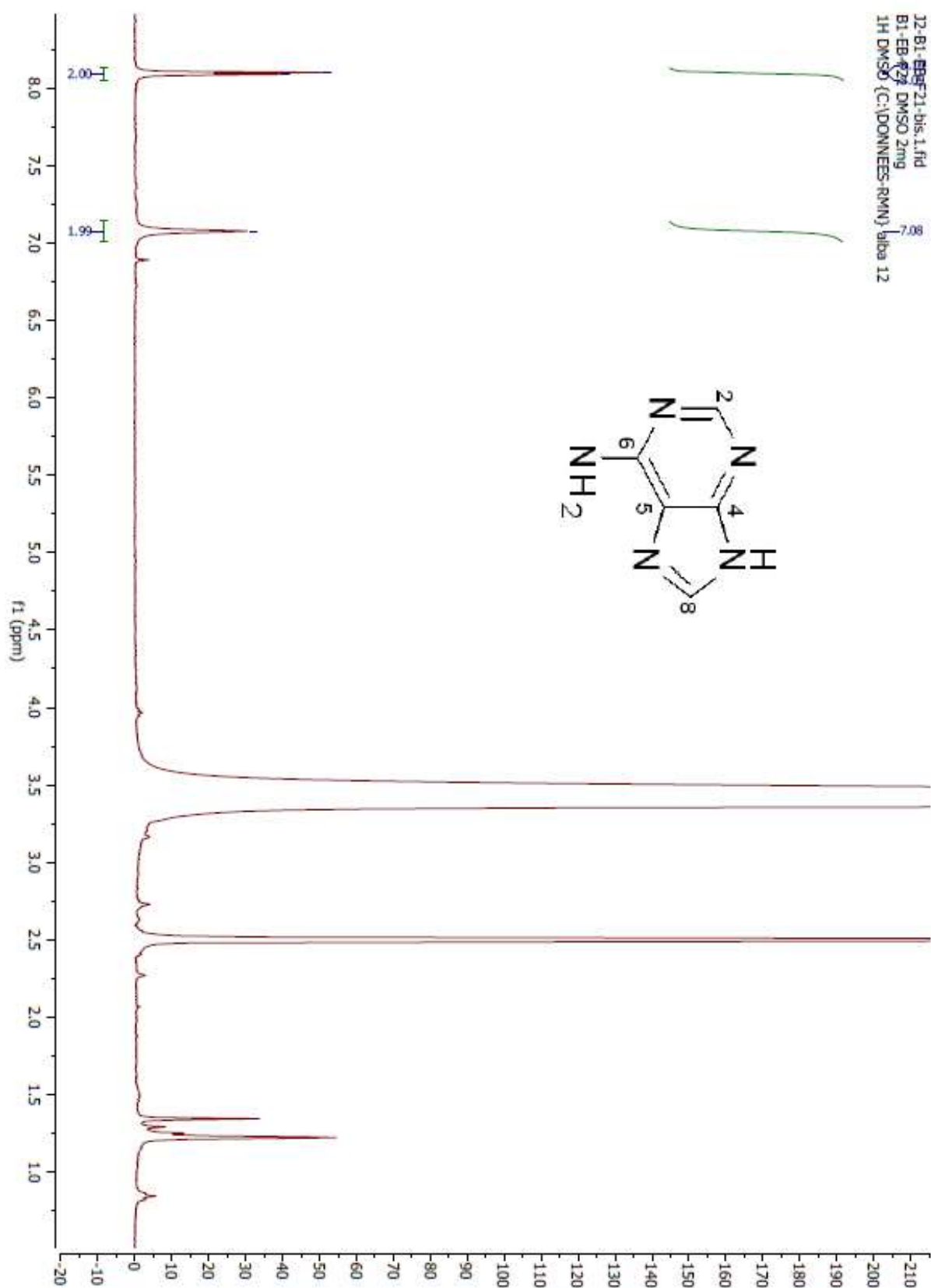
ANNEXE 8 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **20** (Cyclo (L-Leu-L-Pro)) dans le CDCl_3



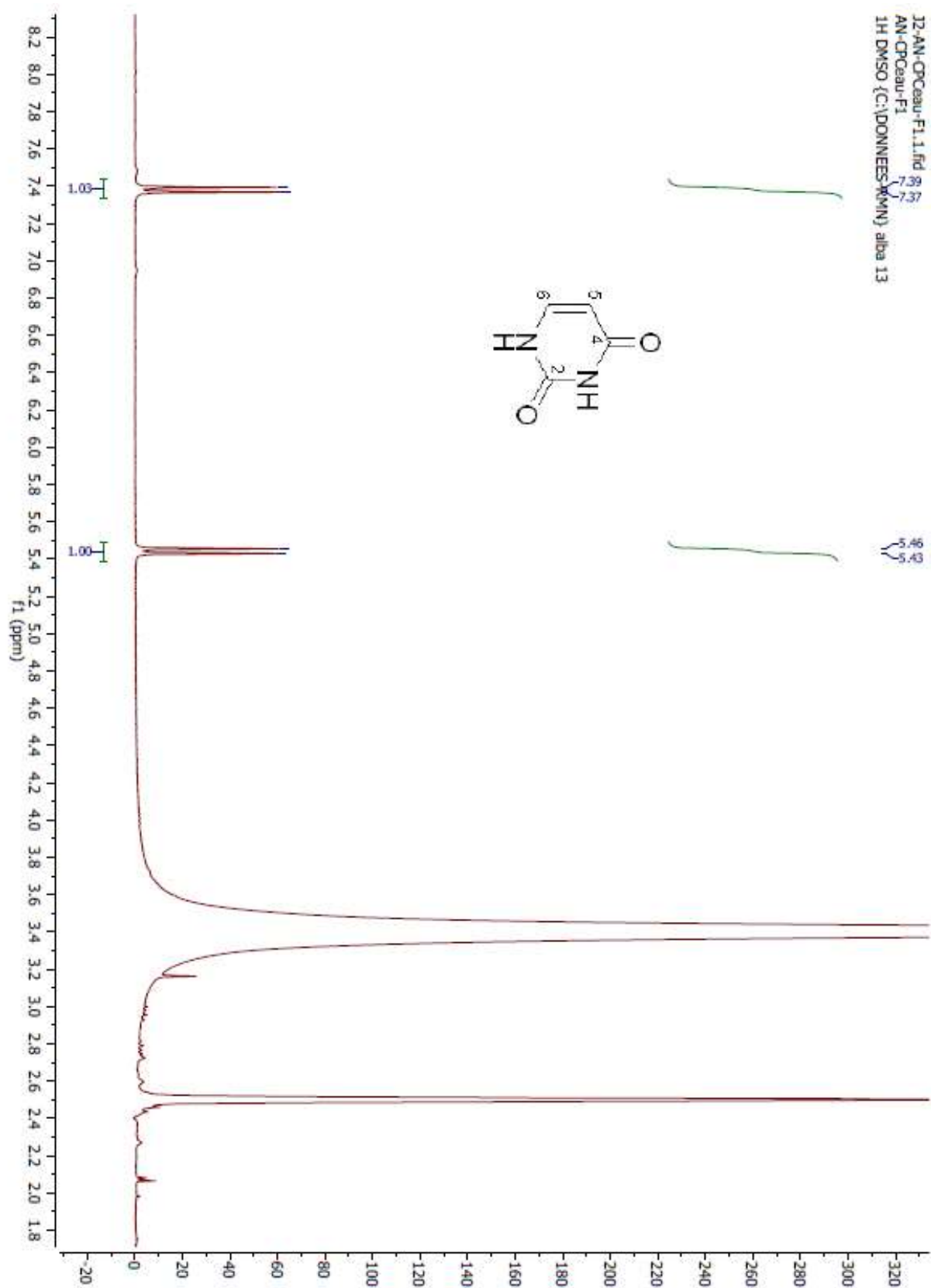
ANNEXE 9 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **21** (Cyclo (L-Tyr-L-Pro)) dans le CD_3OD



ANNEXE 10: Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **22** (Adénine) dans le CD_3OD



ANNEXE 11 : Spectre RMN ^1H (500 MHz) du composé **23** (Uracile) dans le DMSO- d_6



ANNEXE 12 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion de l'acide usnique à 0,01 mg/mL et 0,1 mg/mL par la souche **MOLA1416**

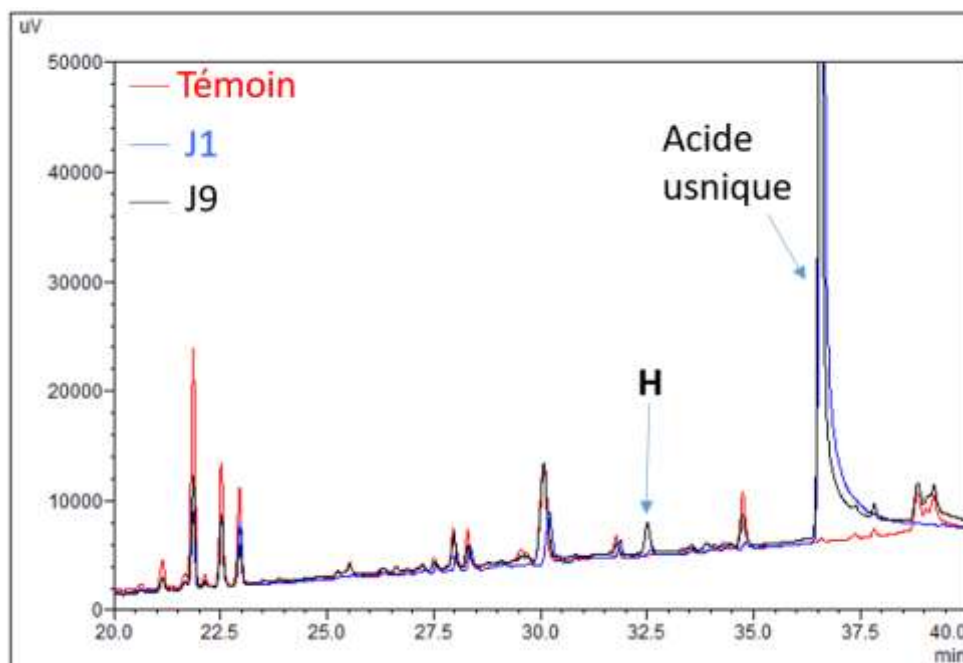


Figure A- 1 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à **0,01** mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **MOLA1416** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

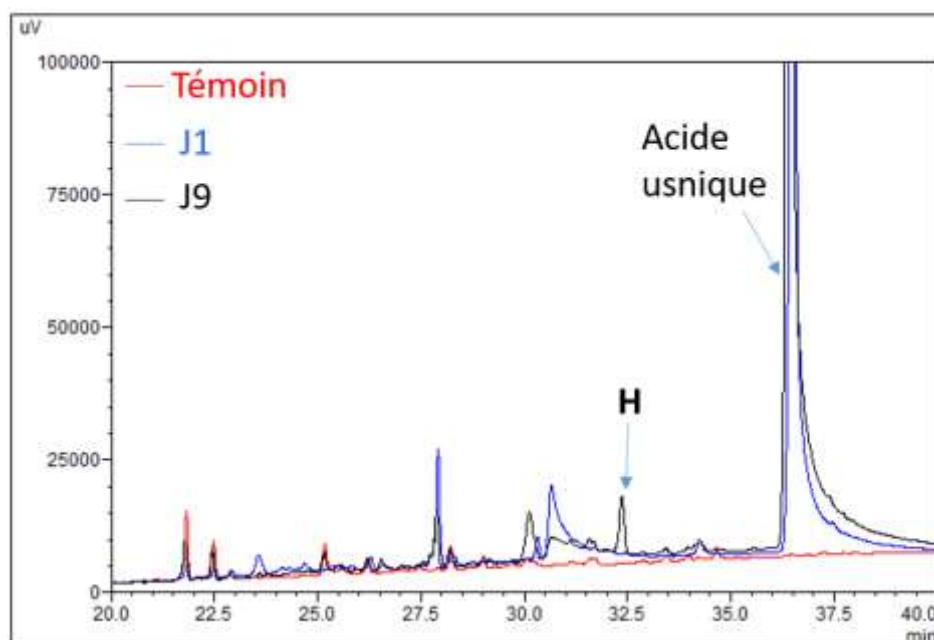


Figure A- 2 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à **0,1** mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **MOLA1416** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

ANNEXE 13 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion de l'acide usnique à 0,01 mg/mL et 0,1 mg/mL par la souche **DP94**

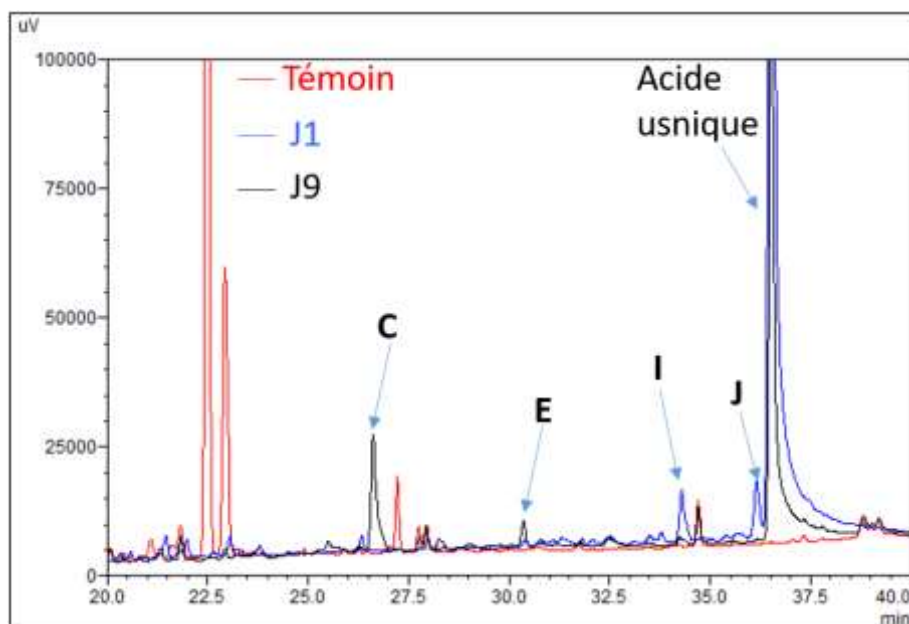


Figure A- 3 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à **0,01** mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **DP94** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

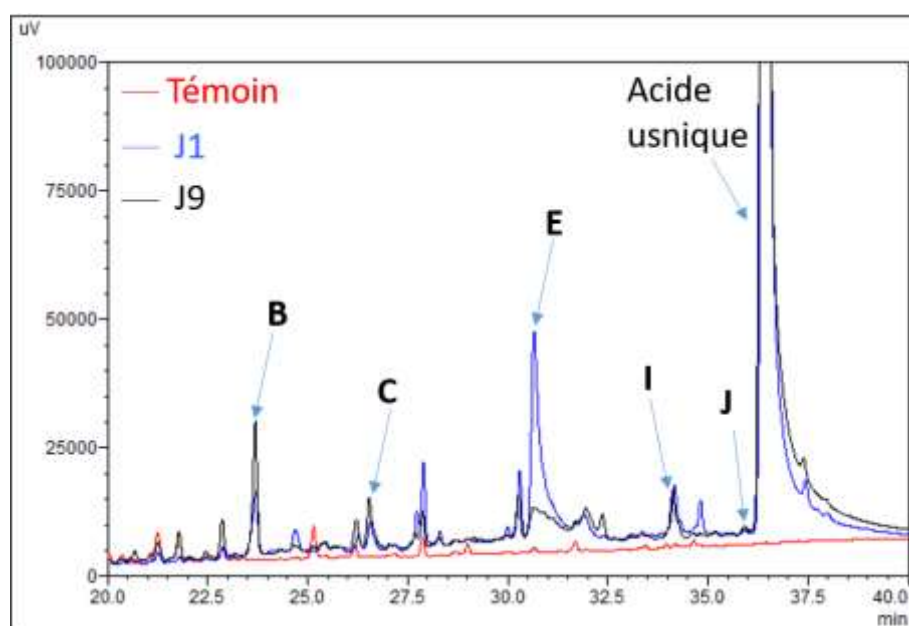


Figure A- 4 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à **0,1** mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **DP94** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

ANNEXE 14 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion de l'acide usnique à 0,1 mg/mL et 0,5 mg/mL par la souche *B. weihenstephanensis*

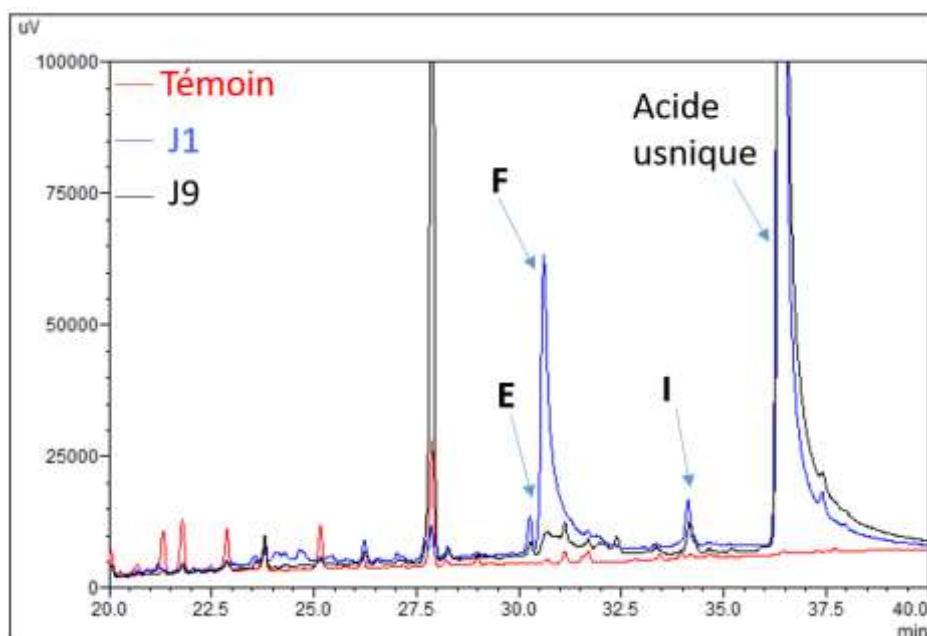


Figure A- 5 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à **0,1** mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche *B. weihenstephanensis* et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

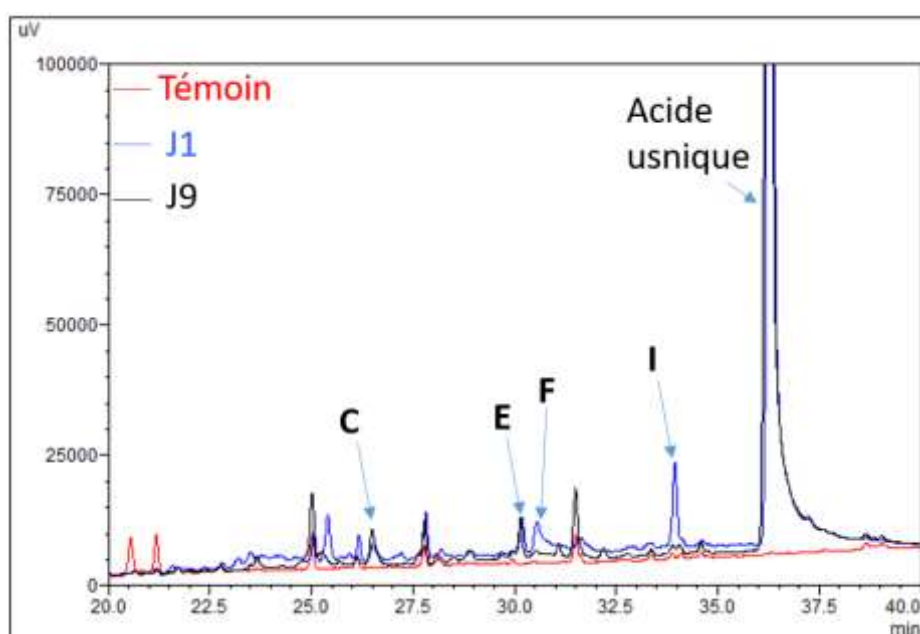


Figure A- 6 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation de l'acide usnique à **0,5** mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche *B. weihenstephanensis* et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

ANNEXE 15: Chromatogrammes des échantillons de bioconversion du MOC à 0,1 mg/mL et 0,5 mg/mL par la souche **MOLA1416**

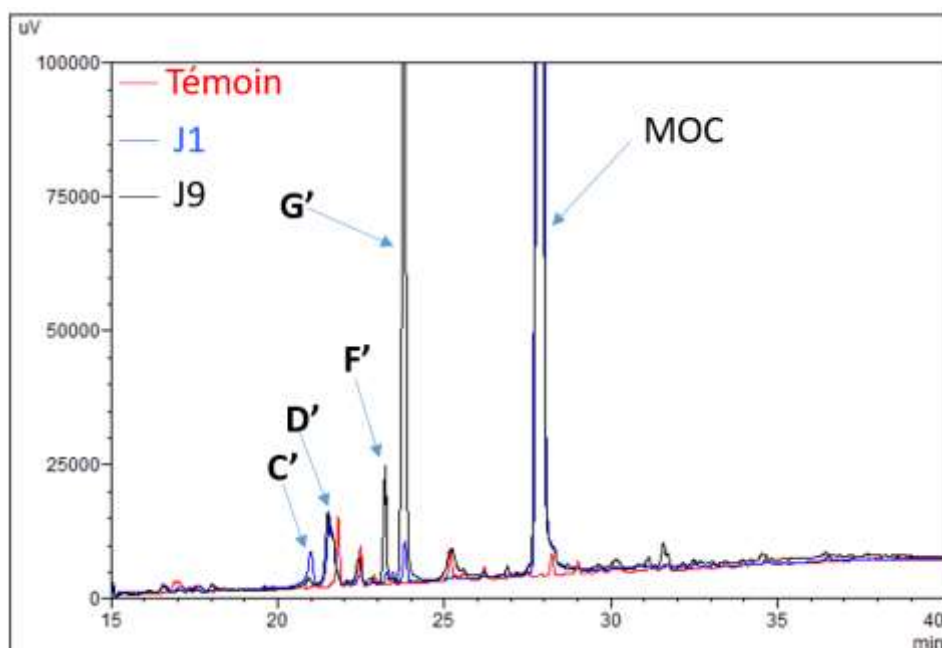


Figure A- 7 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à **0,1** mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **MOLA1416** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

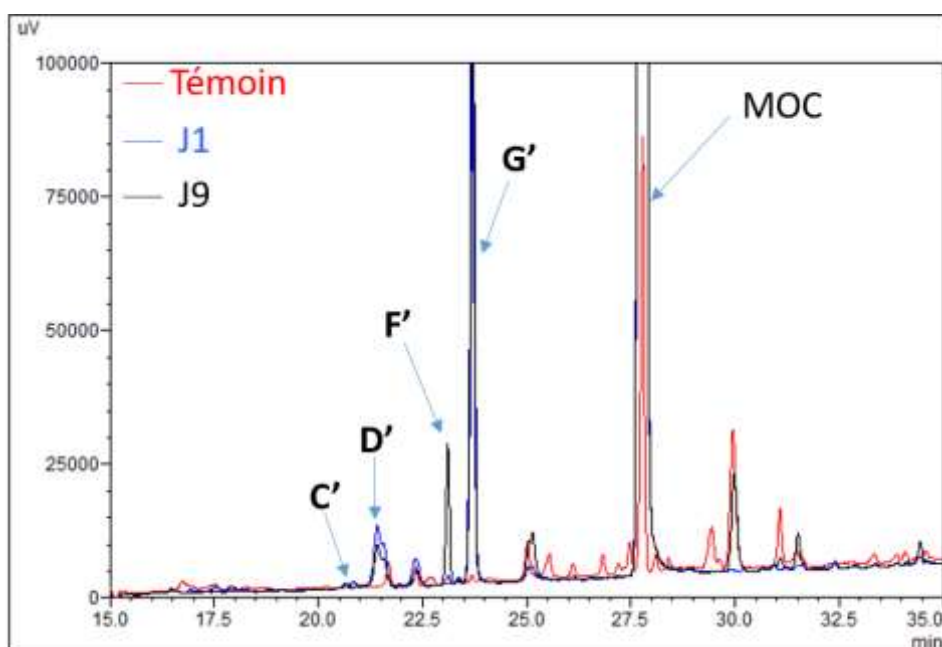


Figure A- 8 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à **0,5** mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **MOLA1416** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

ANNEXE 16: Chromatogrammes des échantillons de bioconversion du MOC à 0,01 mg/mL et 0,5 mg/mL par la souche **DP94**

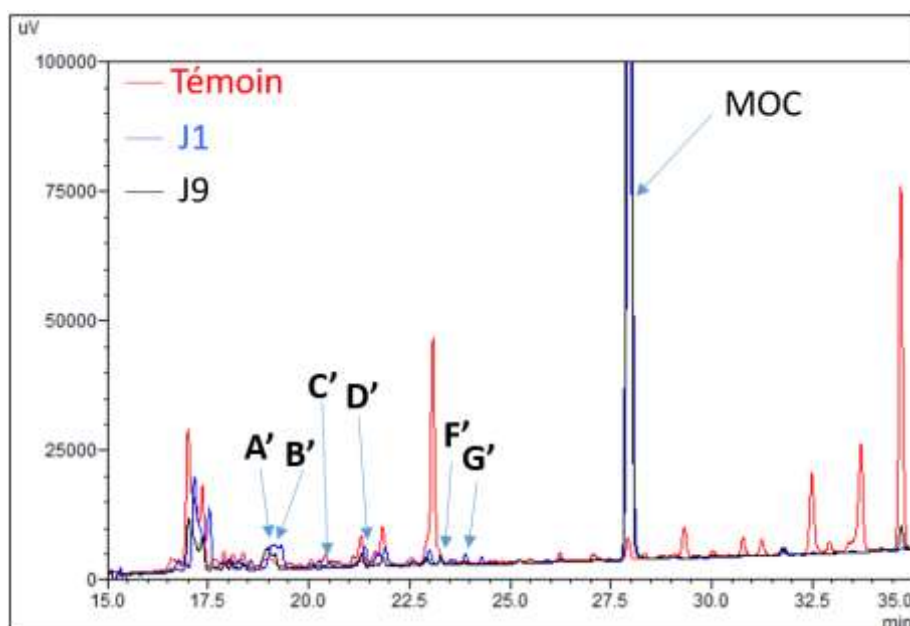


Figure A- 9 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,01 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **DP94** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

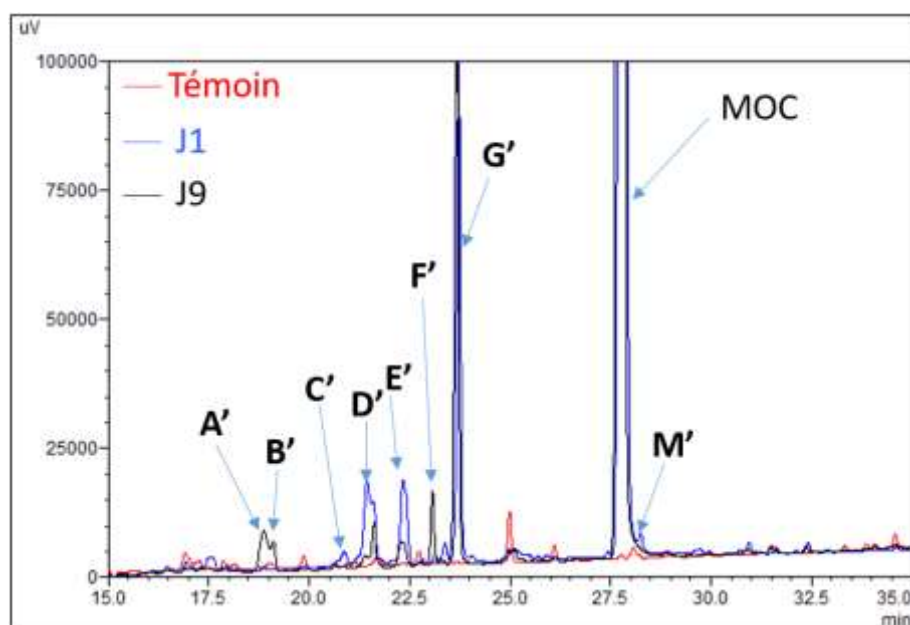


Figure A- 10 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,5 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche **DP94** et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

ANNEXE 17 : Chromatogrammes des échantillons de bioconversion du MOC à 0,01 mg/mL et 0,1 mg/mL par la souche *B. weihenstephanensis*

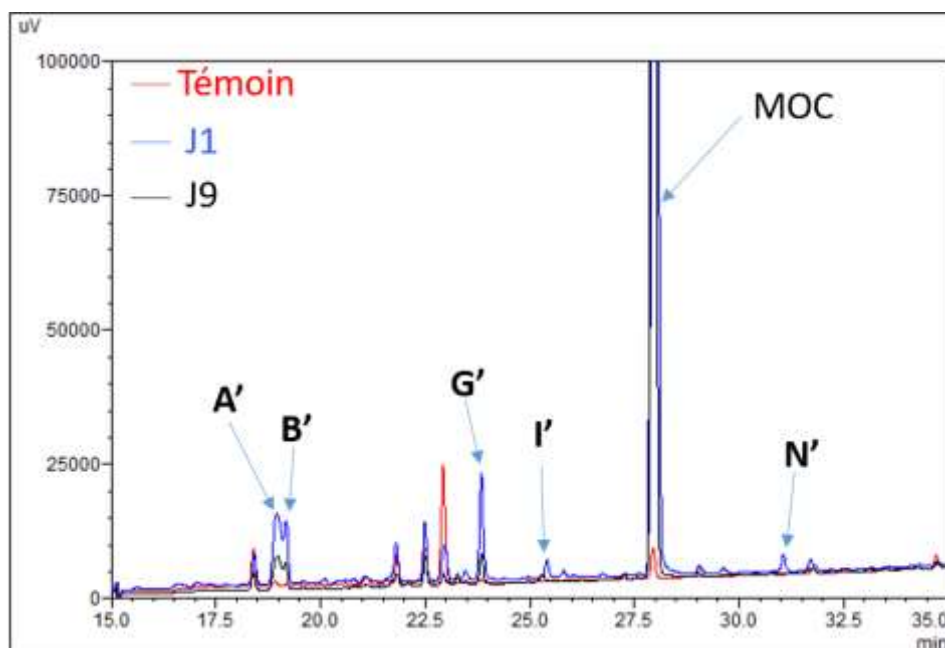


Figure A- 11 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,01 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche *B. weihenstephanensis* et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

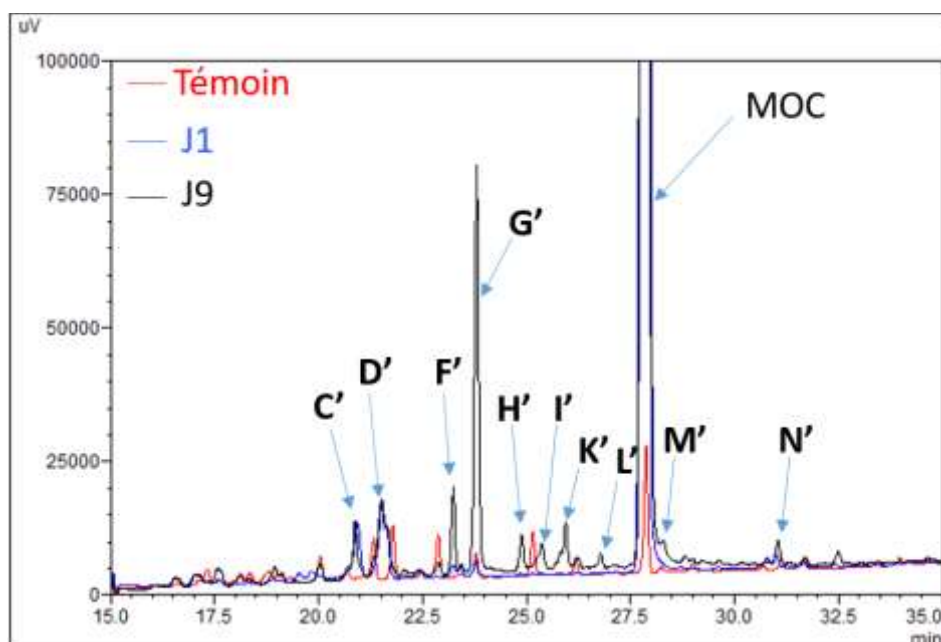


Figure A- 12 : Chromatogramme obtenu en HPLC de la biotransformation du MOC à 0,1 mg/mL à J1 (bleu), J9 (noir) d'incubation dans le tampon phosphate par la souche *B. weihenstephanensis* et comparé au J9 Blanc (rouge). HPLC/UV-DAD sur colonne Prevail® C₁₈ 5 µm, gradient d'élution H₂O/ACN : 100% H₂O de 0 à 5 min, de 0% à 100% d'ACN entre 5 et 35 min, 100% d'ACN de 35 à 45 min, de 100% à 0% d'ACN entre 45 et 50 min, 100% d'H₂O de 50 à 60 min. Détection par UV-DAD (détecteur ultra-violet à barrette de diode) ici montrée à 272 nm

Obtention de composés azotés bioactifs d'origine naturelle. Etude de biotransformation par des bactéries associées aux lichens.

Résumé : Il est plus que nécessaire aujourd'hui d'apporter de nouvelles avancées dans le domaine des traitements anti-cancéreux. Il est également bien établi que dans la famille des produits bioactifs d'origine naturelle, les composés azotés sont largement représentés et ce dans la plupart des classes thérapeutiques. Aussi, ces travaux se sont concentrés sur l'obtention de composés azotés bioactifs d'origine naturelle en ciblant des produits cytotoxiques. Ce travail est divisé en trois parties. Tout d'abord, nous avons choisi d'étudier les souches bactériennes associées aux lichens. En effet, le réseau symbiotique complexe que représente le lichen est d'un grand intérêt pour l'identification de nouvelles souches bactériennes avec des potentiels de production de composés d'intérêt et notamment d'un point de vue biotechnologique. Dans un premier temps, un travail d'optimisation des conditions de culture d'une souche d'Actinobactérie, *Nocardia* sp, isolée à partir d'un lichen, *Collema auriforme*, a été réalisé dans le but de favoriser la production de composés cytotoxiques. Dans un second temps, l'étude bactériochimique de cette souche a permis l'isolement de 13 composés azotés, dont deux dicétopipérazines bromées qui sont nouvellement décrites ainsi que des dérivés puriques et pyrimidiques. Enfin, un travail de ciblage des composés actifs, par réseaux moléculaires et analyses multivariées de données de spectrométrie de masse, a mis en évidence des molécules potentiellement responsables de l'activité. La seconde partie de ce travail apporte des éléments de réponse sur la nature de la relation bactérie-lichen en observant les effets de certains composés lichéniques sur la croissance et le métabolisme bactériens ainsi qu'en étudiant le potentiel de biotransformation de trois bactéries associées aux lichens (une Firmicutes, une α -protéobactérie et une Actinobactérie). Les souches sélectionnées ont toutes montré des capacités de biotransformation des composés lichéniques testés (notamment acide usnique et méthyl- β -orcinolcarboxylate). Enfin, la troisième partie de ce travail décrit une nouvelle méthode d'obtention de composés azotés bioactifs d'origine naturelle par la voie synthétique. Ainsi, une nouvelle méthode de synthèse de la bgugaine, la coniine et la tylophorine a été étudiée et a permis d'obtenir la *N*-Boc-2-heptylpyrrolidine, démontrant la possibilité de synthétiser des alcaloïdes de type pyrrolidine et d'envisager la synthèse des cibles sélectionnées.

Mots-clés : Lichen – bactéries associées – biotransformation – analyse multivariée – réseaux moléculaires – composés azotés – phytochimie – α -aminonitrile – cytotoxicité – métabolites spécifiques – communication chimique

Abstract: New advances in anti-cancer therapeutic are today more than necessary. It is also well establish that amongst bioactive natural compounds, nitrogen compounds are widely represented and that, in all therapeutic classes. Thus, these works are focused on obtaining bioactive nitrogen compounds from natural sources targeting cytotoxic products. This work is divided in three parts. First of all, we chose to study bacterial strains associated with lichen. Indeed, lichens are a complex symbiotic network of great interest for the discovery of new bacterial strains. Especially for strains with a great biotechnological potential particularly in the production of compounds of interest. At first, culture conditions of an Actinobacteria, *Nocardia* sp, isolated from a lichen, *Collema auriforme*, were optimised in order to produce cytotoxic compounds. Secondly, the study of the secondary metabolites patterns of this strain allows the isolation of 13 nitrogen compounds, including 2 brominated diketopiperazines which are newly described, along with purine and pyrimidine derivatives. Finally, a targeting work of bioactive compounds was realised by establishing molecular networking and multivariate analysis of mass spectrometry data, highlighting molecules potentially responsible for activity. The second part of this work bring some answers about the nature of the relationship between bacteria and lichen, by observing effect of some lichen compounds on bacterial growth and metabolism as well as studying the biotransformation potential of three lichen-associated bacteria (a Firmicutes, an α -proteobacteria and an Actinobacteria). All selected strains showed ability for the biotransformation of tested lichen compounds (usnic acid and methyl- β -orcinolcarboxylate). Finally, the third part of this work describes a new method for obtaining bioactive nitrogen compounds by a synthetic way. Thus, a novel synthesis method of bgugaine, coniine and tylophorine was studied and led to *N*-Boc-2-heptylpyrrolidine, showing the possibility to synthesize pyrrolidine alkaloids and to consider the synthesis of selected targets.

Key words : Lichen – associated bacteria – biotransformation – multivariate analysis – molecular networks – nitrogen compounds – phytochemistry – α -aminonitrile – cytotoxicity – specific metabolites – chemical communication