



HAL
open science

Prospecting and induction of antimicrobial molecules by co-culture between bacteria (*Streptomyces*) and fungi (*Basidiomycota*) and fungi (*Basidiomycetes*)

Matthieu Nicault

► To cite this version:

Matthieu Nicault. Prospecting and induction of antimicrobial molecules by co-culture between bacteria (*Streptomyces*) and fungi (*Basidiomycota*) and fungi (*Basidiomycetes*). Ecology, environment. Université de Lorraine, 2020. English. NNT : 2020LORR0194 . tel-03176660

HAL Id: tel-03176660

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03176660>

Submitted on 22 Mar 2021

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention « Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes »

Par **Matthieu NICAULT**

Prospection et induction de molécules antimicrobiennes par co-cultures entre bactéries (*Streptomyces*) et champignons (Basidiomycètes)

Soutenue publiquement le 27/11/2020

Membres du jury

Rapporteurs :

Jenny Renaut
Marie-Joëlle Virolle

Responsable de recherche, LIST
Directrice de recherche CNRS, I2BC, Paris-Saclay

Examineurs

David Touboul
Mélanie Morel-Rouhier
Eric Gelhaye
Pierre Leblond

Directeur de recherche CNRS, ICSN, Paris-Saclay
Professeure de l'Université de Lorraine
Directeur de recherche INRAE/*Co-directeur de thèse*
Professeur de l'Université de Lorraine/*Directeur de thèse*

Invité

Cyril Bontemps

Maitre de conférences de l'Université de Lorraine

Dédicaces

A mes parents, pour votre éducation, votre soutien et votre aide pour m'avoir donné l'opportunité d'arriver là où j'en suis maintenant...

A Mijo (Marie-Joseph) et Sylvette, mes pensées vont vers vous...

A Marc et Alain, je suis fier de porter vos prénoms...

A ma sœur Camille, mon Bro' Maxence et Manon, pour votre soutien indéfectible...

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier mes deux rapporteurs **Marie-Joëlle Virolle** et **Jenny Renaut** et mes examinateurs **David Touboul** et **Mélanie Morel-Rouhier** pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé au sein de deux laboratoires : UMR Dynamic et UMR IAM. Au cours de ces trois années chacun des laboratoires a connu un changement de direction. Je souhaite donc remercier les 4 directeurs d'unité que j'ai connu : Les Professeurs **Pierre Leblond** et **Bertrand Aigle** pour Dynamic et les professeurs **Éric Gelhaye** et **Stéphane Duplessis** pour IAM pour leur accueil.

Je souhaite remercier également mes encadrants de thèse de thèse pour leur encadrement ainsi que de m'avoir transmis des nouvelles connaissances. Je vais néanmoins leur adresser un commentaire personnel à chacun. **Pierre**, je souhaite te remercier d'avoir su faire ressortir le meilleur de moi-même (~~parfois difficilement, je ne suis pas facile à gérer~~) et pour ton aide dès que j'en avais besoin. **Éric**, je souhaite te remercier pour nos (~~nombreuses~~) discussions de couloir quand je venais au 6^{ème}. **Cyril**, je te remercie pour tes différentes remarques (~~ou ton côté tatillons~~) pour m'améliorer (~~ainsi que pour les moments extra-boulot~~). Simplement un grand **Merci** à vous trois.

Une thèse est avant tout une aventure expérimentale et avant d'arriver j'étais un chimiste de formation. Alors je voudrais remercier **Laurence Hôtel** pour m'avoir transmis ces connaissances sur *Streptomyces* et notamment de m'avoir appris à utiliser une « oeuse », faire des sporées... (Je pense que je continuerai à trouver la gélose même si ça tu ne me l'as pas appris). Je voudrais aussi remercier **Anaïs Gilet** pour m'avoir appris à repiquer les champignons et d'avoir été présente lors d'un souci de contamination de mon stock de champignons. Je remercie aussi **Tiphaine** et **Jean-Michel** pour m'avoir formé à l'HPLC. J'en profite aussi pour remercier mes collaborateurs **Stéphane D, Patrick C, Stefania, Ali, Caroline G et Sophie RC**.

La thèse et son côté administratif, une vraie galère ? Non certainement pas quand on a une collègue comme **Layla**. **Layla**, je voudrais te remercier de m'avoir aidé à gérer tout le côté administratif de ma thèse (contrat de travail, Poster(s), Ordres de missions, ...).

C'est aussi une grande aventure humaine. Je voudrais remercier tous les collègues doctorants, post-doctorants, stagiaires et collègues des deux labos. Je ne citerai aucuns noms de peur d'en oublier mais vous avez tous été comme une deuxième famille pendant ces dernières années avec nos disputes et (**surtout**) nos bons moments. J'adresse aussi une pensée et mes remerciements à l'équipe *Tous chercheurs* et partenaires (**Jonas, Annick, Pascale, Anne, Lauralie**) qui m'ont permis de sortir la tête de l'eau à de nombreuses reprises.

Je remercie aussi **Claire, Annabelle, Émilie R, Alexis, Estefania, Louise T., Rania, Claudia, Milena, Razak, Virginie, Rodney, Delphine, Loïck, Kevin, Katleen, Mélanie, Elodie, Xavier et Muriel** (~~à l'image de moi tout est désordonné et j'en oublie sans doute~~) ainsi que ma connaissance amicale (<3) **Stéphane**. Je remercie aussi **Anthony** et **Johan** pour ces fou rires, **Gérard** pour nos discussions parfois (~~très~~) mouvementées mais tellement intéressantes et là encore je dois oublier des personnes tellement ces trois années furent merveilleuses en compagnie de toutes les personnes que j'ai pu rencontrer. Je ne les citerais pas tous mais merci aux nombreux stagiaires avec qui j'ai pu échanger dont **Maha, Brian, Louise R, Guillaume, Anthony et Annissa**. Merci aussi à des collègues/amis du LCPME **Guillaume, Julie et Laura**.

Je remercie du fond du cœur **Émilie** et « **Fossile** » pour les moments magiques hors boulot et leurs rôles de grand-tonton et tata « au top » de Carotte (xD), je vous adore. Je remercie aussi les potes de l'escalade, **Diego, Fred et Charlotte**.

Je remercie aussi **Guillaume, Coralie, Eloïse** et **Lucas** pour ces week-ends improvisés en Haute-Marne. Je souhaite remercier mes parents **Béatrice** et **Frédéric**, ma sœur **Camille**, mon Bro' **Maxou** pour leurs soutiens inconditionnels, je vous aime.

Enfin mes derniers mots seront pour l'amour de ma vie **Manon**. Dans *boys over flowers*, une voyante prédit à Geum Jan Di que parmi les deux hommes qui l'entoure l'un sera son mari l'autre son âme sœur, moi j'ai de la chance, j'ai les deux grâce à toi. Je ne sais que te dire de plus ce qui est paradoxal car tu m'apportes tellement de bonheur, d'amour et de stabilité. Je te dirais alors simplement **Merci** et je t'aime.

Liste des abréviations

°C : Degrés Celsius

μl : microlitre

μM : micromolaire

ACP : Analyse par composantes principales

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANI : Average nucleotide identity

sRNA: Small ribonucléique acids

BGC : Biosynthetic Gene Cluster

antiSMASH : antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell

DAD : Diode Array Detector

Derep : Dereplication

DO : Densité optique

JGI : Joint Genome Institute

GC-MS : Gaz chromatography coupled with mass spectrometry

GNPS : Global Natural Product Social Molecular Networking

kb : Kilobase

l : Litre

LC-DAD : Liquid chromatography coupled with UV-visible DAD

LC-MS : Liquid chromatography coupled with mass spectrometry

Mb : Mégabase

ml : millilitre

MLST : MultiLocus Sequence Typing

NCBI : National Center for Biotechnology Information

nm : nanomètres

MS : Métabolites Spécialisés

NRP : Non-Ribosomal Peptide

NRPS : Non ribosomal Protein Synthase

nt : Nucléotide

ORF : Open Reading Frame

PGPR : Plant growth-promoting rhizobacteria

pH : Potentiel hydrogène

PKS : Polyketide Synthase

PLS-DA : Partial Least square discriminant analysis

QS : Quorum sensing

RAST : Rapid Annotation using Subsystem Technology

RIPP : Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptide

RPM : Rotations Par Minutes

SMs: Specialized Metabolites

Productions Scientifiques

Les publications seront présentées dans la partie résultats. Les posters et leurs résumés associés sont présentés en annexes 1.

Publications

- 1- Nicault, M.; Tidjani, A.-R.; Gauthier, A.; Dumarcay, S.; Gelhaye, E.; Bontemps, C.; Leblond, P. Mining the Biosynthetic Potential for Specialized Metabolism of a *Streptomyces* Soil Community. *Antibiotics* **2020**, *9*, 271.
- 2- Nicault, M., Tidjani, A.-R., Gelhaye, E., Bontemps, C., Leblond, P., 2020. Genome Sequences of Five *Streptomyces* Strains Isolated at Microscale. *Microbiol Resour Announc* *9*, e00428-20, /mra/9/23/MRA.00428-20.atom. <https://doi.org/10.1128/MRA.00428-20>
- 3- Nicault, M., Zaiter A., Dumarçay S., Chaimbault, P., Gelhaye, E., Leblond, P., Bontemps, C., 2020. Elicitation of antimicrobially active compounds by *Streptomyces*-Fungus co-cultures, *soumis dans MDPI Microorganisms*, **2020**.

Posters

- 1- Matthieu NICAULT, Cyril BONTEMPS, Eric GELHAYE and Pierre LEBLOND, Activation of cryptic biosynthetic pathways by bacterial/fungal co-cultures, LUE Impact Biomolecule seminar, 2019, Palma de Mallorca, Spain
- 2- Matthieu NICAULT, Cyril BONTEMPS, Eric GELHAYE and Pierre LEBLOND, Activation of antimicrobial compounds by bacterial/fungal co-cultures, 2019, FEMS, Glasgow, Scotland
- 3- Matthieu NICAULT, Cyril BONTEMPS, Eric GELHAYE and Pierre LEBLOND, Elicitation of cryptic antimicrobial compounds by microbial co-culture, 2018, Séminaire école doctorale SIRENA, Nancy, France
- 4- Matthieu NICAULT, Cyril BONTEMPS, Eric GELHAYE and Pierre LEBLOND, Bacteria/fungi Interactions (BFI): a way to induce the production of new bioactive metabolites, 2018, Séminaire LUE Impact Biomolecule, Nancy, France
- 5- Matthieu NICAULT, Cyril BONTEMPS, Eric GELHAYE and Pierre LEBLOND, Deciphering and exploiting bacteria-fungi dialogues to identify new bioactive metabolites, 2018, Journées Jean Chauvignon

Communications Orales

- 1- Matthieu NICAULT, Cyril BONTEMPS, Eric GELHAYE and Pierre LEBLOND, Bacteria/fungi Interactions (BFI): a way to induce the production of new bioactive metabolites, 2018, Séminaire LUE Impact Biomolecule, Nancy, France

Sommaire

Partie 1 : Introduction.....	16
Introduction générale : « De l'Antibio-résistance au besoin urgent de nouvelles molécules biologiques dans différents secteurs ».....	18
Les molécules biologiques : Sources, fonctions et biosynthèses	22
Sources des molécules biologiques	22
Généralités.....	22
Les bactéries du genre <i>Streptomyces</i>	23
Les champignons de la division des basidiomycètes	25
Fonctions des molécules biologiques	26
Métabolisme primaire	26
Métabolisme spécialisé.....	26
Les voies de biosynthèses des molécules biologiques.....	32
Les voies NRPS et PKS	32
Les voies NRPS.....	32
Les voies PKS	33
Les voies hybrides NRPS-PKS.....	34
Les autres voies de biosynthèse.....	34
Les terpènes	34
Les voies de biosynthèse des acides gras	34
Les aminoglycosides	35
La régulation de la biosynthèse des métabolites spécialisés.....	35
Les systèmes de régulations des bactéries du genre <i>Streptomyces</i>	36
Les systèmes de régulations des champignons.....	37
Les méthodes pour accéder à la diversité chimique des micro-organismes.....	38
La fouilles des données génomiques la preuve d'un potentiel sous exploité	38
Les méthodes dépendantes du génome	39
l'accès et la modification des gènes.....	39
L'interférence avec la transcription	40
Les modifications de la biosynthèse	41
Les méthodes indépendantes du génome	41
Les stress abiotiques	41

Les stress biotiques	42
Les interactions microbiennes du sol	43
L'écosystème sol.....	43
Communautés bactériennes.....	44
Communautés fongiques.....	46
Communautés mixtes bactéries/champignons	47
Des interactions microbiennes à la découverte de nouvelles molécules biologiques	50
La co-culture : mimer la nature au laboratoire.....	50
La métabolomique : détecter l'induction de nouveaux composés	52
La déréplication : accélérer le processus d'identification de ces composés	56
Objectifs de la thèse.....	60
Partie 2 : Résultats et discussions	62
Chapitre R1 : Stratégie d'échantillonnage, de sélection et séquençage génomique de 8 souches de <i>Streptomyces</i> à une micro-échelle	64
Résumé des résultats en français :	66
Chapitre R2 : Étude du potentiel de production des métabolites spécialisés d'une communauté de <i>Streptomyces</i> du sol.....	74
Résumé des résultats:.....	76
Données supplémentaires de l'article	94
Chapitre R3 : Étude génomique et chimique de 7 champignons Basidiomycètes	100
Introduction.....	102
Matériel et méthodes.....	103
Souches utilisées lors de la thèse et extractions des molécules.....	103
Génomes de références utilisés.....	104
Analyse des génomes.....	104
Détermination et analyse des voies de biosynthèse.....	105
Analyse HPLC-DAD	105
Résultats	106
Classification taxonomique des 7 espèces des champignons Basidiomycètes	106
Une conservation des gènes essentiels importante au sein de la division	107
Une diversité des voies de biosynthèses très importantes.....	108
Les profils chimiques illustrent cette diversité	113

Conclusion	115
Données complémentaires.....	116
Chapitre R4 : Induction de composés actifs antimicrobiens par des co-cultures entre <i>Streptomyces</i> et champignons	120
Résumé des résultats en français :	122
Annexes au chapitre R4 (Données supplémentaires de l'article).....	150
Chapitre R5 : Effets des interactions sur la production de molécules impliquées dans les réponses anti-inflammatoires et dans les stress oxydants	154
Introduction.....	156
Matériel et méthodes.....	158
Tests de cytotoxicité et anti-inflammatoire (inhibition de la production de NO).....	158
Tests antioxydants (inhibition de la production de ROS).....	160
Tests de chélation du fer.....	161
Résultats	163
Effets des interactions sur l'inhibition du NO (anti-inflammatoire).....	163
Effet des interactions sur l'inhibition des ROS (Antioxydants).....	164
Effet des interactions sur la chélation du fer	165
Conclusion	166
Annexes du chapitre 5	167
Partie 3 : Conclusions – Discussions – perspectives.....	170
Bibliographie.....	188
Annexe – Liste des communications.....	214

Liste des figures

Figure I1 : sources, nombres de molécules connues et nombre de molécules actives de trois regnes du vivants (tiré de Bérdy, 2012)	23
Figure I2 : Cycle de vie de la bactérie du genre Streptomyces (Seipke et al., 2011).....	24
Figure I3 : Différentes classes de métabolites spécialisés produits par les bactéries du sol (adapté de Tyc et al., 2017)	27
Figure I4 : Exemples de molécules de type polycétides (adapté de Weissman and Leadlay, 2005)	29
Figure I5 : Mécanisme de synthèse par les NRPS (Weissman, 2015).....	32
Figure I6 : Mécanisme de synthèse des PKS (Weissman, 2005)	33
Figure I7 : Exemple d'aminoglycosides de type A) Streptidine et B) 2-Déoxystreptatine.....	35
Figure I8 : Impact du Carbone et du phosphate sur la régulation du métabolisme de Streptomyces (Tirée de la thèse de Drago Haas).....	37
Figure I9 : "Crosstalk" entre des voies de biosynthèse chez les champignons	38
Figure I10 : Interactions entre souches de Pseudomonas issues d'un même environnement (Becker et al., 2012)	45
Figure I11 : Réseaux des différentes interactions microbiennes présentes dans le sol (Adaptée de Hassani et al., 2018).....	48
Figure I12 : Etude de l'interaction entre Aspergillus Nidulans et Streptomyces hygroscopicus (adaptée de Schroeck et al., 2009)	51
Figure I13 : Démarche générale pour la métabolomique non ciblée (Nalini KanTA et al., 2020)	53
Figure I14 : La métabolomique permet de faire un lien entre un phénomène biologique et les profils métaboliques pour l'identification de molécules/ions importants (Adaptée de Tourneroché et al., 2019)	55
Figure I15 : Différents modes de dérégulation de molécules	56
Figure R16 : Stratégie d'échantillonnage des souches de la collection (tirée de la thèse d'Abdoul-Razak TIDJANI, 2019).....	66
Figure R17 : Capacité d'inhibition des souches issues de la même collection par les bactéries du genre Streptomyces (tirée de la thèse de Maxime Toussaint).....	68
Figure R18 : Arbre phylogénétique des 7 espèces de champignons Basidiomycètes.....	106
Figure R19 : Comparaison deux à deux des clusters de protéines orthologues des 7 espèces de champignon Basidiomycètes	108
Figure R20 : Nombre de voies de biosynthèse présent chez les 7 champignons.....	109
Figure R21 : Réseau de similarité des régions codant des métabolites spécialisés des 7 champignons basidiomycètes.....	110
Figure R22 : Distribution des voies de biosynthèse partagées au sein des 7 espèces de basidiomycètes	111
Figure R23 : Distribution des voies de biosynthèses spécifiques des 7 espèces de champignons basidiomycètes	112

Figure R24 : Profils chimiques des 7 souches utilisées lors de cette thèse.....	114
Figure R25 : Evolution du nombre de clusters de protéines orthologues totales, conservée et spécifique en fonction du nombre et d'espèces de champignons Basidiomycètes.....	116
Figure R26 : Distribution des zones de chromatogrammes en fonction du nombre de souches de champignons basidiomycètes.....	117
Figure R27 : Sources et impacts des ROS sur les microbes. (Fu et al., 2015).....	157
Figure R28 : Test de viabilité des cellules macrophages au MTT.....	158
Figure R29 : Réaction de Griess.....	159
Figure R30 : Principe du test CAA.....	160
Figure R31 : Réaction chimique du test de chélation du fer.....	161
Figure R32 : Effet des extraits sur la production de NO révélant leur potentiel effet anti-inflammatoire.....	163
Figure R33 : effet des interactions sur l'activité anti-oxydante cellulaire.....	164
Figure R34 : Effet des interactions sur la chélation du fer.....	165
Figure R35 : Test de viabilité des macrophages utilisés en présence des extraits.....	167
Figure R36 : Variabilité des échantillons en triplicat biologiques.....	168

Liste des tableaux

Tableau I1 : Molécules actives connues issues des <i>Streptomyces</i> , activités et applications. .	24
Tableau I2 : Exemples de molécules actives venant de champignons basidiomycètes.....	25
Tableau I3 : Exemples de métabolites spécialisés de type NRP produits par des bactéries...	28
Tableau I4 : Différentes sous classes de terpènes avec des exemples de composés microbiens ainsi que leur activité associée (König et al., 1999; Ourisson et al., 1987; Rukachaisirikul et al., 2019; Sakoulas et al., 2012; Taylor, 1984; Zhu et al., 2015).....	30
Tableau I5 : Exemples de molécules induites par des interactions entre <i>Streptomyces</i> et champignons.....	52
Tableau I6 : Molécules détectées par des méthodes de dérégulation de type Derep1 et Derep2.....	57
Tableau R7 : Inhibition de 3 souches indicatrices par les 8 souches de <i>Streptomyces</i> (tirés de la thèse de Maxime Toussaint, 2018).....	67
Tableau R8 : Souches utilisées pour les analyses chimiques.....	103
Tableau R9 : Génomes de références des souches analysées.....	104
Tableau R10 : Nombre de protéines, nombres de clusters de protéines orthologues et nombre de protéines orthologues uniques.....	116

PARTIE 1 : INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE : « DE L'ANTIBIO-RESISTANCE AU BESOIN URGENT DE NOUVELLES MOLECULES BIOLOGIQUES DANS DIFFERENTS SECTEURS »

L'accroissement de la résistance aux antibiotiques a été l'une des premières conséquences de leur utilisation répandue et incontrôlée. Pour comprendre l'antibiorésistance et le besoin de nouvelles molécules, il est important de présenter son historique.

L'ère des antibiotiques a été inaugurée par le travail de nombreux scientifiques. En 1929, Alexander Flemming publie ses travaux de recherches sur l'isolement de la pénicilline à partir du champignon *Penicillium* (Fernandes, **2006**). En 1935, l'efficacité antibactérienne *in vivo* de cette molécule a été démontrée puis sa production à grande échelle a été industrialisée dans les années 1940 (Fernandes, **2006**). Cette industrialisation a été suivie par l'isolation et le développement d'un nombre important d'antibiotiques tels que les tétracyclines, les macrolides ou encore les rifamycines (Fernandes, **2006**). Durant cette période appelée l'âge d'or des antibiotiques, le nombre de morts causé par des infections bactériennes a grandement diminué (Fernandes, **2006**). Entre les années 60 et 70, des souches bactériennes multi-résistantes ont commencé à émerger et, de nouveau, un effort sur la recherche d'antibiotique a été effectué. Pour cela, de nouvelles approches ont été utilisées comme celle de l'hémi-synthèse mise en place par les chimistes (Fernandes, **2006**). Autour des années 80, les compagnies pharmaceutiques ont eu des difficultés à identifier d'autres dérivés issus de procédés chimiques pour contrer l'évolution (acquisition de résistances aux antibiotiques) des bactéries sous la pression de l'utilisation abusive des antibiotiques dans les domaines cliniques et agricoles. Les mécanismes évolutifs conférant la résistance sont principalement liés aux transferts de gènes sous la pression de sélection (MacLean and San Millan, **2019**). De nouvelles recherches ont été effectuées afin de découvrir de nouveaux antibiotiques mais à chaque fois qu'un antibiotique est découvert une nouvelle forme de résistance y est associée. Par exemple, lors de la découverte de la Pénicilline en 1929, une souche de Staphylocoque résistante à la Pénicilline apparaît en 1948 ou alors la souche de Staphylocoque résistante à la Méthyciline apparaît en 1960 soit un an après sa découverte.

La diminution de la recherche de composés antimicrobiens est un problème majeur. En effet, entre 1980 et 2003, un nombre important d'études réalisées par les compagnies pharmaceutiques ont eu pour résultat une diminution des profits causée par un coût de recherche élevé. Ce fut le début du déclin de la recherche de composés antibiotiques notamment produits par les micro-organismes. Pour expliquer cette décroissance, hormis les problèmes économiques, d'autres facteurs se sont ajoutés comme les actions de l'homme (utilisation et sous-estimation de la faculté évolutive des micro-organismes) et les limitations technologiques (techniques, cout) (Bérdy, **2012**).

Le phénomène d'antibiorésistance est un problème majeur en santé humaine. En effet, actuellement, le nombre de morts dus à des bactéries multirésistantes est de 33 000 morts par an en Europe et 700 000 à travers le monde (Cassini et al., **2019**). En 2050, ce nombre est estimé à 10 000 000 de morts annuellement avec un coût de l'ordre de 10 000 milliards de dollars. Il est donc important et urgent de trouver un moyen de résoudre ce problème.

Dans d'autres domaines tels que l'agriculture, certaines molécules pesticides dont le controversé Glyphosate pose de nombreux problèmes sur la santé humaine et sur l'environnement. En effet, des études ont montré son effet potentiellement cancérigène sur l'Homme (Van Bruggen et al., **2018**). Dans cette même étude, les auteurs ont établi une possible corrélation entre l'utilisation du glyphosate et l'évolution de la résistance aux antibiotiques. Il est donc essentiel de trouver des alternatives « vertes » à son utilisation et qui n'engendrera pas de pertes économiques.

Pour cela, il s'agit d'abord de stopper le déclin de la recherche de molécules issues du vivant notamment des micro-organismes et augmenter l'efficacité de leur recherche. Pour répondre à ces deux attentes, les points suivants doivent être complétés (Bérdy, 2012) :

- 1) Trouver de nouvelles sources de molécules
- 2) Découvrir de nouvelles méthodes de prospections, plus sélectifs et plus efficaces pour accéder à l'ensemble de la diversité cryptique (non accessible dans des conditions classiques) présent dans la nature.
- 3) Utiliser des méthodes plus simples et moins coûteuses

Au cours de cette introduction, il sera présenté les principales sources de molécules biologiques, leur rôle (principalement les métabolites microbiens), leur potentiel de production ainsi que des méthodes permettant l'induction de composés cryptiques et comment les identifier.

LES MOLECULES BIOLOGIQUES : SOURCES, FONCTIONS ET BIOSYNTHESES

SOURCES DES MOLECULES BIOLOGIQUES

GENERALITES

Les molécules biologiques peuvent être isolées à partir du métabolisme de tous les organismes vivants. Ils peuvent être issus de différents environnements, y compris le microbiote de macroorganismes.

Une revue bibliographique de 2012 s'est intéressée au nombre de molécules biologiques connues et issues de trois règnes du vivant : les animaux, les plantes et les micro-organismes (Bérdy, **2012**). Il a été estimé que ces trois règnes produisent près de 500 000 composés connus. La répartition de ces composés selon leur source et leur bio-activité est résumée dans la figure suivante (figure I1). Les principaux producteurs sont les plantes (70% soit 350 000 composés) suivis des animaux (20% soit 100 000 composés) et des micro-organismes (10% soit 70 000 composés). En termes de bio-activités, les micro-organismes sont la source de molécules biologiques la plus intéressante (47% des composés microbiens détectés ont une activité contre 2% et 3% pour les animaux et les plantes). Bien qu'elle soit relativement faible, les micro-organismes produisent la plus forte quantité de composés actifs qui seront utilisés comme médicaments. En effet, sur les 33 000 composés actifs microbiens seuls 0,6% soit environ 400 composés seront utilisés par la suite. Néanmoins, les micro-organismes restent la source la plus intéressante en termes de ratio nombre de molécules actives sur nombres de molécules trouvées. En effet, il existe près d'une chance sur deux de tomber sur une molécule active en étudiant les micro-organismes.

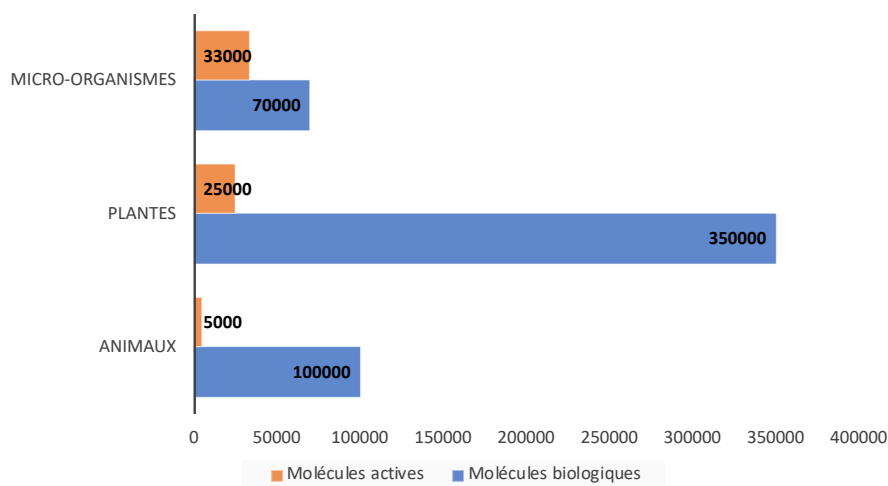


FIGURE I1 : SOURCES, NOMBRES DE MOLECULES CONNUES ET NOMBRE DE MOLECULES ACTIVES DE TROIS REGNES DU VIVANTS (TIRE DE BERDY, 2012)

Les molécules bioactives issues du métabolisme des micro-organismes et notamment celui des bactéries du genre *Streptomyces* et des champignons de la division des Basidiomycètes seront particulièrement étudiés dans le cadre de ce travail de thèse.

LES BACTERIES DU GENRE STREPTOMYCES

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses Gram positives ubiquistes du sol. Elles ont un mode de vie saprophyte c'est-à-dire qu'elles sont capables de dégrader les matières organiques du sol. Leur rôle dans le sol est essentiel où elles participent au cycle du carbone (Bontemps et al., **2013**; Song et al., **2001**; Uroz et al., **2012**). Elles sont caractérisées par un cycle de vie complexe dirigée par une programmation génétique en cascade (figure I2) (Champness, **2000**; Elliot et al., **2008**; Seipke et al., **2011**).

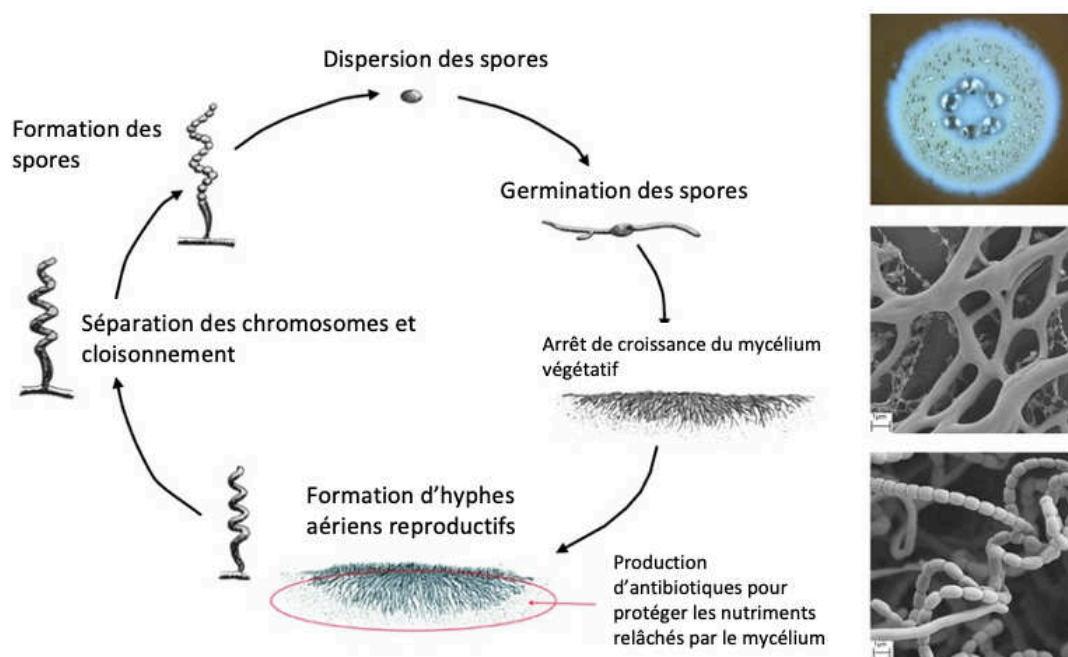


FIGURE I2 : CYCLE DE VIE DE LA BACTERIE DU GENRE STREPTOMYCES (SEIPKE ET AL., 2011)

Ce cycle de vie commence par la formation d'hyphes à partir de spores. Ces hyphes vont croître de façon radiale pour former le mycélium végétatif. Lorsque le milieu s'appauvrit, le mycélium végétatif se différencie pour former le mycélium aérien. C'est lors de la formation des hyphes aériens que des métabolites spécialisés pourront être produits. Cette capacité a été exploitée de longues dates pour la formulation de composés majeurs d'importance en médecine ou en agriculture, quelques exemples étant présentés tableau I1.

Souche	Molécules	Activité	Application notable
<i>S. griseus</i>	Streptomycine	Antibiotique	Traitement de la tuberculose
<i>S. ambofaciens</i>	Spiramycine	Antibiotique	Spectre étendu de bactéries
<i>S. verticillus</i>	Bléomycine	Anticancéreux	/
<i>S. hygroscopicus</i>	Hygromycine B	Antibiotique	Anthelminthique
<i>S. viridochromogenes</i>	Phosphinotricine	Herbicide	/
<i>S. avermitilis</i>	Avermectines	Insecticide, antiparasitaire	/
<i>S. noursei</i>	Nystatine	Antifongique	Traitement de la candidose

TABLEAU I1 : MOLECULES ACTIVES CONNUES ISSUES DES STREPTOMYCES, ACTIVITES ET APPLICATIONS.

Les champignons basidiomycètes appartiennent à la deuxième division de champignons la plus représentée derrière celle des ascomycètes avec plus de 30.000 espèces différentes (Kirk et al., **2001**). Ils sont également présents dans les sols forestiers et peuvent être pathogènes pour l’homme (ex. pneumonies qui sont par exemple causées par deux souches de *Cryptococcus*) et les plantes (ex. maladie du rond pour les pins) (Heitman et al., **2017**; Lehr et al., **2009**). Ces champignons sont utilisés dans le domaine de la santé et de la nutrition humaine (S. Chen et al., **2012**; de Mattos-Shiple et al., **2016**). Ils peuvent participer à la dégradation de la matière organique et sont fonctionnellement classifiés selon le type de pourriture engendré (Baldrian, **2008**; Ghobad-Nejhad, **2011**; Riley et al., **2014a**). Les basidiomycètes sont connus comme producteurs de métabolites spécialisés de structures variées présentant des activités antimicrobiennes et antifongiques. Une analyse portant sur 317 basidiomycètes issus de 17 ordres a étudié leurs bio-activités (Suay et al., **2000**). Sur ces 317 champignons, 45% soit 143 isolats ont montré une activité biologique. Parmi les isolats actifs, 125 (87%) possédaient une activité antibactérienne et 62 (43%) une activité antifongique.

Les structures de ces composés sont diverses. Des exemples de molécules ou de classes de composés bioactifs sont présentés dans le tableau suivant (Tableau I2).

Souches	Molécules	Activité	Références
<i>Ganoderma lucidum</i>	Terpenoids, polysaccharides	Antibiotique, antitumeur, antioxydante	(Cör et al., 2018)
<i>Cyathus cf. Striatus</i>	Pyridocyanathes	Antibiotique	(Richter et al., 2016)
<i>Ganoderma pfeiffei</i>	Ganomycin A et B (Hydroquinones)	Antibiotique	(Mothana et al., 2000)
<i>Jahnoporus hiritus, albtetrellus flettii</i>	Lanostate-type triterpenoids, prenylphenol	Antibiotique	(Liu et al., 2010)
<i>Trametes versicolor</i>	Tramesan (polysaccharide)	Anti-oxydant	(Scarpari et al., 2017)
<i>Schizophyllum commune</i>	Schizostatin (Diterpenoids)	Squalène synthase inhibitor	(Tanaka et al., 2001)

TABLEAU I2 : EXEMPLES DE MOLECULES ACTIVES VENANT DE CHAMPIGNONS BASIDIOMYCETES

FONCTIONS DES MOLECULES BIOLOGIQUES

METABOLISME PRIMAIRE

Le métabolisme primaire comprend les enzymes et leurs produits, les métabolites primaires, nécessaires à la croissance, au développement et à la reproduction des micro-organismes. Les classes de métabolites primaires sont les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques. Les molécules issues du métabolisme primaire sont souvent les précurseurs d'autres voies métaboliques qui sont celles des métabolites spécialisés. La majeure partie de ces précurseurs issus de voies du catabolisme (exemple : Glycolyse ou Cycle de Krebs) pourront être utilisées lors du métabolisme spécialisé comme par exemple l'acétyl-CoA produit lors de la glycolyse qui va ensuite être utilisé lors de la biosynthèse de métabolites spécialisés de type polycétides. Certains nutriments comme le phosphate ou des molécules biologiques telles que les RNAs peuvent contrôler à la fois le métabolisme primaire et intervenir dans le métabolisme spécialisé qui sera développé par la suite (Bobrovskyy et al., **2015**; Sola-Landa et al., **2003**).

METABOLISME SPECIALISE

Les métabolites spécialisés ne sont pas nécessaires pour la croissance végétative, ni pour le développement incluant la reproduction des organismes considérés. En effet, ils sont majoritairement produits lors de la phase d'arrêt de croissance des micro-organismes. Les molécules qui interviennent dans des contextes de réponse à des stimuli ou à des stress seront principalement évoquées. Leurs activités qui pourraient être exploitables en applications biotechnologiques seront présentées.

Chez les micro-organismes du sol, une étude a montré qu'il existe différentes catégories de molécules (classées, par exemple, par type d'enzymes de synthèse) qui sont présentées dans la figure suivante (figure I3) (Tyc, et al., **2017**). Bien que classes de composés et types de structures soient mélangées, les principales catégories de métabolites spécialisés sont les polycétides, les peptides non ribosomiques et les bactériocines. Les sidérophores sont également importants pour les micro-organismes car ils piègent le fer qui est un nutriment important pour leur développement.

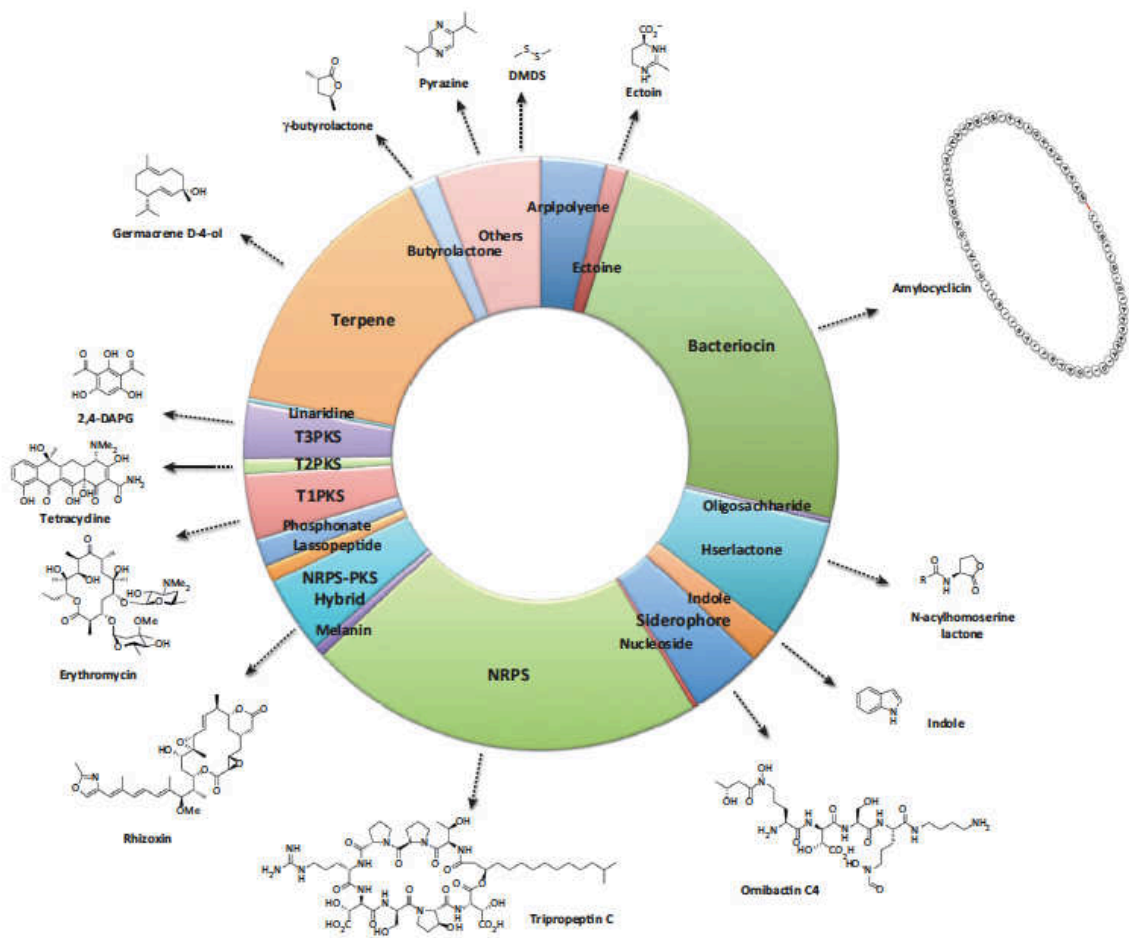


FIGURE 13 : DIFFERENTES CATEGORIES DE METABOLITES SPECIALISES PRODUITS PAR LES BACTERIES DU SOL (ADAPTE DE TYC ET AL., 2017)

30 séquences génomiques de bactéries issues du sol ont été analysés par Antismash. Les classes de métabolites spécialisés les plus fréquentes ont été représentées. Une molécule représentative de chacune des classes est mentionnée.

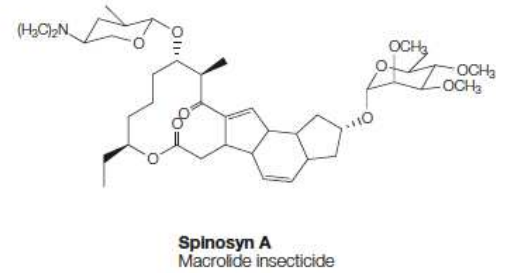
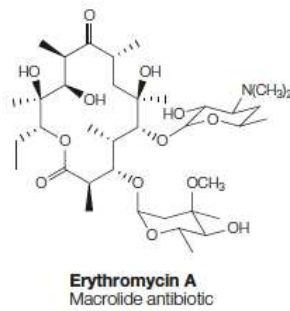
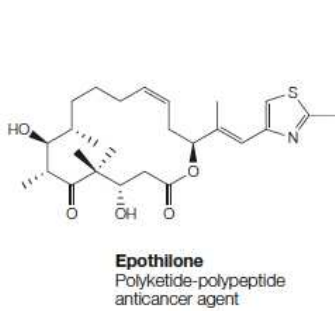
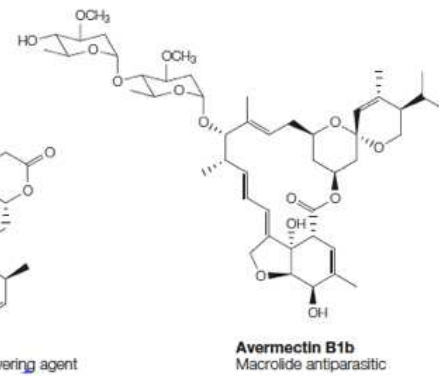
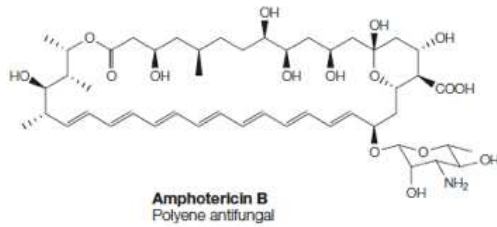
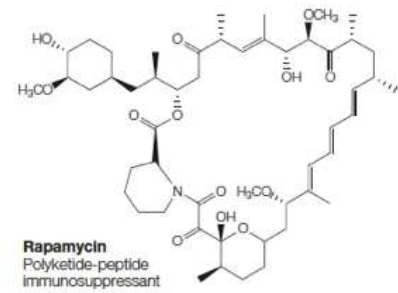
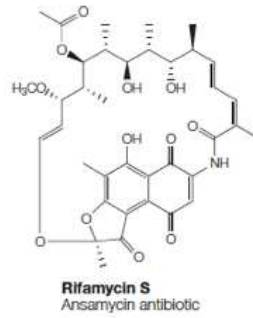
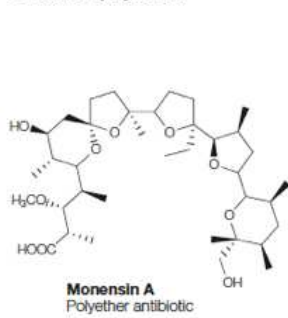
Les peptides non ribosomiques sont des peptides qui ne sont pas synthétisés par l'intermédiaire des ribosomes mais par des enzymes dédiées (Les Peptides synthèses non ribosomiques). La plupart de ces composés possèdent une bio-activité (antibactérien, antifongique ou anticancéreux) (Tyc et al., **2017**) (Tableau I3).

Composé	Famille moléculaire	Source	Activité	Références
Pristinamycine	Depsipeptide	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Antibiotique	(de Crécy-Lagard et al., 1997)
Capreomycine	peptide cyclique	<i>Streptomyces capreolus</i>	Antibiotique	(Stark and Boeck, 1965)
Teicoplanine	Glycopeptide	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Antibiotique	(Somma et al., 1984)
Vancomycine	Glycopeptide	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	Antibiotique	(van Wageningen et al., 1998)
Bleomycine	Peptide hybride	<i>Streptomyces verticillus</i>	Antibiotique Anti-tumorale	(Galm et al., 2005)
Daptomycine	Lipopeptide	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Antibiotique	(Li et al., 2013)
Actinomycine D	Polypeptide	<i>Streptomyces</i> sp.	Anti-tumorale	(Williams and Katz, 1977)
Romidepsine	Depsipeptide	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Anti-tumorale	(Grant et al., 2010)

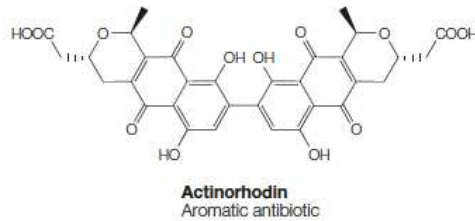
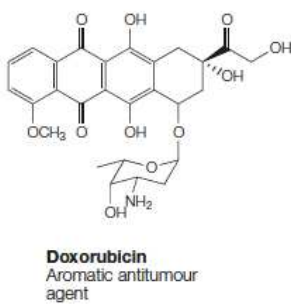
TABLEAU I3 : EXEMPLES DE METABOLITES SPECIALISES DE TYPE NRP PRODUITS PAR DES BACTERIES

Les polycétides sont des molécules issues de la condensation de dérivés acétyles ou malonyles (Weissman and Leadlay, **2005**). Les polycétides sont de structures variées et rassemblent notamment des analogues de peptides, des polyènes ou des macrolides (figure I4). Ces composés présentent différentes actions comme des propriétés antibiotiques ou antifongiques (Weissman and Leadlay, **2005**).

a Reduced polyketides



b Aromatic polyketides



c Unclassified

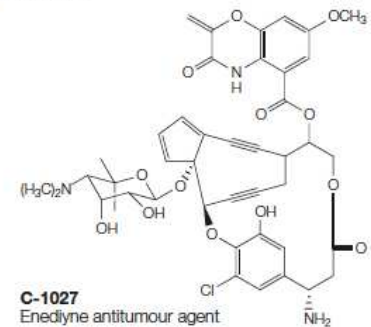


FIGURE 14 : EXEMPLES DE MOLECULES DE TYPE POLYKETIDES (ADAPTE DE WEISSMAN AND LEADLAY, 2005)

D'autres composés sont des hybrides entre peptides nonribosomiques et polycétides. C'est le cas de la rhizoxine, une molécule méthyle-oxazole possédant une activité anti-tumorale. Ce composé est issu de voies de biosynthèse hybrides combinant les activités enzymatiques des modules de deux enzymes de synthèse de type polycétide et de peptides non ribosomiques (Suroto et al., **2018**). La rhizoxine a été isolée de la bactérie *Burkholderia rhizoxinica*, endosymbionte du champignon *Rhizopus microsporus* (Scherlach et al., **2006**). Cette molécule est une toxine qui détruit le système racinaire des plantes.

Les terpènes sont issus de la condensation d'unités de base appelées isoprène (5 carbones). Chez les bactéries notamment, les terpènes sont issus de l'assemblage de deux unités de base : isopentenyl pyrophosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Ces molécules sont sous-classées en fonction du nombre d'unités isoprène auxquelles peuvent s'ajouter d'autres groupements (tableau I4).

Nombre d'unité C5	Formule de base	Sous-classe	Exemple
2	C10H16	Monoterpènes	1 composé antimicrobien isolé de <i>Trichoderma reesei</i>
3	C15H24	Sesquiterpènes	3 composés isolés de <i>Trichoderma reesei</i> 1 composé avec une activité antimicrobienne
4	C20H32	Diterpènes	Geniculol avec une activité anti-algues isolé du champignon endophyte <i>Geniculosporium</i>
5	C25H40	Sesterterpènes	Merochlorine A avec une activité antimicrobienne isolé de la souche actinomycete CNH189
6	C30H48	Triterpènes	Dérivés du Squalène avec des rôles dans la synthèse et la stabilité de la membrane bactérienne
8	C40H64	Tétraterpènes	Lycopene avec différentes bioactivités produit par <i>E. coli</i>
> 8		Polyterpènes	Rôles dans la synthèse et la stabilité de la membrane

TABLEAU I4 : DIFFERENTES SOUS CLASSES DE TERPENES AVEC DES EXEMPLES DE COMPOSES MICROBIENS AINSI QUE LEUR ACTIVITE ASSOCIEE (KÖNIG ET AL., 1999; OURISSON ET AL., 1987; RUKACHAISIRIKUL ET AL., 2019; SAKOULAS ET AL., 2012; TAYLOR, 1984; ZHU ET AL., 2015)

Une autre classe de métabolites spécialisés sont les bactériocines. Ce sont des peptides antimicrobiens synthétisés par le ribosome. Le spectre d'activité antimicrobienne de ces composés va de micro-organismes de la même espèce à des micro-organismes d'autres genres (Cotter et al., **2005**). La production de ces composés est utilisée lors de compétitions pour l'accès aux nutriments ou à l'espace dans la niche écologique ou alors dans le cadre de la protection de la plante. Par exemple, une souche de la famille phylogénétique des *Pseudomonas putida*, isolée de racine de bananier produit la putidacine qui inhibe une bactérie phytopathogène du même genre (Parret et al., 2003).

Parmi les autres familles de molécules produites par les micro-organismes, on peut citer les sidérophores qui permettent de chélater le fer, élément essentiel au développement cellulaire. Ce sont principalement des composés de la classe des chatécols, des hydroxamates et des carboxylates. Ces composés sont produits par 2 types de synthèse : soit par des enzymes de type NRPS ou des sidérophores synthétases NRPS (Barry and Challis, **2009**). Les sidérophores peuvent avoir une activité antimicrobienne dans le cadre d'une compétition pour capter le fer (Holinsworth and Martin, **2009**). C'est le cas par exemple de la Fradiamine A isolée de *Streptomyces fradiae* présent dans les océans (Takehana et al., **2017**).

D'une manière générale, ces molécules possèdent des bio-activités qui peuvent être utiles dans différents domaines comme celui de la santé humaine ou de l'agriculture. Ces molécules résultent d'une chaîne de réactions enzymatiques qui forment une voie de biosynthèse. La partie suivante va essentiellement s'intéresser aux voies de biosynthèses microbiennes.

LES VOIES DE BIOSYNTHESES DES MOLECULES BIOLOGIQUES

Les voies de biosynthèse de métabolites spécialisés des micro-organismes sont organisées sous forme de « clusters », c'est-à-dire de regroupements des gènes impliqués dans la synthèse et la modification de la molécule (décoration), la régulation, le transport, et la résistance (Medema et al., **2015**). Les deux principales activités enzymatiques sont les Polycétide synthase (PKS) et Peptide synthetase non ribosomique (NRPS) (Weber and Kim, **2016**). D'autres enzymes sont responsables de la synthèse d'autres molécules comme les terpènes, certains dérivés d'acides gras ou les aminoglycosides.

LES VOIES NRPS ET PKS

LES VOIES NRPS

Les peptides non ribosomiques sont produits par des méga-enzymes nommées peptide non ribosomique synthétases (« Non Ribosomal Peptide synthase » ou NRPS). L'enzyme possède différents modules eux-mêmes classés en fonction de leur activité enzymatique spécifique. Le premier module qui est un module d'initiation va permettre la sélection de l'acide aminé de départ de façon spécifique au niveau du domaine A (Adénylation) et l'activation des acides aminés par leur conversion en aminoacyl-AMP. Ce peptide initial va se fixer sur le domaine PCP (« Peptidyl Carrier Protein ») par le biais d'une liaison thioester et le relargage de l'AMP. Ensuite, le module d'élongation va permettre l'addition itérative d'acides aminés par la formation de liaisons amides. Une fois le squelette de la molécule NRP terminé, le module de terminaison va permettre l'hydrolyse de la liaison thioester formée et permettre la libération de la molécule finale (figure I5) (Weissman, **2015**).

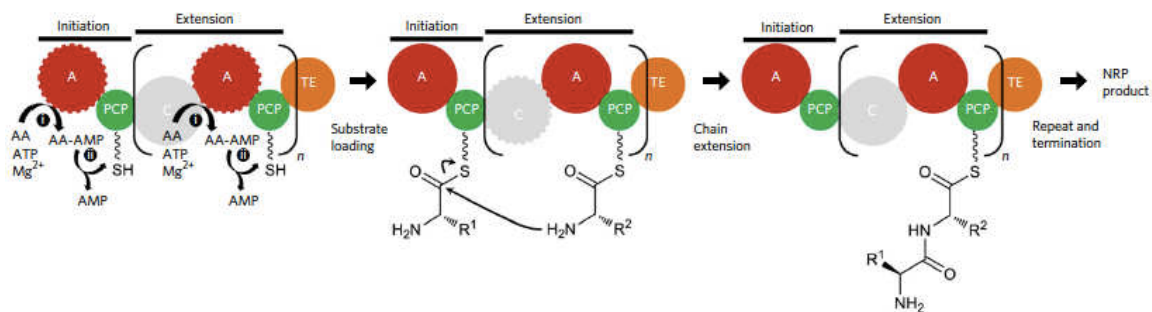


FIGURE I5 : MECANISME DE SYNTHÈSE PAR LES NRPS (WEISSMAN, 2015)

LES VOIES PKS

Les polycétides sont produits par des polycétide synthases (« Polyketide synthase » - PKS). Les polycétides sont synthétisés à partir de petits acides carboxyliques assemblés de façon modulaire (type 1) ou itérative (type 2 et 3). Les substrats de départ peuvent être variés d'où des produits finaux riches en structure et complexité. Ces enzymes comprennent plusieurs domaines fonctionnels. Le domaine AT (Acyl transferase) initie la réaction en enlevant le groupement CoA de l'acyle-CoA de départ. Une liaison thioester se forme ensuite via le domaine ACP (« acyl carrier protein ») et le chaînon suivant se fixe par le même type de liaison sur le module KS (B-Ketoacyl synthase). Lors de l'étape d'élongation, la cassure de la liaison thioester sur le module KS et la décarboxylation va entraîner la formation de la liaison carbone-carbone entre les deux chaînons et former un premier polycétide intermédiaire. La réaction de terminaison repose aussi sur la rupture de la liaison thioester et libère le polycétide final (figure 16) (Weissman, 2015).

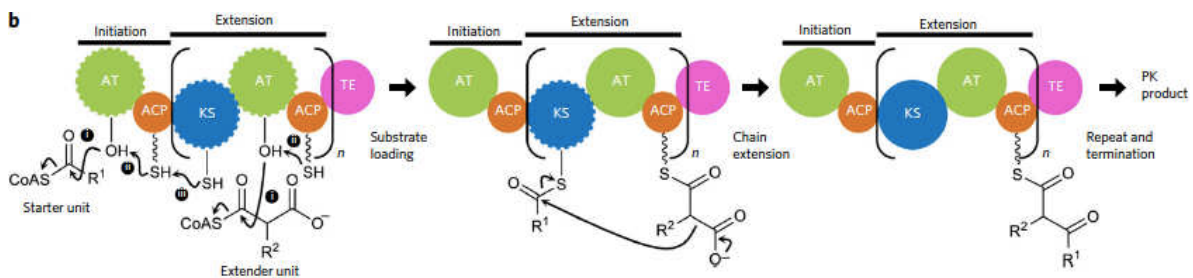


FIGURE 16 : MECANISME DE SYNTHÈSE PAR LES PKS (WEISSMAN, 2005)

Il existe trois classes de PKS. Les PKS de type I ont un fonctionnement proche de celui des NRPS. Elles sont organisées en modules dont chacun catalyse l'ajout d'un groupement acyle dans le polycétide. En effet, le substrat est sélectionné par le domaine AT et fixé sur le domaine ACP. Ensuite, un ensemble de réactions de condensation va permettre l'élongation de la molécule à travers des réactions de décarboxylation. Les PKS de type II, quant-à-elles, possèdent un fonctionnement itératif. Chacune des enzymes possède un seul domaine fonctionnel et sont utilisées plusieurs fois pour arriver au produit final. Les PKS de type III diffèrent des deux précédentes par l'absence du domaine ACP et l'ajout des groupements supplémentaires se fait directement sur le substrat de départ par le seul module KS (Austin and Noel, 2003).

LES VOIES HYBRIDES NRPS-PKS

Comme décrit précédemment, il existe des voies impliquant des modules des deux grands types d'enzyme décrit précédemment : les PKS et les NRPS. Ces voies dites hybrides sont caractérisées par la présence de relations inter-modulaires entre ces deux types d'enzyme autrement dit que la similitude de ces deux types d'enzymes peut permettre la recombinaison des modules de l'un dans l'autre. Ces assemblages sont présents de deux façons. La première consiste en un assemblage linéaire d'un module NRPS et d'un module PKS. La seconde, présente majoritairement chez les champignons, résulte de l'assemblage d'un seul module itératif PKS et d'un seul module NRPS (permettant la fusion de la chaîne polycétides à un acide aminé) (Fisch, **2013**).

LES AUTRES VOIES DE BIOSYNTHESE

LES TERPENES

Les terpènes sont synthétisés par des terpène synthétases. Les précurseurs des terpènes sont l'isopententényle pyrophosphate (IPP) ou son isomère le diméthylallyl pyrophosphate. L'addition d'IPP entraîne une polymérisation et l'élongation de la chaîne jusqu'à 25 carbones. Ces chaînes peuvent ensuite être couplées sous forme de dimères dimérisées pour obtenir des structures plus longues. La cyclisation des chaînes aliphatiques linéaires par des cyclase permettent d'obtenir une variété de composés complexes.

LES VOIES DE BIOSYNTHESE DES ACIDES GRAS

Les micro-organismes, comme la majorité des organismes, sont capables de produire des acides gras qui appartiennent au métabolisme lipidique. Ces composés peuvent parfois posséder des bio-activités (Yoon et al., **2018**). Les voies de biosynthèses associées font intervenir deux types d'enzymes : les synthèses d'acides gras de type 1 (FAS1) et celles de type 2 (FAS2) dont le substrat de départ est l'acétyl-CoA transformé ou non dans le cadre de synthèse de type 1 en malonyl-CoA par une acétyl-CoA Carboxylase (ACCase). La différence entre ces deux types d'enzyme est que l'une est un groupement d'enzymes codées par plusieurs gènes séparés (FAS2) tandis que la seconde repose sur une seule chaîne peptidique qui possède toutes les activités enzymatiques (FAS1). Les principales voies de biosynthèse chez les micro-organismes sont les synthèses d'acides gras de type 2 hormis chez les Mycobacteries qui possèdent les deux (Gago et al., **2011**). La synthèse de certains acides gras,

chez les procaryotes et les eucaryotes, peut être assurée par des voies de biosynthèse de type PKS (Metz, **2001**).

La modification des enzymes impliquées dans leur voie de biosynthèse entraîne la production d'une large gamme de molécules produites (Gokhale et al., **2007**; Hertweck, **2009**).

LES AMINOGLYCOSIDES

Ce sont des molécules, principalement avec une action antimicrobienne, constituées d'un motif aminocyclitol relié à des sucres par des liaisons glycosidiques. Les aminocyclitols sont des dérivés amino des cyclitols qui sont des composés cycliques avec des fonctions alcools. Elles sont synthétisées par une voie de biosynthèse linéaire faisant intervenir des glycosyltransférases. Il existe deux classes de composés aminoglycosidés qui se différencient selon la position de l'aminocyclitol : les Streptidines comme par exemple la Streptomycine et les 2-Déoxystreptamine comme la Kanamycine (Figure 17) (Yu et al., **2017**).

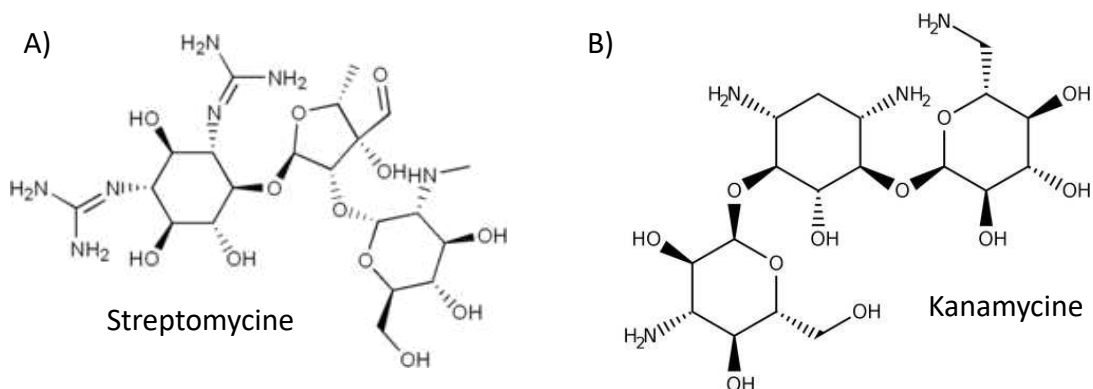


FIGURE 17 : EXEMPLE D'AMINOGLYCOSIDES DE TYPE A) STREPTIDINE ET B) 2-DEOXYSTREPTATINE

LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES METABOLITES SPECIALISES

Les métabolites spécialisés ne sont pas toujours produits dans des conditions de culture au laboratoire. Ces molécules sont principalement produites en réponse à un stress. En effet, la majorité des micro-organismes se trouvent dans des environnements compétitifs et/ou pauvres en nutriments ce qui conduit à des carences énergétiques. Ils doivent perpétuellement s'adapter et pour ce faire ils peuvent, par exemple, produire des métabolites spécialisés (par exemple, les sidérophore lors de carence en fer ou en réponse à des stress

oxydants). La clé pour s'adapter est de produire de façon concordante et coordonnée ces composés (Hoskisson and Fernández-Martínez, **2018**). Pour cela, des mécanismes de régulation existent et agissent à tous les niveaux d'expression qu'ils soient au niveau de la transcription ou de la traduction (Chandra and Chater, **2008**).

LES SYSTEMES DE REGULATIONS DES BACTERIES DU GENRE *STREPTOMYCES*

Chez les bactéries du genre *Streptomyces*, il existe une variété de systèmes de régulation. La régulation chez cette bactérie est complexe et peut se faire via des régulateurs globaux qui activent ou répriment les gènes biosynthétiques ou le font via des répresseurs ou activateurs situés dans les clusters à la suite de cascades de signalisation (van der Heul et al., **2018**). Les nutriments jouent des rôles importants dans la régulation des voies du métabolisme spécialisé. En effet, la concentration en carbone, phosphate ou encore azote par exemple, provoque l'activation d'une cascade transcriptionnelle et la formation de métabolites spécialisés (figure 18). D'autres composés, comme les métaux et plus particulièrement le fer, présents dans l'environnement peuvent entraîner une réponse par la production de métabolites spécialisés. Par exemple, une déficience en fer entraîne la production de sidérophores chez *Streptomyces*. Ces différents exemples correspondent à des régulations de type CSR pour « cluster situated regulators »

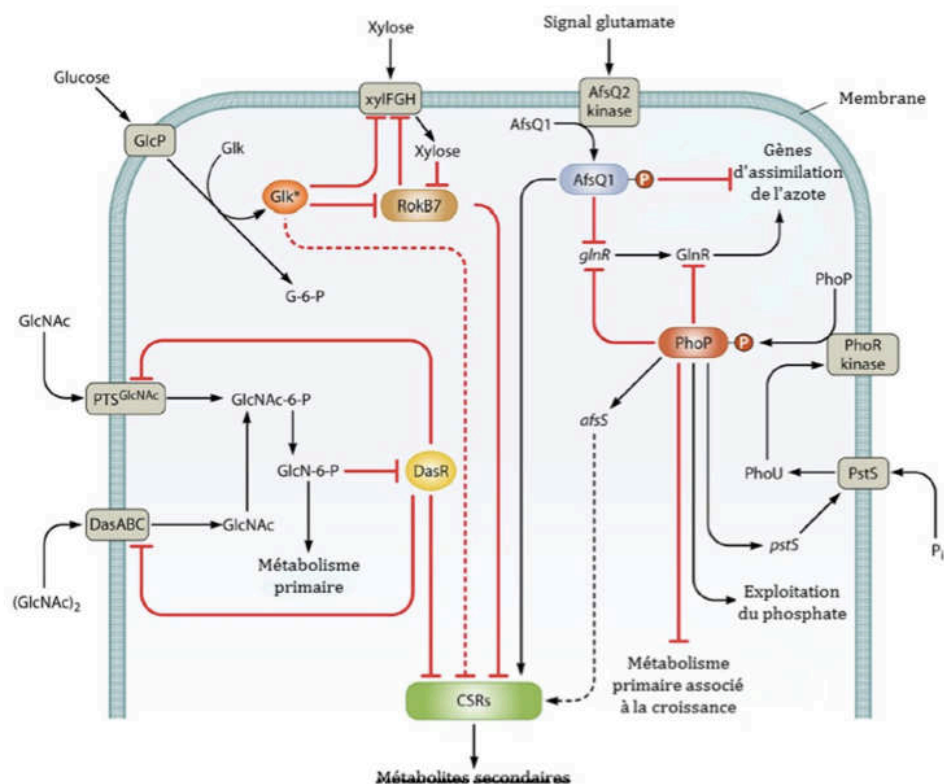


FIGURE 18 : IMPACT DU CARBONE ET DU PHOSPHATE SUR LA REGULATION DU METABOLISME DE STREPTOMYCES (TIREE DE LA THESE DE DRAGO HAAS)

Il existe aussi d'autres systèmes de régulation plus spécifiques des voies de biosynthèses comme les protéines appelées SARP pour « Streptomyces Antibiotics Regulated Proteins » ou des LAL pour « Large ATP-binding regulators of the LuxR family ».

Hormis, la disponibilité des nutriments avec l'accumulation de guanosine tétraphosphate (ppGpp), de di-Guanosine mono phosphate (di-GMP) ou les métaux, il existe différents types de molécules de signalisation tels que les γ -butyrolactones, les furanes, le facteur Pi (Phosphate inorganique) qui permettent la production de métabolites spécialisés (Hoskisson and Fernández-Martínez, **2018**; van der Heul et al., **2018**).

LES SYSTEMES DE REGULATIONS DES CHAMPIGNONS

Les systèmes de régulation chez les champignons sont régis par les mêmes signaux que chez les bactéries du genre *Streptomyces*. D'autres facteurs peuvent néanmoins intervenir tels que la luminosité ou le statut rédox (Brakhage, **2013**). Contrairement aux bactéries, les champignons peuvent posséder plusieurs voies de biosynthèse sur plusieurs chromosomes et peuvent entraîner un phénomène de « cross-talk » (figure 19).

En effet, l'activation d'un cluster d'une voie de biosynthèse présent sur le chromosome A peut entraîner la production d'un facteur de transcription qui va venir se fixer sur une autre voie de biosynthèse présent sur le chromosome B et ainsi entraîner la production de ce nouveau métabolite. Ce système de régulation peut conduire à une diversité importante de molécules produites par un champignon dans une condition spécifique.

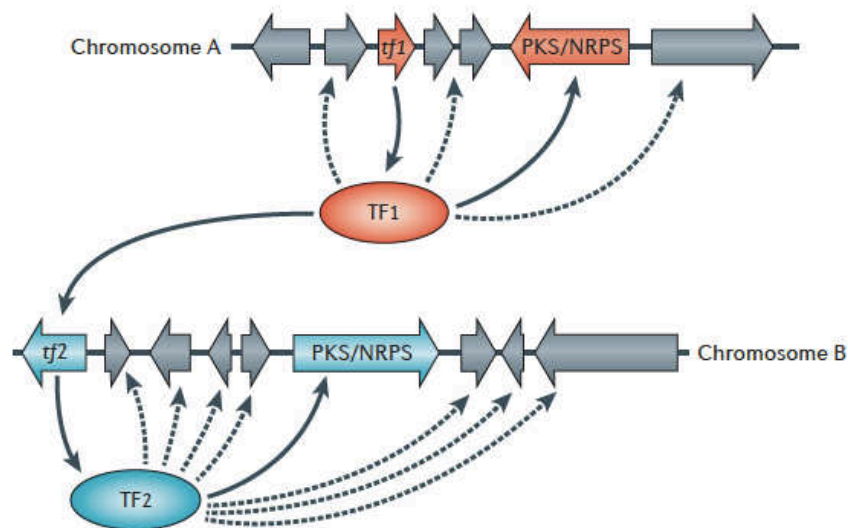


FIGURE 19 : "CROSSTALK" ENTRE DES VOIES DE BIOSYNTHESE CHEZ LES CHAMPIGNONS (TIRÉE DE BRAKHAGE,2013)

LES METHODES POUR ACCEDER A LA DIVERSITE CHIMIQUE DES MICRO-ORGANISMES

LA FOUILLES DES DONNEES GENOMIQUES LA PREUVE D'UN POTENTIEL SOUS EXPLOITE

Les progrès techniques en termes de séquençage de génomes ont également permis d'étudier plus en détails les génomes bactériens. Les analyses des séquences génomiques ont permis de mettre en évidence que le potentiel des micro-organismes, longtemps exploités pour la production d'une molécule, est important. C'est par exemple le cas pour les bactéries du genre *Streptomyces* et de *Streptomyces griseus* exploité pendant longtemps pour la production de la Streptomycine. L'apport d'outils de prédiction des voies de biosynthèse chez les micro-organismes comme Antismash a permis de mettre en évidence que les bactéries du genre *Streptomyces* possèdent en réalité entre 20 et 50 voies de biosynthèses soit entre 15 et 20% de leur génome (Baltz, 2017). D'autres bactéries, par exemple, du genre *Rhodococcus* ou *Myxobacteria*, possèdent également une importante diversité de voies du métabolisme spécialisé (Amiri Moghaddam et al., 2018; Cenicerros et al., 2017).

Les bactéries du genre *Streptomyces* ainsi que les champignons basidiomycètes possèdent des voies du métabolisme spécialisé conservées et d'autres qui sont spécifiques. Par exemple, chez les *Streptomyces*, les voies de biosynthèse de la desferrioxamine et de la géosmine sont très conservées au sein du genre. De par leur rôle important dans la vie de la bactérie, elles sont maintenues au sein des génomes, et héritées le plus souvent de façon verticale. En revanche, d'autres voies de biosynthèses sont spécifiques des souches et pourraient jouer un rôle dans l'adaptation des populations bactériennes, c'est-à-dire de bactéries fortement apparentées, à leur environnement. Ainsi, il a été montré dans plusieurs études que des souches très proches phylogénétiquement possédaient un potentiel de production important ainsi que des métabolomes distincts (Antony-Babu et al., **2017**; Nicault et al., **2020**; Vicente et al., **2018**). La diversité au sein de groupes de bactéries apparentées pourrait servir la population entière à occuper la niche.

En effet, les métabolites produits par une partie seulement de la population pourraient servir à l'ensemble de cette dernière, et la diversité permettrait ainsi d'augmenter le potentiel de synthèse de métabolites spécialisés bien au-delà du potentiel d'un seul génome. Cette diversité de production de métabolites spécialisés est également présente chez les champignons (Han et al., **2020**; Keller, **2019**; Keller et al., **2005**).

Comme démontré dans la partie précédente, ces gènes ne sont pas toujours exprimés au laboratoire. Il est important de trouver des systèmes permettant d'exploiter cette diversité. Il existe différentes méthodes permettant d'exprimer cette diversité métabolique et qui peuvent être dépendantes ou indépendantes de la disponibilité de l'information génétique.

LES METHODES DEPENDANTES DU GENOME

L'ACCES ET LA MODIFICATION DES GENES

En plus de permettre la prédiction de voies de biosynthèse, l'accès aux séquences génomiques permet de mettre en place des systèmes permettant l'activation des voies de biosynthèse. Il s'agit de l'ingénierie génétique. Les méthodes utilisées pour ce propos incluent de nombreuses techniques tels que le knockout de gènes, l'échange de promoteurs et la surexpression des facteurs de transcription (Bertrand et al., **2014**). Dans ce dernier cas, par exemple, la délétion ou la surexpression du régulateur transcriptionnel *LaeA* chez *Aspergillus*

nidulans a permis de mettre en évidence l'expression de voies de biosynthèse chez ce champignon (Bok and Keller, **2004**). Les molécules obtenues par de telles approches résultent bien souvent de méthodes d'expression hétérologue (insertion du gène dans une souche l'exprimant) ou d'expression homologue (réinsertion du gène dans la souche initiale). Il existe aussi des méthodes d'altération du génome initial via des mutagénèses par exemple nécessitant une annotation des gènes initialement. Ces méthodes peuvent aussi être aléatoires comme l'utilisation des ultraviolets (Bode and Zeeck, **2000**; Leonard et al., **2013**). Une dernière approche est l'utilisation de données métagénomiques comme par exemple l'utilisation d'une banque d'ADN créée à partir de l'extraction d'ADN de communautés microbiennes du sol puis fractionnée pour l'exprimer dans un hôte (Lefevre et al., **2008**; Piel, **2011**).

L'INTERFERENCE AVEC LA TRANSCRIPTION

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN génomique est présent sous forme de chromatine ce qui permet le contrôle de la transcription (Felsenfeld and Groudine, **2003**). La modulation de la structure des chromatines a un impact sur l'expression des gènes comme ceux codant le métabolisme spécialisé. Par exemple, la modification des histones en lien avec la structure des chromatines chez *Aspergillus nidulans* a entraîné la production de métabolites spécialisés (Bok et al., **2009**). Une autre approche serait d'utiliser des modifications épigénétiques pour induire la transcription d'autres clusters de gènes silencieux (Cichewicz, **2010**). Ces modifications comprennent la production de produits acétylés ou méthylés, des lysines ubiquitinées, arginines méthylées et des sérines phosphorylées.

Globalement, la variation de l'expression de facteur de transcription permet l'expression de gènes silencieux et la production de métabolites spécialisés. C'est le cas, par exemple, lors de la sur-expression du facteur *laeA* chez *Aspergillus nidulans* qui entraîne la production de métabolites spécialisés (Bok et Keller, **2004**).

LES MODIFICATIONS DE LA BIOSYNTHESE

L'addition d'inhibiteurs de biosynthèse peut entraîner l'activation d'une autre voie de biosynthèse. C'est par exemple le cas lors de l'ajout de tricyclazole qui inhibe la production du 1,8-dihydroxynaphtalène chez *Sphaeropsidales* sp. et qui simultanément induit la production de sphaerolone et dihydrophaerolone (Bode et al., **2000**). Une autre cible possible pour l'induction de métabolites spécialisés est la « SUMOylation » des protéines c'est-à-dire l'ajout d'analogues de l'ubiquitine (petite protéine) qui va agir au niveau de la régulation transcriptionnelle par une modification post-traductionnelle des protéines (Szewczyk et al., **2008**).

Une autre façon de faire est d'inclure dans le milieu de culture des micro-organismes des substrats synthétiques, sous réserve qu'ils soient reconnus par l'enzyme impliquée, qui permettront la synthèse de composés nouveaux. Cette approche est appelée BIO-CHEM (Goss et al., **2012**). Pour résumer, un produit chimique est ajouté dans le milieu de culture et il est transformé par un micro-organisme. C'est sur ce principe que des analogues de la Jandomycine ont été produits.

LES METHODES INDEPENDANTES DU GENOME

LES STRESS ABIOTIQUES

Dans le paragraphe sur les systèmes de régulation, il a été montré que les sources de carbone, phosphate ou encore la présence de métaux tel que le fer avaient un rôle sur la biosynthèse de métabolites spécialisés. Une approche a donc été mise au point consistant à faire varier les conditions de cultures pour induire la synthèse de molécules. Cette méthode est appelée OSMAC pour « One Strains MAny Compounds ». D'autres paramètres que les nutriments peuvent influencer sur la synthèse de métabolites spécialisés. Il s'agit du pH, de la température et de la quantité d'oxygène (Pour revue par Pan et al., **2019**). D'autres sources de stress abiotiques peuvent être l'ajout de solvants organiques dans le milieu de culture tels que l'éthanol et le DMSO (« DiMéthyle SulFOxide ») (Pettit, **2011**).

Une autre façon d'induire la production de métabolites spécialisés est d'exploiter des stress biotiques comme les interactions entre micro-organismes. Cette méthode consiste à exploiter les interactions naturelles (voir partie suivante sur les interactions microbiennes dans le sol) des micro-organismes au laboratoire.

Ces approches peuvent être utilisées pour (i) la compréhension des communautés microbiennes dans un contexte agricole (Rhizosphère ou mycorrhizosphère), (ii) comprendre les interactions hôte-micro-organismes, (iii) comprendre les phénomènes symbiotiques, (iv) augmenter la production de produits de fermentation spécifiques (par exemple la synthèse de Vitamine C lors de l'interaction entre *Etogulonicigenium vulgare* et *Bacillus megaterium*) et (v) l'induction de métabolites d'intérêt pharmaceutique (Bertrand et al., **2013**; Bonfante and Anca, **2009**; Du et al., **2012**; Moree et al., **2013**; Park et al., **2009**; Ridaura et al., **2013**; Turnbaugh et al., **2006**). Cette dernière approche sera développée dans le paragraphe « Des interactions microbiennes à la découverte de nouvelles molécules biologiques ».

LES INTERACTIONS MICROBIENNES DU SOL

L'ECOSYSTEME SOL

Le sol est la couche la plus externe de la croûte terrestre dont la formation découle de la dégradation de la roche mère et de l'apport de matière organique par des processus de pédogénèse. Selon, la profondeur considérée le sol possède différentes structures qui lui confère différentes propriétés physico-chimiques lui permettant ainsi d'assurer différentes fonctions (Henry, **2013** ; Greiner et al., **2017**). Il existe 6 fonctions principales : habitat, source de matière première, régulation du climat et des cycles biogéochimiques, production, support et archivage. Le sol joue un rôle majeur dans l'équilibre de la planète car il participe à différents cycles biogéochimiques comme celui du Carbone et d'autres nutriments ou la purification de l'eau. Pour l'Homme, le sol fournit un grand nombre de services incluant les ressources liées à l'agriculture ou la conservation de traces historiques. Le sol est aussi un habitat pour de nombreux organismes pouvant être la source de molécules actives mais aussi un réservoir important de diversité génétique. Comme décrit précédemment, le sol fournit un habitat à de nombreux organismes comme des micro-organismes, en passant par les insectes et les mammifères. Ensemble, ils forment un écosystème complexe et en résilience. Par exemple, les facteurs environnementaux tels que la température ainsi que l'activité des micro-organismes contribuent à l'équilibre du carbone organique dans le sol.

Les organismes du sol contribuent au cycle du carbone et/ou à la dégradation de la matière organique. Lors de la photosynthèse, la plante capte le CO₂ et produit de l'énergie mais aussi des molécules diverses, incluant les carbohydrates. Ces molécules synthétisées par la plante peuvent également être utilisées par les autres organismes du sol. La mort de la plante s'accompagne de la dégradation et du recyclage de ses structures par un cortège de micro-organismes.

Ces micro-organismes vont pouvoir aussi directement interagir avec la plante de façon positive, c'est le cas des PGPR (« Plant Growth-Promoting Rhizobacteria ») (Cassán et al., **2014**). Par exemple, l'auxine est une phytohormone produite par les rhizobactéries lors d'interactions mychoriziennes, et va stimuler la croissance de la plante (Spaepen and Vanderleyden, **2011**).

Le sol est un écosystème hétérogène qui possède une importante diversité de micro-organismes. Cette diversité est en partie gouvernée par des facteurs clés comme le type de sol, le pH, la disponibilité des nutriments (Berg and Smalla, **2009**; Koyama et al., **2014**; Lauber et al., **2009**). Les micro-organismes tels que les bactéries et les champignons représentent plus des deux tiers des organismes vivants dans le sol (Gobat et al., **2010**). Ils représentent la plus importante diversité génétique et fonctionnelle, et assument de nombreux rôles dans le fonctionnement du sol (Gobat et al., **2010**).

Ces micro-organismes sont principalement situés dans des micro-habitats c'est-à-dire dans des micro-agrégats de 100 µm (Bach et al., **2018**; Cordero and Datta, **2016**; Nannipieri et al., **2003**; Smith et al., **2014**). Dans un gramme de sol, il existe près d'un milliard de bactéries et près d'un million de champignons, cette importante densité de population conduit à différents types d'interactions (Traxler and Kolter, **2015**).

COMMUNAUTES BACTERIENNES

Comme décrit dans le paragraphe précédent, le sol est un environnement dont la densité microbienne est importante et conduit à des interactions. Les principaux types d'interaction dans le sol sont ceux établis entre bactéries qui peuvent être présentes au sein de la même colonie, en intra-genres et inter-genres. Par exemple, il existe des interactions au sein même de la colonie et qui permettent une meilleure adaptation et la colonisation de la niche écologique ainsi que la dégradation de polluants ou encore des effets sur la pathogénicité des bactéries (Brackman et al., **2011**; G et al., **1995**; Huang et al., **2016**; Jenal et al., **2017**). Dans ce dernier cas, *Staphylococcus aureus* est capable, par des mécanismes de Quorum Sensing induit par la production d'Octapeptide, de réguler l'expression de sa virulence.

Dans le cas des interactions intra-genres, des phénomènes d'antagonisme intra- ou inter-espèces peuvent conduire à une modification de la structuration de la communauté bactérienne et altérer son fonctionnement (figure I10) (Becker et al., 2012). Par exemple, dans le système racinaire d'une plante, un accroissement du nombre de partenaires bactériens du genre *Pseudomonas* peut conduire à une augmentation des relations antagonistes au sein de la communauté de *Pseudomonas* et conduire à une perte de la densité bactérienne et à l'effet protecteur pour une plante.

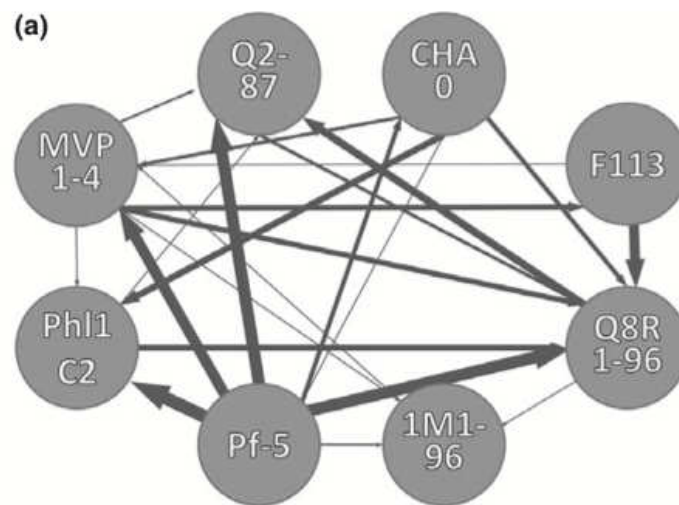


FIGURE I10 : INTERACTIONS ENTRE SOUCHES DE PSEUDOMONAS ISSUES D'UN MEME ENVIRONNEMENT (BECKER ET AL., 2012)

Les auteurs ont étudié les différentes relations d'antagonismes pouvant exister entre 8 souches de bactéries du genre *Pseudomonas* présents dans le sol. Ils ont mesuré l'inhibition des souches entre elles par des tests overlay. Chaque flèche représente l'inhibition de la souche indiquée par la flèche. La taille de la flèche est proportionnelle à l'intensité d'inhibition.

Enfin, des interactions inter-genres peuvent aussi avoir lieu entre par exemple des actinomycètes et des bactéries du genre *Bacillus*. Ces interactions font intervenir des mécanismes de formation de biofilms grâce notamment à la production de molécules biologiques tels que les surfactines produites par *Bacillus subtilis* en présence de *Streptomyces* MG1. Les mécanismes d'interaction font aussi appel à l'utilisation de molécules de signalisation. C'est le cas par exemple entre *Bacillus subtilis* et *Streptomyces griseus*. En effet, *Bacillus subtilis* produit la molécule de signalisation de la classe des gamma-butyrolactone « A-Factor » qui va induire la production de streptomycine chez *Streptomyces griseus* (Traxler et kolter, 2015).

COMMUNAUTES FONGIQUES

Le règne des champignons contient près de 1,5 millions d'espèces qui se retrouvent parfois dans un même environnement notamment le sol ou encore le microbiote d'animaux ou les océans (Zeilinger-Migsich and Mukherjee, **2014**).

Les interactions entre champignons comme les interactions entre bactéries peuvent être inter ou intra spécifiques. Les champignons sont capables de reconnaître un partenaire de la même espèce ainsi qu'un partenaire d'une autre espèce par des mécanismes d'attraction chimique ou encore de chemotaxis c'est-à-dire la mobilité du champignon en réponse à des stimuli chimiques (Lichius and Lord, **2014**).

Dans certains cas, cela peut conduire à des interactions antagonistes entre deux champignons. C'est le cas notamment du champignon du genre *Trichoderma* qui possède la faculté d'empêcher l'action d'autres champignons phytopathogènes par la mise en place de relations antagonistes (Sawant, **2014**) et la production de métabolites spécialisés (Vinale et al., **2014**). Toutes les interactions entre champignons ne conduisent pas à des mécanismes d'inhibition. Dans le cas des mycorhizes, certaines interactions sont mutualistes et conduisent à des échanges de nutriments, une protection contre les stress biotiques et abiotiques entre les champignons et la plante (Khare et al., **2018**; Perotto et al., **2013**).

De nombreuses interactions bactérie-champignon ont également été décrites. Ces interactions peuvent aller du mutualisme à l'antagonisme. Elles structurent les communautés microbiennes et impactent le fonctionnement de l'écosystème (Deveau et al., **2018**; Hassani et al., **2018**).

L'exemple du Lichen illustre l'établissement d'une symbiose entre des algues et/ou des cyanobactéries (appelé photobionte) avec des champignons pouvant être de la division des basidiomycètes (Rikkinen, **2003**). Cette formation résulte de la rencontre entre les deux partenaires dont le mécanisme de reconnaissance fait intervenir des lectines (Singh and Walia, **2014**). Le champignon fournit alors l'abri, les sels minéraux et l'humidité à son partenaire bactérien qui quant-à-lui fournit des nutriments issus de la photosynthèse comme le glucose. Une étude a montré qu'il existe également une importante diversité de cyanobactéries associées à la formation de lichens (Rikkinen, **2013**). Les lichens peuvent aussi abriter d'autres bactéries de différents phylla comme des alphaproteobactéries ou des actinobactéries (Bates et al., **2011**) ou des champignons parasites.

Les interactions bactérie-champignons s'établissent dans tous les compartiments de la plante, aussi bien les parties aériennes (ex. feuille) qu'au niveau racinaire (ex. rhizosphère, endosphère) (figure I11) et ne sont pas toutes symbiotiques (Hassani et al., **2018**).

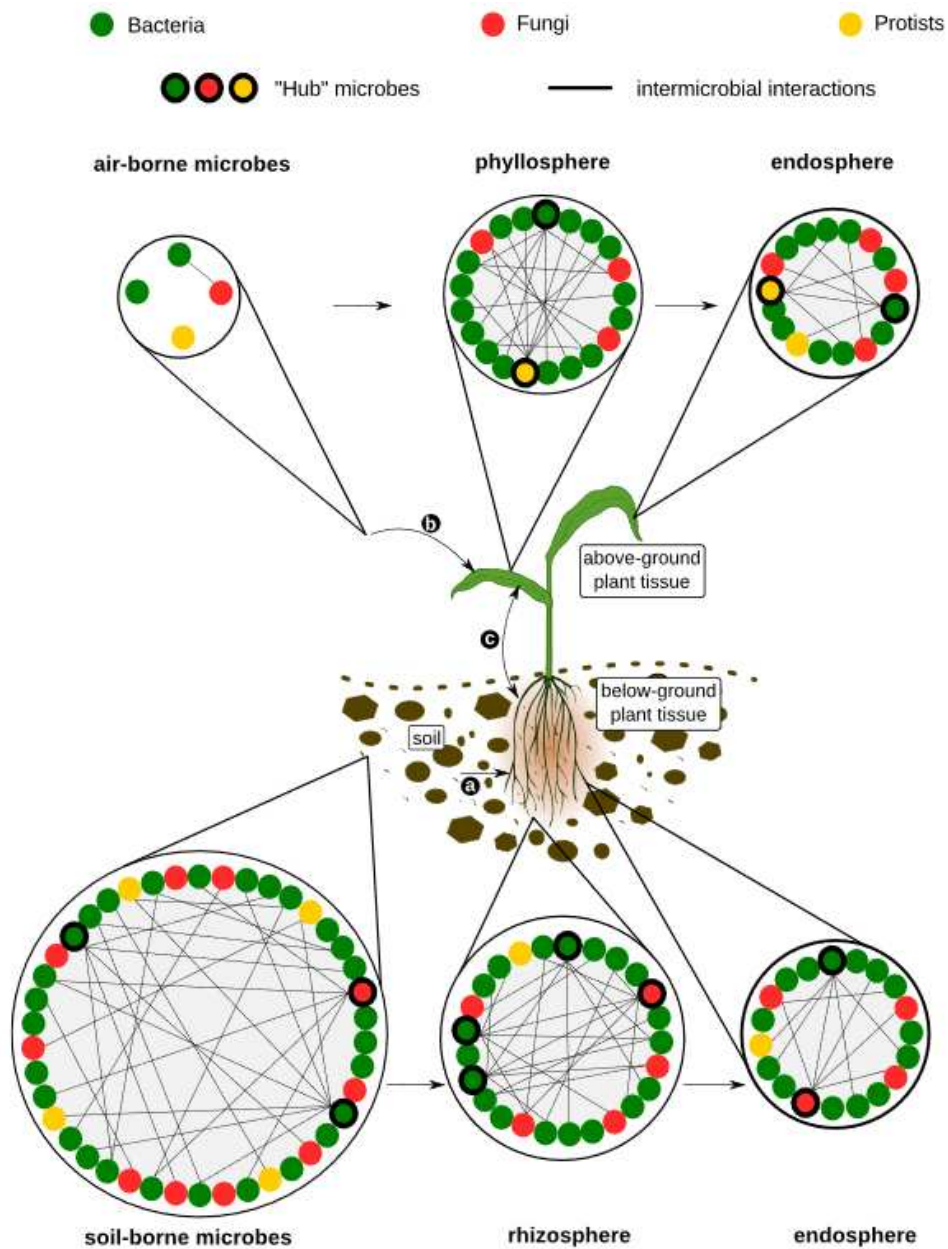


FIGURE I11 : RESEAUX DES DIFFERENTES INTERACTIONS MICROBIENNES PRESENTES DANS LE SOL (ADAPTEE DE HASSANI ET AL., 2018)

Dans cette figure, il est représenté les différentes interactions entre des bactéries, des champignons et des protistes. La présence d'un trait entre deux cercles de couleur traduit d'une relation antagoniste entre les deux organismes impliqués. Les cercles verts, jaunes et rouges indiquent respectivement les bactéries, les protistes et les champignons.

Par exemple dans le système racinaire de *Pinus sylvestris* , lorsque la bactérie *Streptomyces* Ach 505 est présente, celle-ci empêche sa colonisation par le champignon phytopathogène *Heterobasidion* (Lehr et al., **2008**; Tarkka et al., **2008**). Cette interaction entre bactérie et champignon conduit à une relation antagoniste ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte.

Dans certains cas, la bactérie va agir au sein même de champignon (bactéries endophytes). Par exemple, la présence de bactéries endophytes du champignon *Fusarium oxysporum* diminuent l'expression de gènes impliqués dans la virulence du champignon (Minerdi et al., **2008**).

L'ensemble de ces interactions reposent, par exemple, sur la production de métabolites spécialisés, notamment des antibiotiques qui pourront ensuite être exploités au laboratoire (Molloy and Hertweck, **2017**; Netzker et al., **2018a**)

DES INTERACTIONS MICROBIENNES A LA DECOUVERTE DE NOUVELLES MOLECULES BIOLOGIQUES

LA CO-CULTURE : MIMER LA NATURE AU LABORATOIRE

Comme décrit précédemment (paragraphe sur les stress biotiques) l'une des approches visant à induire la production de métabolites spécialisés repose sur l'utilisation de stress biotiques comme notamment la mise en œuvre de co-cultures de micro-organismes. Les résultats obtenus lors d'interactions inter-espèces, inter-genres et inter-règnes démontrent que mimer les interactions microbiennes au laboratoire permet d'induire la production de métabolites spécialisés (Bertrand et al., **2014**).

Par exemple, les *Streptomyces* peuvent interagir entre eux et avec d'autres genres bactériens tels que les Bacilles et conduire à la production d'une diversité importante de métabolites spécialisés (Traxler et al., **2013a**). Chez les champignons, l'interaction entre *Gloeophyllum abietinum* et *Heterobasidion annosum* et entre *Alternaria tenuissima* et *Nigrospora sphaerica* conduisent respectivement à la formation de composés de type polycétides et sesquiterpènes antibactériens et polycétides antifongiques (Chagas et al., **2013**; Sonnenbichler et al., **1994**).

Au niveau inter-règne, des interactions ont été décrites entre champignons et des bactéries de genres et d'espèces divers (*Bacillus subtilis*, *Sphingomonas sp.*, *Escherichia coli*, *Serratia sp.*, *Achromobacter sp.*, *Streptomyces*) (Bertrand et al., **2014**). Le champignon *Schizophyllum commune* instaure des interactions importantes avec des bactéries du sol qui aboutissent à la production d'une diversité importante de composés chimiques (Krause et al., **2020**).

Parmi les interactions *Streptomyces*/champignon, celles entre *Aspergillus nidulans* et *Streptomyces hygroscopicus*, par exemple, permet l'induction de la production de dérivés de polycétides aromatiques (figure I12) (Schroeckh et al., **2009**). Au cours de cette étude, il a été montré que l'interaction (figure I12-A) était corrélée à l'augmentation de l'expression de gènes présents dans une voie de biosynthèse de PKS (figure I12-B).

Quatre composés spécifiques sont induits lors de l'interaction (figure I12-C). Il s'agit de dérivés de l'acide orsenillique pour lequel une voie de biosynthèse candidate a également été proposée.

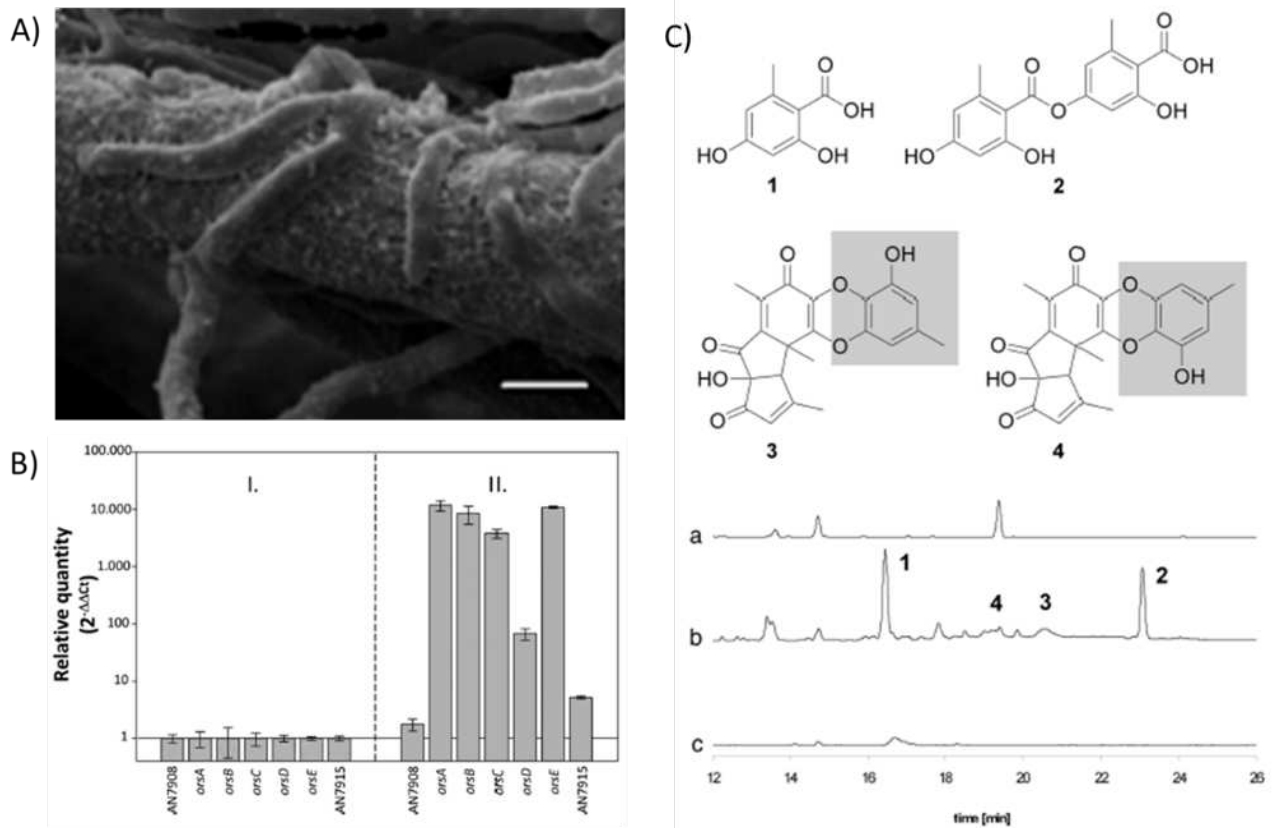


FIGURE I12 : ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE *ASPERGILLUS NIDULANS* ET *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* (ADAPTEE DE SCHROECK ET AL., 2009)

A) Observation par microscopie du contact cellulaire entre les deux organismes analysés. B) Mesure de l'expression de 7 gènes d'une voie de biosynthèses activée lors de l'interaction. C) Chromatogrammes et structures des 4 composés induits par l'interaction.

D'autres exemples de composés induits, principalement, lors d'interactions entre bactéries du genre *Streptomyces* et des champignons sont présentés ci-dessous (Tableau I5).

<i>Streptomyces</i>	Champignon	Composés	Activité	Références
<i>Streptomyces peucetius</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Alcaloïdes	Cytotoxique	Zuck et al., 2011
<i>Streptomyces rapamycinus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mero terpènes	Antimicrobienne	König et al., 2013
<i>Streptomyces bullii</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Lactames ; Dicétopiperazines, alcaloïdes	Trypanocide et leishmanicide et toxicité	Rateb et al., 2013
<i>Streptomyces Ach505</i>	<i>Heterobasidion abietinum</i>	Dérivé de l'acide salicylique	Antifongique	Lehr et al., 2009
<i>Streptomyces albospinus</i> Rle7	<i>Phomopsis</i> sp. FLe6	Furanes, alcaloïdes, mono-méthyle éther	Antifongique	Chagas and Pupo, 2018

TABLEAU I5 : EXEMPLES DE MOLECULES INDUITES PAR DES INTERACTION ENTRE *STREPTOMYCES* ET CHAMPIGNONS

LA METABOLOMIQUE : DETECTER L'INDUCTION DE NOUVEAUX COMPOSES

Comme l'a illustré l'exemple précédent, les progrès de la chimie analytique tels que les méthodes chromatographiques (en phase liquide ou en phase gazeuse) couplées à des détecteurs comme la spectrométrie de masse permettent de mettre en évidence la production de nouveaux composés lors des interactions microbiennes (. Ces méthodes visant à étudier l'ensemble des métabolites cellulaires quels que soient les composants biologiques et les organismes ont été développées dans les années 1940 par Roger Williams : c'est la naissance de la métabolomique (Vinayavekhin and Saghatelian, **2010**). La définition la plus simple de la métabolomique est l'étude des métabolites cellulaires par la chimie analytique. Elle regroupe de nombreux domaines allant de la biochimie, la chimie analytique, les bio-statistiques et la bio-informatique.

Le métabolome d'organismes soumis à des stress abiotiques ou biotiques est étudié dans le but de mettre en évidence des molécules d'intérêt pour l'humain et/ou la compréhension des mécanismes sous-jacents. Ces molécules constituent des biomarqueurs de certaines maladies pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, des produits de transformation de molécules afin d'évaluer leur toxicité à des nouvelles biomolécules d'intérêts pharmaceutique par exemple (Azzollini et al., 2018; Baidoo and Teixeira Benites, 2019; Wu et al., 2015). Cette approche peut être ciblée si les molécules impliquées sont déjà connues et/ou caractérisées ou non ciblées lorsque les marqueurs ne sont pas prédéfinis ou les molécules non identifiées (Jacob et al., 2018; Lanfear et al., 2017). Cette méthode repose sur un workflow bien déterminé notamment pour la recherche de nouvelles biomolécules par une approche non ciblée (figure I13) (Nalini Kanta et al., 2020).

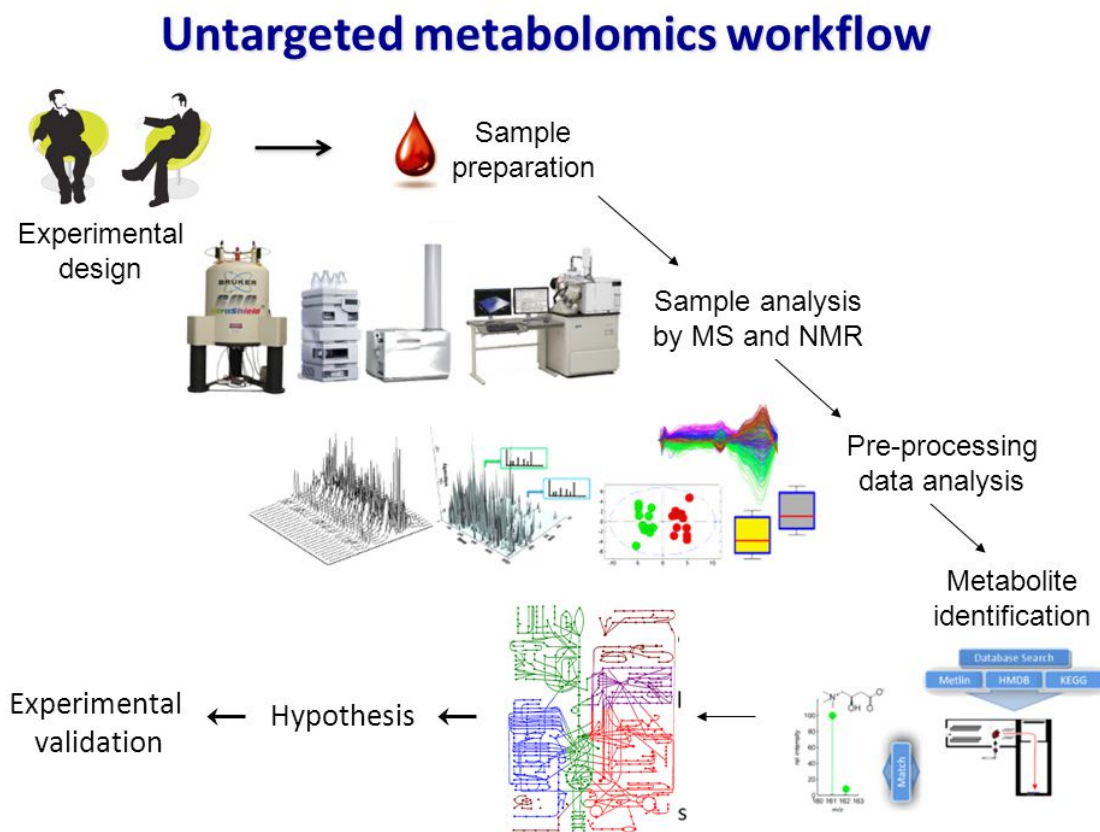


FIGURE I13 : DEMARCHE GENERALE POUR LA METABOLOMIQUE NON CIBLEE (NALINI KANTA ET AL., 2020)

Après la préparation des échantillons, leur analyse par des techniques de chimie analytique et le prétraitement des données, les résultats obtenus peuvent être analysés par des méthodes statistiques multivariées pour mettre en évidence des « features » d'intérêt. Ces analyses vont de la simple représentation des données par une analyse par composante principale à des analyses discriminantes comme la « Partial Least Square – Discriminant analysis ».

Ces analyses peuvent être utilisées pour mettre en évidence des molécules pertinentes en lien avec un phénomène biologique comme la différence d'expression du métabolome entre biofilms et bactéries planctoniques ou la variation d'expression du Quorum Sensing (Favre et al., **2018** ;Tourneroché et al., **2019**). Dans le cas d'une variation de l'expression du Quorum Sensing (Figure I14) , les auteurs ont observé une différence d'expression du Quorum Sensing grâce au suivi de fluorescence de Vibrio (traduit la présence de molécules induisant le QS) en présence d'extraits ou d'isolats bactériens en absence et lors de co-cultures entre bactéries et champignons marins (figure I14-A). Grâce à un outil statistique, les profils métaboliques des souches en interaction ont été corrélés avec la modification d'expression du Quorum Sensing (Figure I14-B). Les profils métaboliques ont été représentés sous forme de heat-map et ont mis en évidence la pertinence de 10 features (figure I14-C). L'analyse de la production de ces ions a montré des différences dans l'expression du métabolome entre les cultures simples et les co-cultures (figure I14-D).

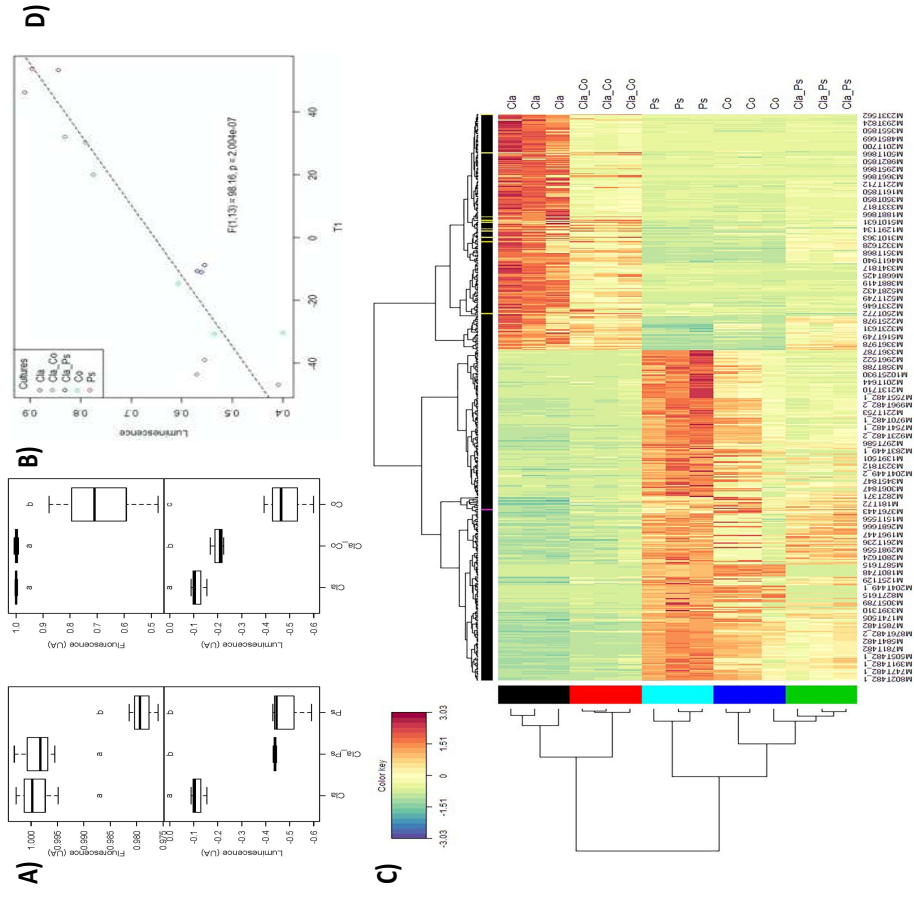
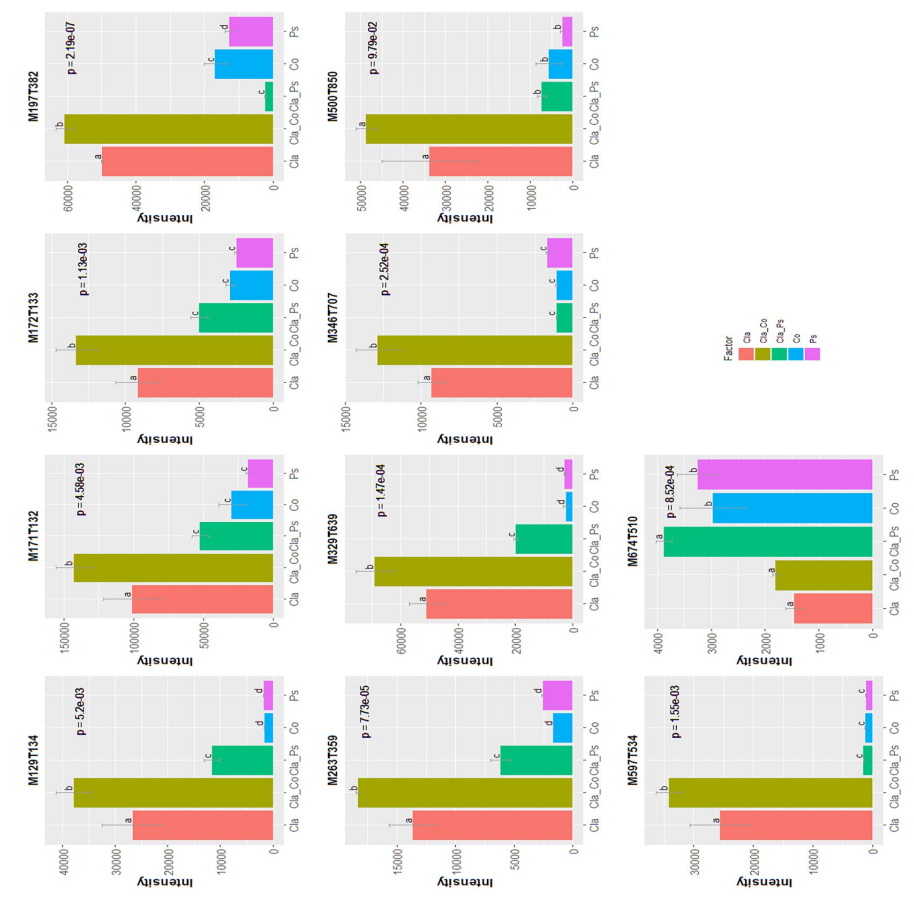


FIGURE 14 : LA METABOLOMIQUE PERMET DE FAIRE UN LIEN ENTRE UN PHENOMENE BIOLOGIQUE ET LES PROFILS METABOLIQUES POUR L'IDENTIFICATION DE MOLECULES/IONS IMPORTANTS (ADAPTEE DE TOURNEROC ET AL., 2019)

A) Mesure de la viabilité et de l'expression du QS par *Vibrio* en présence d'extraits bactériens et fongique et de leur co-culture. B) Analyse statistique permettant le lien entre l'expression du QS et le métabolome. C) Heat-map représentant les métabolomes des différentes conditions. D) 10 features permettant d'expliquer les différences d'expression du QS observée.

La détection de la production des composés induits lors d'interactions peut être directement détectée in situ grâce à l'imagerie par spectrométrie de masse (Bertrand et al., 2014). L'identification formelle des composés est difficile à réaliser. En effet, l'identification nécessite des techniques supplémentaires (Isolation du ou des composés, RMN, analyses des spectres de masse) et demande beaucoup de temps (Wu et al., 2015). Il existe donc des méthodes pour accélérer et éviter la redondance de la découverte de molécules déjà connues.

LA DEREPLICATION : ACCELERER LE PROCESSUS D'IDENTIFICATION DE CES COMPOSES

La déréplication est une démarche utilisée pour éviter la redécouverte de molécules déjà connues ou accélérer la recherche de nouveaux composés. Il existe plusieurs méthodes de déréplication dont les démarches sont résumées dans la figure suivante (Figure I15) (Hubert et al., 2017).

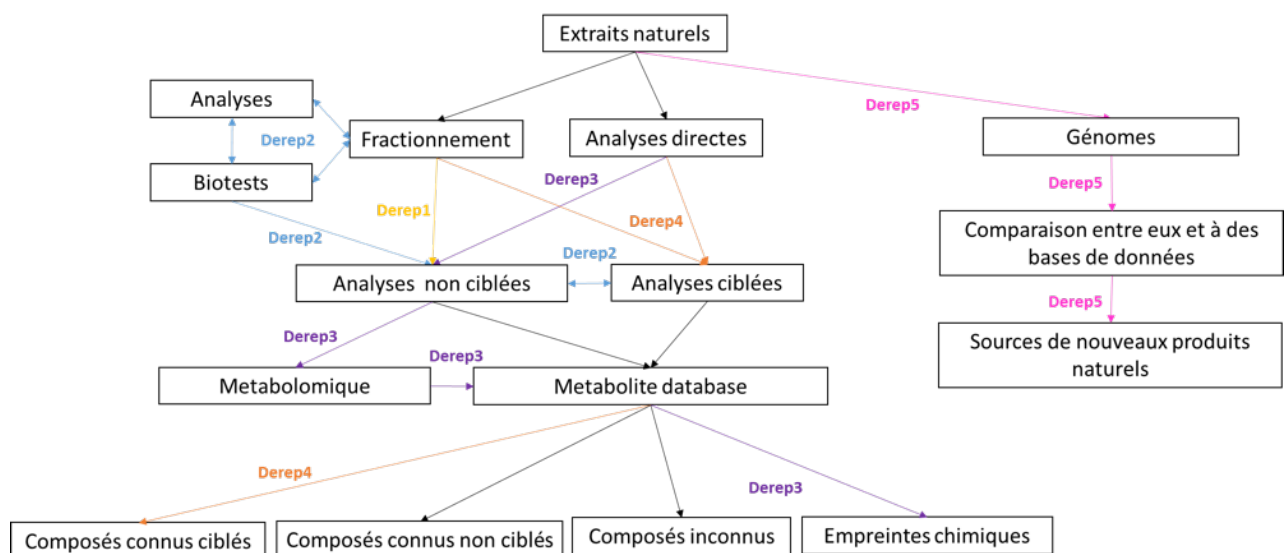


FIGURE I15 : DIFFERENTS MODES DE DEREPLICATION DE MOLECULES

Les études de métabolomique suivent généralement le même schéma stratégique (workflow) avec comme point de départ les analyses chimiques d'extraits naturels et une phase d'acquisition des données (chimie analytique) puis une fouille des bases de données *ad hoc* qui peut permettre l'identification de molécules connues ou confirmer l'originalité du(des) composé(s) obtenu(s). Ce processus peut différer selon les méthodes de déréplication utilisées, et ce en 4 catégories.

Certaines de ces méthodes sont « ciblées » c'est-à-dire que les molécules recherchées sont connues (Derep4). C'est le cas dans les recherches de molécule de type pyrrolles amides chez *Streptomyces* ou de surfactines chez *Bacillus* (Hao et al., 2014; Juola et al., 2014). Parfois, le but est de caractériser une collection d'extraits naturels par une approche métabolomique pour l'obtention d'empreintes chimiques (derep3). Cette approche est utilisée pour obtenir des souches pertinentes pour de futures analyses ou d'identifier des conditions de culture optimales pour l'expression de métabolites (Abdelmohsen et al., 2014; Macintyre et al., 2014).

Des méthodes existent également en couplant le fractionnement guidé (ou non) par la bio-activité. Elles ont pour objectif d'identifier le composant majoritaire d'une fraction et savoir si les molécules sont originales ou non (derep 1 et 2). Le tableau suivant résume des exemples de molécules obtenues par ces approches (Tableau I6).

Method	Molecules (source)	Activité	Référence
Derep1	4 macrotétrolidés et 3 dérivés linéaires de <i>Streptomyces</i> sp.	/	(Crevelin et al., 2014)
Derep1	3 Naphtocoumarines (2 connues et 1 inconnue) de <i>Streptomyces sporoverrucosus</i>	/	(Jain et al., 2013)
Derep2	Dérivés de l'acide benzoïque de <i>Xyloria</i> sp. champignon endophyte de <i>Ficus pumila</i>	Antimicrobiens contre des pathogènes humains et phytopathogènes	(Rakshith et al., 2013)
Derep2	Ophiobolines extraits les plus actifs de 7 champignons de la division des ascomycètes sur 289 analysés	Activités contre les cellules leucémiques	(Bladt et al., 2013)

TABLEAU I6 : MOLECULES DETECTEES PAR DES METHODES DE DEREPlication DE TYPE DEREP1 ET DEREP2

Les bases de données utilisées comprennent 903 141 composés connus réparties dans 9 bases de données différentes (Wang et al., **2016**). Le nombre molécules décrites dans les bases de données est en constante évolution et fait appel à la participation de la communauté scientifique pour les compléter. Parmi elles, une base de données intéressante qui contenait près de 200.000 composés à sa sortie est la base de données GNPS qui peut également être utilisée pour faire des réseaux métaboliques qui organisent les molécules en clusters et permettent ainsi l'identification de composés déjà connus ou encore collectent des informations sur la structure de molécules nouveaux (Wang et al., **2016**).

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de la thèse est d'induire la production de molécules actives par l'utilisation des interactions bactéries/champignons puis de les identifier par une approche métabolomique. L'hypothèse de travail est que les interactions biotiques établies dans la nature et mimées au laboratoire conduisent à l'induction de nouvelles molécules bioactives.

Les communautés microbiennes forment des réseaux d'interaction complexes et il est difficile de les étudier au laboratoire. Un autre point verrou est que seul environ 1% des micro-organismes du sol sont cultivables au laboratoire. Il est donc difficile d'avoir une vision globale des interactions, et donc de la diversité fonctionnelle des métabolites spécialisés produits par les micro-organismes du sol ainsi que des signaux qui permettent/induisent leur production. Pour comprendre, *a minima*, les mécanismes des interactions microbiennes notamment entre micro-organismes appartenant à des règnes différents, nous nous sommes focalisés sur des interactions bi-partites entre bactéries du genre *Streptomyces* et des champignons.

Dans un premier temps, les souches bactériennes sélectionnées ont été étudiées par une approche génomique couplée à une analyse métabolomique par chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse. Les génomes de référence (présents sur les bases de données NCBI ou JGI) des basidiomycètes sélectionnés ont également été analysés pour leur capacité à produire de métabolites spécialisés.

Au laboratoire, ces deux types de micro-organismes, bactéries du genre *Streptomyces* et champignons de la division des basidiomycètes requièrent des conditions de culture différentes. L'extraction des métabolites potentiellement induits par l'interaction microbienne est fortement influencée par le choix du solvant et la méthode d'extraction. La seconde étape de ce travail a été d'étudier les co-cultures entre micro-organismes par l'utilisation d'un criblage selon l'activité antimicrobienne des molécules extraites élicitées par l'interaction.

Les activités potentielles des métabolites produits lors des interactions seront ensuite recherchées. L'activité antibiotique sera recherchée par un criblage basé sur l'inhibition de la croissance de *Bacilli* (souches de collection ou environnementales) ou d'autres espèces bactériennes. Afin d'identifier le ou les composés responsables de l'activité, une approche métabolomique couplée à des outils de dérégulation sera mise en place. Des tests destinés à identifier des activités anti-inflammatoires et antioxydants seront également mis en œuvre pour exploiter au mieux la diversité des composés induits par les interactions microbiennes.

Ce projet de recherche a été financé par le projet Impact Biomolécule porté par Lorraine Université Excellence. Ce programme vise à valoriser de nouvelles molécules, leur vectorisation et leurs activités. Mes travaux de thèse se sont inscrits dans le *workpackage* dont l'objectif est d'exploiter les interactions microbiennes pour découvrir de nouvelles molécules bioactives.

PARTIE 2 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE R1 : STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE, DE SELECTION ET
SEQUENÇAGE GENOMIQUE DE 8 SOUCHES DE *STREPTOMYCES* A UNE
MICRO-ECHELLE

Genome Sequences of Five *Streptomyces* isolated from a community at microscale

Matthieu Nicault, Abdoul Razak Tidjani, Eric Gelhaye, Cyril Bontemps, and Pierre Leblond

Article 1 : Publié dans **Microbiology Ressources Annoncements** le 04/06/2020

RESUME DES RESULTATS EN FRANÇAIS :

Dans ce premier chapitre, l'approche, la stratégie et les techniques utilisées pour le séquençage de 5 souches de *Streptomyces* sont décrites. Ces souches sont issues d'une collection de 129 souches présente au sein du laboratoire Dynamic. L'isolement de ces souches a été décrit dans les thèses de Maxime Toussaint et d'Abdoul-Razak Tidjani (figure R16).

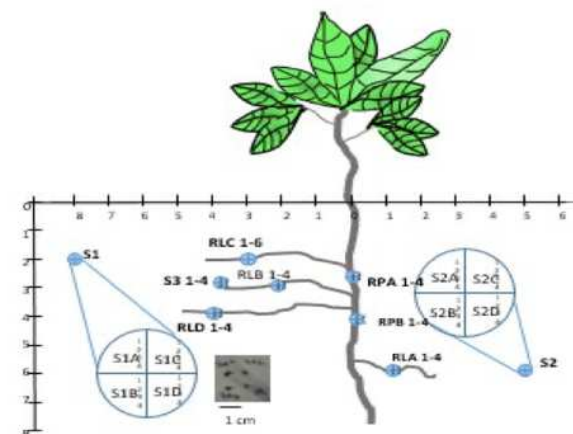


FIGURE R16 : STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE DES SOUCHES DE LA COLLECTION (TIREE DE LA THESE D'ABDOUL-RAZAK TIDJANI, 2019)

Les souches de *Streptomyces* de la collection ont été prélevés à 9 endroits différents auprès du système racinaire d'un jeune plant de Hêtre dans la forêt de Montier-sur-Sault. Ils ont été prélevés au sein de 2 endroits de la racine principale (RP1 et RP2), aux 4 racines latérales (RLA, RLB, RLC et RLD) et dans 3 sols nus plus ou moins éloignés du système racinaire de la plante (S1, S2 et S3).

Pour la réalisation de ces travaux, 8 souches ont été sélectionnées dont 3 ont vu leur génome séquencé (Tidjani et al., **2019a**). Les travaux de thèse de Maxime Toussaint ont révélé que ces 8 souches appartiennent à 4 groupes phylogénétiques distincts dont le pourcentage d'identité nucléotidique varie de 97,1% à 99,5%.

Pour notre étude, ces souches ont été sélectionnées sur la base de leur activité antimicrobienne. Deux types d'activités avaient été étudiées lors de la thèse de Maxime Toussaint, (i) contre des souches indicatrices classiques couramment utilisées au laboratoire (*E. coli*, *B. subtilis*, *M. luteus*) et (ii) contre d'autres souches issues de la même collection et du même genre. Cette dernière activité reflète la capacité « super-killer » des souches qui a été décrite comme la capacité à inhiber la majeure partie des souches indicatrices utilisées (Schlatter and Kinkel, **2015**). Cette activité « super-killer » permet de comprendre les interactions, notamment antagonistes, au sein d'une communauté et de comprendre comment elle se structure. Les résultats obtenus pour les tests d'inhibition contre les souches indicatrices et en interactions inter-espèces sont résumés Table R7 et figure R17.

	B.s	E.c	M.l
<i>RLB1-8</i>	+	-	+
<i>RLB1-9</i>	+	-	+
<i>RLA2-12</i>	-	-	-
<i>RLB1-33</i>	-	-	-
<i>RPA4-2</i>	-	-	-
<i>RPA4-5</i>	+	-	-
<i>S1D4-11</i>	+	-	+
<i>S1D4-23</i>	+	-	+

TABLEAU R7 : INHIBITION DE 3 SOUCHES INDICATRICES PAR LES 8 SOUCHES DE STREPTOMYCES (TIRES DE LA THESE DE MAXIME TOUSSAINT, 2018)

Lors de la thèse de Maxime Toussaint, des test biologiques antimicrobiens ont été réalisés pour les 8 souches de Streptomyces contre trois souches indicatrices : *Bacillus subtilis* (B.s), *Escherichia coli* (E.c) et *Micrococcus luetus* (M.l). Les + indiquent une zone d'inhibition de croissance de la souche indicatrice, les moins indiquent aucune zone d'inhibition.

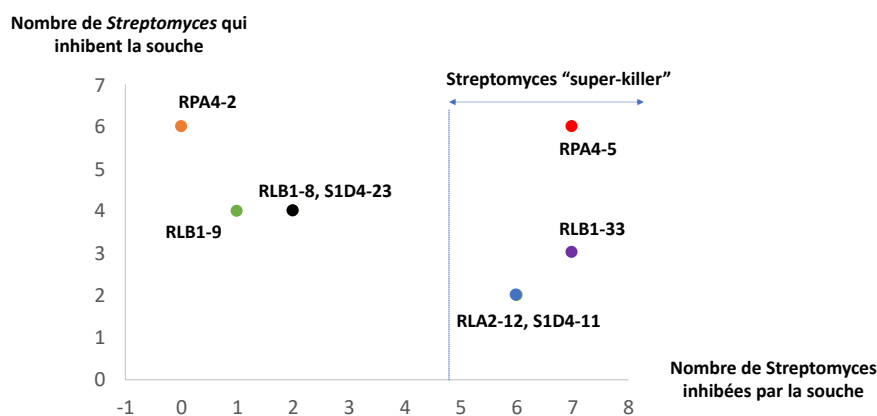


FIGURE R17 : CAPACITE D'INHIBITION DES SOUCHES ISSUES DE LA MEME COLLECTION PAR LES BACTERIES DU GENRE STREPTOMYCES (TIRETIREE DE LA THESE DE MAXIME TOUSSAINT)

Au cours de ce même travail de thèse, les interactions inter-espèces entre les différentes souches de la collection ont été étudiées. La capacité d'inhibition de la croissance et/ou de la sporulation de ces souches est représentée.

Ces résultats démontrent une diversité fonctionnelle de ces 8 souches. Certaines souches ne présentent aucune activité contre des souches indicatrices (RPA4-2) alors que d'autres présentent une activité de « super killer ». De plus, des souches proches génétiquement peuvent présenter des profils antimicrobiens différents. Cette diversité pourrait être liée au métabolisme spécialisé ainsi qu'aux voies de biosynthèse associées.

Les génomes des 5 souches de *Streptomyces* manquantes ont donc été séquencées en utilisant deux techniques : Nanopore et Illumina. Les séquences finales ont été obtenues en alignant les séquences obtenues en illumina aux contigs obtenus en Nanopore. Tous les génomes sont en un seul contig sauf RPA4-5 obtenus en deux contigs et qui a été assemblé pour la suite.

Ces résultats sont présentés dans l'article suivant publié dans Microbial Resources Announcement



Genome Sequences of Five *Streptomyces* Strains Isolated at Microscale

Matthieu Nicault,^{a,b} Abdoul-Razak Tidjani,^a Eric Gelhaye,^b Cyril Bontemps,^a Pierre Leblond^a

^aUniversité de Lorraine, INRA, DYNAMIC, Nancy, France

^bUniversité de Lorraine, INRA, IAM, Nancy, France

ABSTRACT The genomes of five *Streptomyces* strains belonging to the same soil community were sequenced and assembled. The strains, which were isolated at microscale, belonged to different *Streptomyces* species. This sample provides access to understand the functioning of a *Streptomyces* community in an ecological context.

Streptomyces organisms are soil-dwelling bacteria that play a central role in soil homeostasis (biogeochemical cycle and biotic interactions) (1). Their large linear chromosomes code for a wide variety of specialized metabolites (e.g., antibiotics and antifungals) and enzymes of high biotechnological and medical interest (2, 3). Here, we report the genome sequences of five *Streptomyces* strains isolated from four grains of soil. These grains had a size on the order of cubic millimeters and were collected at a distance of a few centimeters from each other in a French forest soil. Each grain was diluted in sterile water and serially diluted on *Streptomyces* isolation medium (4). The five selected strains had mycelial and sporulating phenotypes. After isolation and purification, spores were inoculated in Hickey-Tresner broth medium (30°C for 30 h), from which genomic DNA was extracted and purified (5). This procedure included a proteinase K treatment and a chloroform extraction step in order to remove the covalently bound terminal protein (6). An assembly was generated from Oxford Nanopore single reads using Canu (v1.7.1). Sequencing was carried out using the sequencing kits SQK-LSK109 and EXP-NBD104, the flow cell FLO-MIN106 (R9.4.1 revD) on the GridION system (v3.1.8), and the base-calling program Guppy (v2.0.8). When strains were multiplexed, Porechop (v0.2.4) was used for demultiplexing (and adaptor trimming). The coverage ranged from 73× to 322×. One large contig covering the whole genome of each strain was obtained (except for RPA4-5, for which two contigs were obtained). A circular extrachromosomal element of about 67 kb was predicted for strain RLA2-12. Illumina paired-end libraries (35 to 51 bp) were created from genomic DNA fragments using the NextSeq 500/550 high-output kit v2 (75 cycles) with the Westburg next-generation sequencing (NGS) DNA library preparation kit (Illumina TruSeq LT primers) (Table 1). Paired-end reads were generated using an Illumina NextSeq instrument (vNB552053). The minimum read size was set to 10 bp, and adaptor trimming was performed using Cutadapt (v1.15). The coverage of the paired-end reads varied between 50× and 90×. The final genome sequences were obtained by aligning the Illumina sequences to the Nanopore reference contigs using Pilon (v1.22) (7). Default parameters were used for all software. The total genome sizes, including extrachromosomal DNA when present, ranged from 9.04 Mb to 12.27 Mb, positioning the latter among the largest bacterial sequenced genomes (8) (Table 1). Although public annotation was performed using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (9), we performed an annotation step using the RAST tool kit (RASTtk) (10, 11) and antiSMASH (12, 13) to predict the specialized metabolism repertoire. This showed that the sample had a large potential for synthesis, with 157 gene clusters. The strain RLA2-12 belonged

Citation Nicault M, Tidjani A-R, Gelhaye E, Bontemps C, Leblond P. 2020. Genome sequences of five *Streptomyces* strains isolated at microscale. *Microbiol Resour Announc* 9:e00428-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00428-20>.

Editor David A. Baltus, University of Arizona

Copyright © 2020 Nicault et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Pierre Leblond, pierre.leblond@univ-lorraine.fr.

Received 28 April 2020
Accepted 18 May 2020

Published 4 June 2020

TABLE 1 Genome features, sequencing statistics, and accession numbers for the five *Streptomyces* isolates

Strain (replicon)	Data for Illumina sequencing ^a		Data for Oxford Nanopore sequencing ^b		Replicon size (bp)	Genome size (bp)	Total no. of CDSs ^c	GC content (%)	GenBank accession no.
	No. of reads (coverage [×])	SRA accession no.	No. of reads (coverage [×])	SRA accession no.					
RLA2-12 (pRLA2-12.1C) ^d	21,079,784 (83)	SRX8039999	269,118 (175)	SRX8039129	10,825,588 (67,358)	10,892,946	10,116	70.3	JABAQ000000000
RLB1-33	14,156,938 (50)	SRX8040000	477,335 (222)	SRX8039130	12,127,650	12,127,650	11,381	70.0	CP050974
RPA4-2	19,808,024 (86)	SRX8040001	231,331 (165)	SRX8039131	9,856,149	9,856,149	9,287	70.9	CP050975
RPA4-5	19,657,766 (93)	SRX8040002	97,134 (73)	SRX8039132	9,047,156	9,047,156	9,260	70.9	CP050976
S1D4-11	15,509,220 (53)	SRX8040003	180,498 (107)	SRX8039133	12,276,515	12,276,515	12,065	69.9	CP051010

^a Illumina libraries were generated using the universal TruSeq LT adapter 5'-AATGATACGGGACCCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' and the index adapter 5'-GATCGGAAGAGCACACTGTGAACTCCAGTCAC(index)ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'.

^b Nanopore adaptor sequences are not available and were automatically trimmed during base calling.

^c As determined through RAST automatic annotation. CDSs, coding sequences.

^d C indicates the circular configuration of the replicon, as predicted by the assembling.

to a previously isolated cluster of strains (identical 16S rRNA gene sequences) (8, 14) that was closely related to *Streptomyces olivochromogenes* DSM 40451 (99.9% identity in 16S rRNA gene sequences) (15). The strains RLB1-33, RPA4-2, and S1D4-11 and *Streptomyces mirabilis* C5SP107 exhibited identities of 99.9% to 99.2% in their 16S rRNA genes, indicating that they might belong to the same species or constitute sister species. While these strains belong to the large *Streptomyces* clade II described by McDonald and Currie (16), strain RPA4-5 was closely related to *Streptomyces platensis* ATCC 23948 (identical 16S rRNA genes), which belongs to the third, unstructured "other" species group. These results indicate that closely related strains and distant *Streptomyces* species coexist in the same microhabitat.

Data availability. Genome sequences and sequence reads (Illumina and Nanopore technologies) are available at GenBank and at the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under the accession numbers listed in Table 1.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the French National Research Agency (ANR LABEX ARBRE grant ANR-11-LABX-0002-01), by the French National Institute for Agricultural Research (INRA), and by Région Lorraine (now called Région Grand Est).

REFERENCES

- Bontemps C, Toussaint M, Revol PV, Hotel L, Jeanbille M, Uroz S, Turpault MP, Blaudez D, Leblond P. 2013. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. *FEMS Microbiol Lett* 342:157–167. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12126>.
- Thibessard A, Leblond P. 2014. Subtelomere plasticity in the bacterium *Streptomyces*, p 243–258. In Louis EJ, Becker MM (ed), *Subtelomeres*. Springer, Berlin, Germany.
- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2015. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311:374–377. <https://doi.org/10.1126/science.1120800>.
- Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood D. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol* 10:923–933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00964.x>.
- Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng Q, Wortman J, Young SK, Earl AM. 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9:e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>.
- Tidjani AR, Lorenzi JN, Toussaint M, van Dijk E, Naquin D, Lespinet O, Bontemps C, Leblond P. 2019. Massive gene flux drives genome diversity between sympatric *Streptomyces* conspecifics. *mBio* 10:e01533-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01533-19>.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. *Nucleic Acids Res* 44:6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
- Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomason JA, III, Stevens R, Vonstein V, Wattam AR, Xia F. 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* 5:8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>.
- Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Brucoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Muller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH. 2015. antiSMASH 3.0: a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* 43:W237–W243. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv437>.
- Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene

- clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39:W339–W346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>.
14. Tidjani AR, Lorenzi JN, Toussaint M, van Dijk E, Naquin D, Lespinet O, Bontemps C, Leblond P. 2019. Genome sequences of 11 conspecific *Streptomyces* sp. *Microbiol Resour Announc* 8:e00863-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00863-19>.
 15. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
 16. McDonald BR, Currie CR. 2017. Lateral gene transfer dynamics in the ancient bacterial genus *Streptomyces*. *mBio* 8:e00644-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00644-17>.

CHAPITRE R2 : ÉTUDE DU POTENTIEL DE PRODUCTION DES
METABOLITES SPECIALISES D'UNE COMMUNAUTE DE *STREPTOMYCES* DU
SOL

Mining the Biosynthetic Potential for Specialized Metabolism of a Streptomyces Soil Community

Matthieu Nicault, Abdoul-Razak Tidjani, Anthony Gauthier, Stéphane Dumarçay, Eric Gelhaye, Cyril Bontemps and Pierre Leblond

Article 2 : Publié dans **MDPI Antibiotics** le 23/05/2020

RESUME DES RESULTATS:

Ce deuxième chapitre a pour objectif de caractériser le potentiel de production de métabolites spécialisés au sein d'une communauté de bactéries du genre *Streptomyces* issues du sol. Ces souches ainsi que leur génome ont été analysés (i) par une approche de génomique comparative, une étude phénotypique (tests anti-microbiens) et une approche métabolomique pour évaluer leur potentiel de production de métabolites spécialisés et (ii) seront utilisés lors de co-cultures avec des champignons basidiomycètes pour éliciter l'activation de certaines des voies de biosynthèses préalablement identifiées et dirigeant la biosynthèse des métabolites spécialisés ayant une activité antimicrobienne.

Dans un premier temps, les 8 souches de *Streptomyces* ont été caractérisées phylogénétiquement par une analyse de séquences multi-locus à partir de 5 gènes. Les résultats obtenus basés sur la séquence d'ARNr 16S ont montré que 7 de ces 8 souches appartenaient au clade 2 du genre selon la classification de Currie et McDonald. Les souches RLB1-8, RLB1-9, S1D4-24 et RLA2-12 possèdent un gène ARNr 16S identique et une analyse MLSA a montré très peu de variabilité, indiquant que ces souches sont proches et appartiennent à la même espèce. RLB1-33 est proche de *S. avermitilis* tandis que RPA4-2 et S1D4-11 forment un groupe frère. La souche RPA4-5 quant à elle appartient au groupe « others » de cette classification et est taxonomiquement éloignée des autres. Cette dispersion phylogénétique a ensuite été confirmée par l'analyse de la moyenne d'identité nucléotidique (ANIb).

Des tests antimicrobiens ont été réalisés contre des souches indicatrices issues du même environnement appartenant ou non au genre *Streptomyces*. Une importante disparité d'activités antimicrobiennes a été observée.

En effet, certaines souches comme S1D4-11 et RPA4-5 sont capables d'inhiber la quasi-totalité des souches indicatrices alors que d'autres comme RLB1-33, RLB1-8 et RLA2-12 présentent peu d'activité. En comparant deux souches phylogénétiquement proches, leur profil antimicrobien s'est avéré être totalement différent. Par exemple, RLB1-9 inhibe quelques souches tandis que RLB1-8 n'en n'inhibe aucune. Ces résultats peuvent être expliqués par un potentiel différent de la production de métabolites spécialisés.

Dans le but d'estimer le potentiel de production de ces souches par la détection *in silico* des gènes putatifs codants les voies de biosynthèses de métabolites spécialisés, une analyse AntiSMASH a été effectuée. Cette analyse bio-informatique a révélé la présence potentielle de 25 à 36 voies de biosynthèse par souche pour un total de 261. Ces voies de biosynthèses codent pour des enzymes de type Polyketide synthetase (PKS), Non Ribosomal peptide synthetase (NRPS), des voies hybrides PKS/NRPS, des peptides synthétisés par le ribosome et modifiée post-traductionnellement (RiPPs) et des terpènes. Les voies qui n'appartiennent pas aux types de voies décrites précédemment sont classés dans autres. Sur l'ensemble des voies de biosynthèse détectées, seules 68 possèdent une similarité significative avec une voie préalablement identifiée (identité > 70%). Les 193 voies restantes pourraient être la source de nouveaux produits jamais identifiés jusqu'à présent.

Pour évaluer le potentiel réel de production de l'ensemble de ces souches, il est important de considérer la conservation pouvant exister au sein des souches de la même communauté. Pour cela, un réseau d'identité des régions codantes des voies de biosynthèse a été construit sur la base de la similarité pouvant exister entre chacune d'entre-elles. Sur les 261 voies de biosynthèses détectées, il existe en réalité 93 familles uniques dont 53 sont spécifiques d'une souche de *Streptomyces*. Seules 5 voies de biosynthèses sont partagées entre les 8 souches. Ces 5 voies codent pour des enzymes impliquées dans la synthèse de métabolites importants pour l'adaptation de ces bactéries dans leur environnement comme par exemple la desferioxamine impliquée la captation du fer dans le milieu. Concernant la spécificité des voies, plus la souche est éloignée phylogénétiquement plus elle possède des voies spécifiques.



Ce phénomène est expliqué par le gain et la perte de gènes notamment liés à l'important flux de gènes au niveau des bras chromosomique qui augmente d'autant plus avec la distance phylogénétique de la bactérie du genre *Streptomyces*. De plus, cette spécificité est principalement observée sur les bras du chromosome des souches analysées. Tandis que les gènes conservés se retrouvent principalement vers la partie centrale du chromosome.

Pour continuer cette caractérisation de ces souches, une étude métabolomique par GC-MS a été réalisée. Cette étude a montré que plus de 97% des features détectées (n initial = 5945) étaient partagés au minimum par deux souches. Parmi les métabolites spécifiques d'une souche, 8 métabolites ont été identifiés dont 6 appartiennent au métabolisme primaire et les deux autres pourraient être la base de molécules antimicrobiennes. Ces résultats suggèrent que les gènes codant les voies du métabolisme spécialisé sont silencieux dans les conditions testées lors de cette étude.

Le potentiel de production de métabolites spécialisés est donc très divers chez ces souches de *Streptomyces* isolés du même micro-habitat. Une large part des voies de biosynthèses semble spécifique et/ou non identifiée et pourrait être un réservoir important pour la découverte de nouvelles molécules d'intérêt. Néanmoins, l'approche métabolomique a montré que ce potentiel n'était pas forcément exprimé dans les conditions utilisées. Il est donc important de trouver des moyens d'activation de ces molécules comme par exemple la co-culture entre micro-organismes.

Article

Mining the Biosynthetic Potential for Specialized Metabolism of a *Streptomyces* Soil Community

Matthieu Nicault^{1,2}, Abdoul-Razak Tidjani¹, Anthony Gauthier¹, Stéphane Dumarçay³ ,
Eric Gelhaye², Cyril Bontemps¹ and Pierre Leblond^{1,*} 

¹ Université de Lorraine, INRAE, DynAMic, F-54000 Nancy, France; matthieu.nicault@univ-lorraine.fr (M.N.);
abdoul-razak.tidjani@univ-lorraine.fr (A-R.T.); anthony.gauthier@inra.fr (A.G.);
cyril.bontemps@univ-lorraine.fr (C.B.)

² Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France; eric.gelhaye@univ-lorraine.fr

³ Université de Lorraine, INRAE, LERMAB, F-54000 Nancy, France; stephane.dumarçay@univ-lorraine.fr

* Correspondence: pierre.leblond@univ-lorraine.fr

Received: 27 April 2020; Accepted: 20 May 2020; Published: 23 May 2020



Abstract: The diversity and distribution of specialized metabolite gene clusters within a community of bacteria living in the same soil habitat are poorly documented. Here we analyzed the genomes of 8 *Streptomyces* isolated at micro-scale from a forest soil that belong to the same species or to different species. The results reveal high levels of diversity, with a total of 261 biosynthesis gene clusters (BGCs) encoding metabolites such as terpenes, polyketides (PKs), non-ribosomal peptides (NRPs) and ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) with potential bioactivities. A significant part of these BGCs (n = 53) were unique to only one strain when only 5 were common to all strains. The metabolites belong to very diverse chemical families and revealed that a large diversity of metabolites can potentially be produced in the community. Although that analysis of the global metabolome using GC-MS revealed that most of the metabolites were shared between the strains, they exhibited a specific metabolic pattern. We also observed that the presence of these accessory pathways might result from frequent loss and gain of genes (horizontal transfer), showing that the potential of metabolite production is a dynamic phenomenon in the community. Sampling *Streptomyces* at the community level constitutes a good frame to discover new biosynthetic pathways and it appears as a promising reservoir for the discovery of new bioactive compounds.

Keywords: *Streptomyces*; soil; specialized metabolism; biosynthetic gene cluster; community; diversity

1. Introduction

Antimicrobial resistance is a major and global threat, with an estimated 33,000 human deaths per year in the European Union and 700,000 worldwide [1]. It is projected to be the leading cause of death by 2050 (with an estimated 10 million deaths globally). Finding new molecules is one of the solutions making it possible to challenge this scenario. The Actinobacteria are the most prolific providers of specialized metabolites, including two-thirds of all known antibiotics as well as many anticancer, antifungal, and immunosuppressive agents. These bacteria are thus of great importance in medicine, plant sciences, and biotechnologies [2]. Among Actinobacteria, the only genus *Streptomyces* provides by itself half of all known active compounds [3,4] and therefore constitutes a natural reservoir of potential new products to thwart antimicrobial resistant strain emergence. *Streptomyces* are soil dwelling bacteria also inhabiting marine and freshwater ecosystems. They generally have large genomes (6–12 Mb) organized in a linear chromosome [5]. They play an important role in the organic material recycling and are involved in symbiosis with plants, fungi, insects, and animals [6]. These interactions can be

beneficial, producing compounds that protect the host against pathogens [7], or enzymes that degrade resistant polymers such as lignocellulose [8].

Though this potential of metabolite production has been known for a long time, recent genomic approaches have revealed that it was in fact largely underestimated, as a single *Streptomyces* strain can possess in average between 30 to 50 biosynthetic gene clusters (BGCs) that could encounter for 8–10% of its genome [2,9]. Most of them are cryptic in standard laboratory culture conditions but can be awakened by diverse approaches [10]. For instance, *Streptomyces ambofaciens* isolated from a French soil in the 1950s was historically known to only produce the drug spiramycin, used in human therapy as an antibacterial agent and for the treatment of toxoplasmosis; and the pyrrole-amide congocidine [11]. Mining of its genome allowed the identification of 23 clusters potentially involved in the production of other secondary metabolites [9,12] and different approaches including genome modification led to the identification of different new compounds, or already known compounds such as kinamycin angucyclinone antibiotics [13,14] or the stambomycins [15]. If various approaches exist to unravel the potential of metabolite production of the *Streptomyces* such as genome mining [16] and editing (e.g., ribosome engineering) [17], regulator manipulations [18], synthetic biology [19], variations in culture conditions (e.g., co-culture, OSMAC, and nutrient conditions screening) [20], most of these approaches rely on natural isolates. Thus, prospecting the *Streptomyces* diversity remains essential. Studies sampled *Streptomyces*, for instance, from underexplored environments [21] such as mangroves [22], in deserts [23], caves [24], in the oceans, or in association with plants [25], insects [26], or marine animals like sponges [27] to increase the probability to discover new compounds. Interestingly, new insights in *Streptomyces* diversity showed that strains barely distinguishable at the taxonomic level can have distinct specialized metabolisms [5,28–31]. Thus, it seems that a large diversity of metabolites can be produced at the intra-specific level. We recently showed that this diversity resulted from the plasticity of the *Streptomyces* genome which experienced massive gene fluxes and recombination events even over short evolutionary times [5].

Regarding this large diversity, we challenged in the present study the idea that the potential of biosynthetic pathways found in a small number of strains isolated from a standard temperate soil should reveal a potential of new molecules. We therefore isolated at a small spatial scale (cm) a *Streptomyces* community from grains of soil originating from a temperate French forest. We used genome-guided, metabolomic, and phenotypic analyses and revealed their potential to produce metabolites of interest. We therefore show that even in a grain of soil, the potential to discover a large diversity of secondary metabolites and among them new activities is a reasonable approach regarding the discovery of new drugs.

2. Results and Discussion

2.1. Isolation and Taxonomic Characterization of a *Streptomyces* Community

As already described, in Tidjani et al. [5], soil was sampled in the forest of Montiers (France). Eight grains of soil maximally distant of 8 cm and in the order of mm³ were taken for strain isolation. Forty-six sporulating isolates with an actinomycetal phenotype (filamentous growth and sporulated colonies) were selected and phylogenetically characterized with a five-gene multi locus sequence analysis (MLSA) scheme (Figure S1). All the isolates belonged to the *Streptomyces* genus and eight strains were retained for further analyses. The three strains (RLB1-8, RLB1-9, and S1D4-23) were already described and their genome sequenced in Tidjani et al. [32]. These strains were highly related and were part of the same population. Here, we added RLA2-12 as another representative strain of this population. The four additional strains (RPA4-5, RPA4-2, RLB1-33, and S1D4-11) were chosen in order to consider more taxonomically distant representatives of the community. After genome sequencing (see below), the 16S rDNA sequences of our isolates were extracted and used to specify their taxonomic position by a phylogenetic reconstruction in comparison with close reference strains (Figure 1A). These latter were identified by Blast search on NCBI © with the 16S rDNA sequence of our strains. The strain

RLB1-33 was closely related to *S. mirabilis*, while RPA4-2 and S1D4-11 grouped together as sister group, but at the exclusion of any reference strain. The strains RLB1-8, RLB1-9, S1D4-23, and RLA2-12 had identical 16S rDNA sequences and were closely related to *S. olivochromogenes*. These seven strains belonged to clade II of the *Streptomyces* genus according to McDonald and Currie [33] classification. The strain RPA4-5 was more distant from the seven others and potentially belonged to the *S. platensis* species. This last strain belonged to the clade called “other” in McDonald and Currie classification which underlined the phylogenetic dispersion of our sampling. These results were confirmed by average nucleotide identity-based (ANIb) comparisons (Figure 1B).

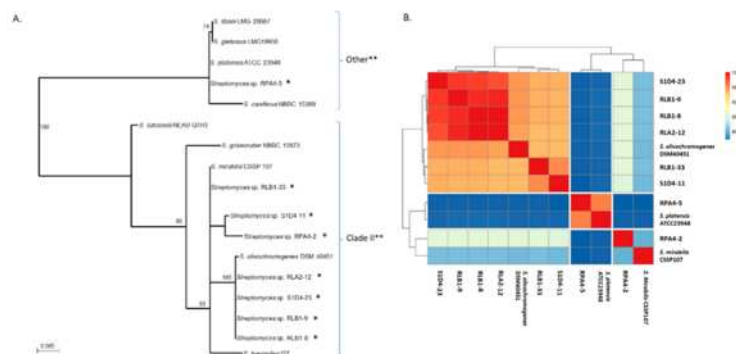


Figure 1. Genetic relationships between *Streptomyces* isolates of the community. (A). 16S rRNA phylogenetic tree of strains. The tree was based on a 1432 nucleotide alignment of the sequenced strains (marked with a * symbol) and closely related reference *Streptomyces*. The tree was built using the Maximum Likelihood method and with 100 bootstrap replicates. Bootstrap values below 70 were not represented. The scale represents mutations per nucleotide. The ** symbol represent the *Streptomyces* clades as defined by McDonalds and Currie ([33]). (B). Average nucleotide identity (ANI) between all pairs of genomes is represented as a heat map. According to taxonomic standards, strains that belong to a same species have identity scores higher than 95% (i.e., in red in the heat map).

Bioassay experiments ($n = 104$) were performed between all the pairs of strains, as well as with four strains isolated from the same soil and belonging to other bacterial genera (*Bacillus*, *Rhodococcus*, and *Paenisporosarcina*) (Figure S2). It showed that many strains had different growth inhibition patterns, with in the extreme cases, the strains S1D4-11 and RPA4-5 that inhibited all or almost all strains, and on the other hand, the strains RLB1-33, RLA2-12, and RLB1-8 that inhibited no indicator strain in the tested conditions. Interestingly these inhibition patterns could differ between closely related strains suggesting that, the metabolic profile could show some inconsistencies with phylogenetic relationships.

2.2. Genome Sequencing and BGC Identification

Genomic studies were performed on the eight selected strains; five of them were fully sequenced during the present study (Table 1). A combination of Nanopore (Oxford Nanopore Technologies) and Illumina technologies has been used. One to two large contigs covering the whole genome of each strain were obtained and enabled to acquire each linear chromosome in one scaffold and to identify one extrachromosomal element in strain RLA2-12 (predicted circular). The total genome sizes of the newly sequenced genomes ranged from 9.85 to 12.27 Mb, positioning these strains among the largest *Streptomyces* genomes and even among the largest bacterial ones (Table 1). The annotation was performed using the RAST tool kit (RASTtk, [34]) available on the Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) platform. In order to estimate the potential of the *Streptomyces* community for the production of specialized metabolites, the genomes were screened in silico with antiSMASH [35]

for the presence of biosynthetic gene clusters (BGCs) putatively coding for the production of such compounds (Figure 2). A total of 261 BGCs were detected across all strains, each with 25 to 36 BGCs with an average of 32. Regarding the overall community, a pool of 45 distinct BGCs were identified, with 26 shared by at least two strains and 19 unique to one strain. It should be noticed that the strain RPA4-5 which is the taxonomically more distant possessed more BGCs than the others with a ratio 3.8 BGCs per megabase of DNA versus 2.8-3 for the others.

Table 1. Genome characteristics and accession numbers of studied *Streptomyces* strains.

Strain/Plasmid	Replicon Size	Genome Size	CDS *	GC%	Genbank Accession Number
RLB1-8	11,765,395	11,765,395	10,891	70.2	<i>NZ_CP041650</i>
RLB1-9	11,940,408	12,201,201	11,085	70.2	<i>NZ_CP041654</i>
pRLB1-9.1 ^C	154,158	-	181	69.0	<i>NZ_CP041653</i>
pRLB1-9.2 ^L	106,635	-	120	68.7	<i>NZ_CP041652</i>
RLA2-12	10,825,588	10,892,946	10,031	70.3	JABAQG000000000
pRLA2-12.1 ^C	67,358	-	85	69.8	-
S1D4-23	12,057,750	12,057,750	11,174	70.2	<i>NZ_CP041613</i>
RLB1-33	12,127,650	12,127,650	11,381	70.0	CP050974
RPA4-2	9,856,149	9,856,149	9287	70.9	CP050975
S1D4-11	12,276,515	12,276,515	12,065	69.9	CP051010
RPA4-5	9,047,156	9,047,156	9260	70.9	CP050976

* A threshold of 50 aa was applied after Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) automatic annotation.
^{C,L}: circular and linear. Accession numbers in italics correspond to previously reported genomes, straight numbers indicate newly sequenced genomes.

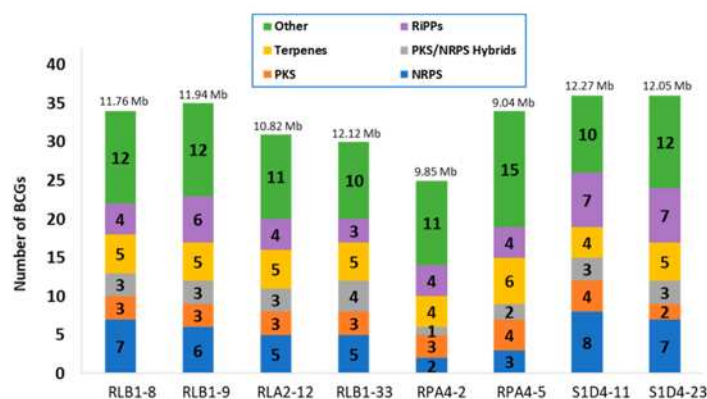


Figure 2. Distribution of biosynthetic gene clusters (BGCs) in strains. The identification of BGCs and their classification into families was performed by antiSMASH. Each family is represented by a color code and their numbers in each strain is indicated in the bar. The genome size of each strain is indicated on the top. PKS: polyketide, NRPS: nonribosomal peptide, RiPPs: ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide.

From the identified BGCs, the antiSMASH analysis enabled to group the predicted metabolites into six different classes that all possess a large diversity of bioactive molecules. Four of these classes encompassed peptides that are differentiated according to their biosynthesis enzymology. The NRPs are synthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs), the PKs by polyketide synthetases (PKSs), the PKs/NRPs by hybrid biosynthesis pathways and the RiPPs are ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. The fifth group is constituted by terpenes and the last group named “other” gathers all the unassigned BGCs. These different classes were present and relatively

frequent in all the strains (Figure 2). Aside from unassigned BGCs (10 to 15 per strains), terpenes (4–6 per strain), RIPP's (3–7 per strain), and NRPS (2–8 per strain) were the most frequent.

In order to have a better assignment of these 261 BGCs, we compared them to the MIBiG database [36]. Among them, 68 showed strong similarities (over 70%) to known BGCs and therefore could potentially be involved in the synthesis of similar or analogous compounds. The 193 remaining clusters could be on the other hand at the origin of the synthesis of more diverse or new compounds. With the aim of finding new compounds, it is interesting to differentiate at the community scale highly conserved BGCs and BGCs that are only present in one or a few strains. The first ones are indeed more likely to be essential to the *Streptomyces* metabolism in their environment when the second may encode biosynthetic pathways involved in the production of novel bioactive compounds providing ecological advantages [37]. For this purpose, we constructed a similarity network of the BGCs among different genomes using BigScape ([38], Figure 3) which uses a modified Pfam domain similarity metric and represented the shared BGCs as a heatmap (Figure 4A). By doing this, 93 gene cluster families (GCFs) were detected of which 53 were strain specific. The more related the strains are, the more they share common biosynthesis pathways (Figure 4A). Although the BigScape analysis allows BGCs to be grouped into families, each family represents a large diversity of molecules deriving from related backbones. Hence differences such as the presence or absence of genes or point mutations can result in the formation of metabolites with distinct final structures. The presence of common biosynthetic pathways appears to follow phylogenetic links. If we only consider the closest representatives of the community (i.e., at the exclusion of the taxonomically distant RPA4-5) 13 GCFs are common, when only five (ectoine, hopene, desferrioxamines, spore pigment, and bacteriocin) are unanimously shared when RPA4-5 is considered. These five common GCFs may provide essential metabolites for *Streptomyces* to adapt to its biotic and abiotic environment. For example, the production of a soluble low-molecular-weight compound such as ectoine which counteracts the deleterious effects of salinity and loss of water on cell physiology [39] is shared by all eight strains. The “spore pigment” conferring a potential increased resistance to UV radiation [40] is also widely found. Hopanoids were also found in all the strains; the hopene BGC was present in all genomes while the albaflavenone biosynthetic pathway was present in all but RPA4-5. Although not essential for growth, these compounds impact membrane fluidity and permeability and were hypothesized to alleviate stress in aerial mycelia by decreasing water permeability of the cell membrane [41–43]. All the studied *Streptomyces* produced siderophores which play an important role in extracellular solubilization of iron and are essential for the growth and development of the bacterium. Three BGCs in each strain were tagged as siderophore biosynthetic pathways but only one was ubiquitous, that is desferrioxamines B and/or E. Sarpeptins A/B, myxochelins A/B or delfibactins A/B (NRPS, [44]) were also predicted in several strains. The volatiles geosmin and 2-methylisoborneol BGCs were found in 6 strains but absent from strain RPA4-5. Geosmin is famous for giving soil its familiar “earthy” smell. These two terpenoids have recently been implicated in the attraction of a soil arthropod facilitating their dissemination in the environment [45]. The RiPPs (ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides) lassopeptides siamycin I, MS 271, and albusnodin, and RiPP lanthipeptides SapB and SAL-2242, were also identified. The carotene isorenieratene and the PKS products lydicamycin, alkylresorcinol, and pepticinnamin E also belong to the identifiable BGCs.

Specific GCFs may provide new biosynthetic pathways and offer opportunities to discover new compounds promising in the fight against antibiotic resistance in pathogenic bacteria. Studying their diversity and distribution may also help to understand the role of antibiotic in the ecological context. Hence, specific BGC may specifically help in the challenging biotic competition in soil, and help its owner or its conspecific to cope against a competitor. The contribution of the different strains of the community to the specific GCFs is illustrated by the heat-map (Figure 4B). Consistently with the previous results, the strain RPA4-5 which is the most distantly related strain provided alone 28 out of 53 of the unique pathways. Among them, two compounds were predicted by antiSMASH with high confidence (100% similarity): SapB and albusnodin (RIPP's). Strains RPA4-2 (16 BGCs), S1D4-11

(14 BGCs), and RLB1-33 (9 BGCs) also contributed a lot to the community repertoire. Recent studies have already pointed out that the correlation between the presence of BGCs and the taxonomy of *Streptomyces* is difficult to assess. It is the case at the genus level [31], but also between closely related species or at the intra-specific level [46–48]. These results can be explained by a high potential to gene exchange enabling the shuffling of the BGC repertoire and by the adaptive pressure applied in a specific niche to retain or to lose BGCs. The strains compared in other studies are generally isolated from various environments, blurring the niche effect. Here we investigated such presence/absence of BGCs among strains sharing the same habitat at different taxonomical levels. Despite this attention brought to the sampling scheme, it does not appear that genes are specifically conserved between distant strains and close phylogeny remains the main factor to share BGCs.

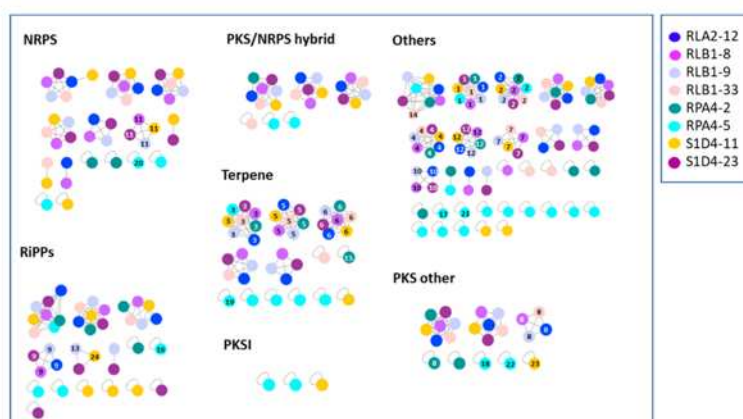


Figure 3. Similarity network of the predicted biosynthetic gene clusters (BGCs). After in silico prediction, BGCs shared by our 8 strains were represented in networks were similar BGCs between different strains are connected by a line. BGCs unique to one strain are symbolized by a singleton. Each strain is represented according to the color code. Numbered BGCs correspond to BGCs whose final product can be potentially predicted. 1, desferrioxamin B/E; 2, ectoin; 3, hopene; 4, spore pigment hybrid; 5, geosmin; 6, albaflavenone; 7, 2-methylisoborneol hybrid; 8, alkylresorcinol; 9, lanthipeptide A; 10, pepticinnamicin E; 11, diisonitrile antibiotic SF2768; 12, melanin; 13, siamycin I; 14, sarpeptine A/B; 15, 2-methylisoborneol; 16, albusnodin; 17, lydicamycin; 18, JBIR-76/77; 19, isorenieratene; 20, deimino-antipain; 21, lanthipeptide hybrids; 22, spore pigment; 23, lugdunomycin; 24, MS-271 (lassopeptide).

The fact that the number of specific GCFs increases with genetic distance suggests that gain and loss of BGCs are events occurring and cumulating along the evolutionary time leading to divergence. BGC replacement may occur even if the pressure is high on the function provided, especially when the newly acquired BGC performs the same function [49]. For example, as long as siderophores are produced and iron assimilation is ensured, the BGCs responsible for their synthesis can be replaced by horizontal transfer. On the other hand, other examples have shown that a few discrete differences may lead to phenotype differentiation between closely related strains. The polymorphism in *Bacillus subtilis* living in the same cubic centimeter impacted quorum sensing and led to kin differentiation [50]. Similarly, comparison of two closely related groups of *Myxococcus* strains enabled the identification of a 150-kb region involved in their merging phenotype [51]. Regarding specific BGCs, the turnover could even be much higher leading to a high diversification of the metabolites that can be used in biotic interactions such as antibiosis. As we have shown in a previous study [5], specific capacities to produce bioactive compounds such as antibiotics could be considered as public goods for the population.

More distant strains forming a community could also share common goods like closely related strains belonging to the same population.

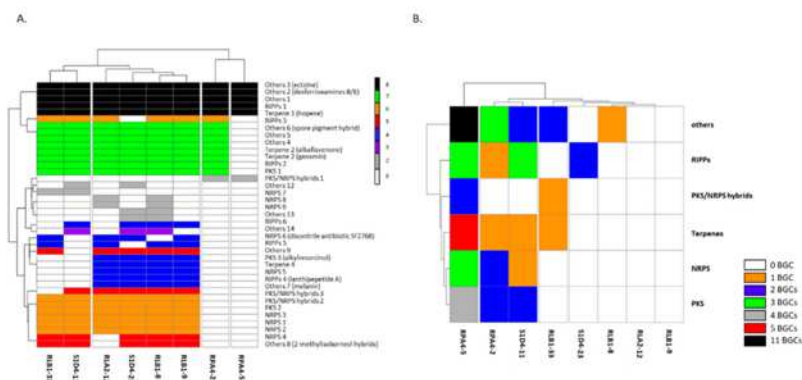


Figure 4. Distribution of gene cluster families (GCFs). **(A).** The presence of the different gene cluster families ($n = 37$) predicted by BigScape for the whole community is represented for each strain. BGCs are named according to the BigScape nomenclature. The absence of a GCF in a strain is represented by a white square and its presence by a colored one. The color of the square indicated the number of strains sharing this GCF. **(B).** Heat map of the number of unique GCFs brought by each individual strain of the community. The GCFs were grouped into 6 large families (NRPS, PKS, PKS/NRPS hybrids, RiPPs, Terpenes, others) and the color code indicates the number of unique GCFs present in a strain.

When the BGCs distribution is observed in the genetically closest strains, i.e., within the group of strains RLB1-8, RLB1-9, S1D4-23, and RLA2-12, it is possible to infer the events that led to the contemporary genomes. Thus, without being able to infer the genomic organization of the common ancestor of this group of strains, it is possible on the basis of parsimonious reasoning to retrace the events of gain and loss of BGCs occurring within this group. The BGCs present in a single strain were probably gained by horizontal transfer. Those absent from a single strain were probably lost. For all other cases, it is difficult to decide given the small number of strains considered. Only 26 of the 45 BGCs are shared by all strains despite their close phylogenetic proximity. Thirteen are shared by two or three strains, six are present in only one strain. This great diversity is concentrated in the terminal regions of the linear chromosome with the six specific BGCs present in the terminal 25% of the chromosome (not shown). In addition, with the exception of a single loss event located in the central region of the chromosome (loss of the lassopeptide BGC, siamycin BGC in strain RLA1-12), all loss or gain events occurred in the terminal regions. The same picture appears when BigScape GCF groupings are used to map BGCs that are common (or almost common) or specific to all the sample strains (Figure S3). Hence, while common BGCs are scattered more or less in the same order in the center of the chromosome, specific ones are mostly localized in the chromosome arms. All together, these results highlight the high potential of metabolite production encountered in this *Streptomyces* community that is supported by strain specific clusters.

2.3. Metabolite Profiling

In order to pursue the diversity characterization of the studied *Streptomyces* strains, a metabolomic approach was used. After growth on GA Petri dish and solvent extraction, the extracts were separated by GC/MS and analyzed through the GNPS workflow. GC-MS was already used for the characterization of bioactive *Streptomyces* strains [52]. The used derivatization allowed to detect more compounds like amino acids and lipids. For the eight strains taken together, it revealed the presence of 5945 features divided into 1310 unique categories (a feature corresponds to m/z with retention time as

described in Tourneroc et al. [53]). A large majority of features (97%) was found in at least two strains and only 36 (3%) were found in only one strain (Figure S4). It has been shown that in laboratory culture conditions (i.e., pure culture in standard growth conditions), most of the accessory genes including BGCs, remained silent [10]. Thus, the fact that most of the metabolomic profile is shared between strains could reflect the experimental conditions and revealed mainly compounds of the primary metabolism. A specific metabolic pattern could be nevertheless observed for each strain (Figure 5). These results were consistent with a previous study performed by Antony-Babu et al. ([28]), who showed no obvious relationship between the metabolite profiles of 10 *Streptomyces* strains with identical 16S rDNA genes. The bioassays conducted with our strains revealed that some antimicrobial compounds were produced (Table S1). These activities likely depend on the expression of a single BGC as we have shown recently in one of the studied strains (RLB1-9, [5]) where the antibacterial activity was correlated to the presence of a NRPS gene cluster not present in other strains. It is logical that these activities were not sufficient to differentiate the global metabolomes of our strains. We tried to identify the nature of the 36 specific features to one strain in using the GNPS databases (NIST and others), but no identification could be performed. Among the shared features, 87 were common to all the strains and eight of them could be identified as ethanolamine, cyclohexylamine, hexane, glycine, tocopherol, 7,(5-alpha)-cholesten-2-beta,3-beta-14-alpha-22R,25-pentol-6-one, 2-Aminoimidazole, and 2(1H)-Pyrazinone. These compounds are involved in lipid and amino-acid synthesis and could result from the primary metabolism. Interestingly, the two latter have been detected in some *Streptomyces* isolates as potent antibiofilm agent [54] or to have a cytotoxic activity against colorectal carcinoma cell lines [55].

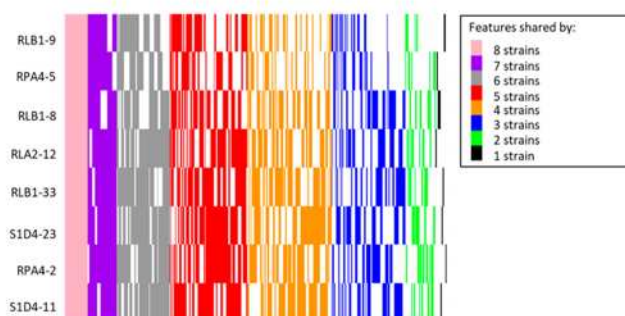


Figure 5. Metabolite profiling comparison. The presence/absence of all the features detected by GC/MS metabolite profiling (5,945 features grouped into 1,310 categories for the 8 *Streptomyces*) were compared in a heat map. A line represents each category and its color represents the number of strains that shares it.

3. Conclusions

Our study revealed a strong variability of the capacity to produce specialized metabolites among a sample of *Streptomyces* strains isolated from a forest soil micro-habitat. Only a few BGCs were found to be shared by all the isolates and likely ensure essential physiological traits. In contrast, a large part of the BGCs was strain-specific and constitutes a huge reservoir for new genes of interest. A preliminary metabolomic analysis revealed that although a specific profile can be assigned to each strain, most of the metabolome is shared, likely reflecting the expression of the primary metabolism. Further prospect will consider the global expression in different growth conditions (abiotic and biotic stresses including co-culturing) of the strains in order to reveal the expression of new metabolites correlate to the diversity of BGCs.

4. Material and Methods

4.1. Strains, Culture, and Storage

The *Streptomyces* were isolated from grains of soil on the order of cubic millimeters in size from a clod of soil collected in the Montiers-sur-Saulx forest in France (GPS coordinates: 48°32'37.248"N, 5°18'21.946"E) as described in Tidjani et al. [5]. Non-*Streptomyces* bacteria were isolated from the same forest soil during another sampling campaign. *Streptomyces* were grown on GA medium (15 g starch, 5 g NaCl, 5 g KCl, 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g KNO₃, 0.5 g MgSO₄, 15 mg FeSO₄, and 15 g Bacto Agar into 1 L of water adjusted in pH 7.2) and all the other bacteria on LB medium (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl for 1 L) at 30 °C. *Streptomyces* were stored at −80 °C as spore suspensions in glycerol [56]. For metabolite extractions, the initial spore stock of *Streptomyces* was diluted to give a solution of 10⁵ spores/ml. Ten microliters of this solution were then spread over a Petri dish. Cultures (3 replicates) were grown for 14 days and cut out with a spatula and gathered into a flask for ethyl acetate extraction (1/1 v/v). This mixture was shaken during 1 h 30 min and filtered to recover the liquid. After extraction, the organic solvent was evaporated under vacuum using a rotary evaporator. Dried extracts were stored at −18 °C before analysis.

4.2. Phylogenetic Analyses

MLSA genes (*atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, and *trpB*) were amplified using primers and PCR conditions described by Guo et al. [57], respectively. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 [58] (Kumar 2016). The MLSA tree (3178 concatenated positions) was built by Neighbor-Joining with a Kimura's two-parameter distance correction. After removing positions containing gaps in the alignment, the 16S rDNA tree was built by Maximum Likelihood based on the General Time Reversible model with 1432 positions. Branch likeliness was calculated with bootstrap analyses (100 replicates). ANIb values were calculated with Jspecies (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>) [59].

4.3. Bioassays

All inhibition growth experiments were performed on GA medium [60]. Inhibition growth experiments between *Streptomyces* were performed by streaking the tester *Streptomyces* from a single colony to form a line on a plate and were incubated at 30 °C for 5 days. The receiver strain was then applied perpendicularly to the tester and incubated at 30 °C. The tester strain was considered inhibitory when it prevented the growth of the receiver streak in its vicinity. Inhibitory growth experiment against *Bacillus*, *Paenisporsarcina* and *Rhodococcus* were performed in inoculating for 5 days a 5 µL drop (10⁷ spores per mL) of a *Streptomyces* spore suspension. After an overnight pre-culture, the receiver strains were overlaid in LB soft (0.4% agar) at a 600nm OD of 0.05 on top of the *Streptomyces*. Their growth inhibition was monitored by the observation of an inhibitory halo.

4.4. Genome Analysis

The *Streptomyces* strains used in this work have been completely sequenced and assembled. Their accession number corresponding to their genome sequences are indicated in Table 1. Sequencing and assembling were performed via the I2BC NGS platform (France). Automatic annotation of the genome sequences was achieved using the RAST tool kit (RASTtk, [34]) available on the Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) platform with a CDS size threshold of 50 amino-acids. Further, the annotation files were used as input of antiSMASH [35] in order to predict the BGC content of each genome. A similarity network of the BGCs was obtained using BigScape which uses a modified Pfam domain similarity metric implemented [38,61]. A cut-off of 0.75 was used for the analysis.

4.5. GC/MS Metabolite Profiling

Dried extracts into glass vials were silylated by adding 50 μ L of BSTFA/TMSCl (99/1) and heated at 50 $^{\circ}$ C for 12 h. Then, the derivatizing reagent was evaporated, the extract derivatives were diluted in ethyl acetate and transferred for gas chromatography analysis. GC-MS analysis was performed on a Clarus 680 gas chromatograph coupled to a Clarus SQ8 quadrupole mass spectrometer (Perkin Elmer Inc., USA). Gas chromatography was carried out on a 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane fused-silica capillary column (DB-5ms, 30 m \times 0.25 mm, 0.25- μ m film thickness, J&W Scientific, USA) with helium as carrier gas at a constant flow of 1 mL/min. The gas chromatograph was equipped with an electronically controlled split/splitless injection port. The injection (1 μ L) was performed at 250 $^{\circ}$ C in the splitless mode. The oven temperature program was as follows: 80 $^{\circ}$ C for 2 min period, increase from 80 $^{\circ}$ C to 190 $^{\circ}$ C at a rate of 10 $^{\circ}$ C/min, increase from 190 $^{\circ}$ C to 280 $^{\circ}$ C at a rate of 15 $^{\circ}$ C/min and hold for 5 min, then 10 $^{\circ}$ C/min until 300 $^{\circ}$ C and hold for 14 min. Ionization was achieved under the electron impact mode (70 eV ionization energy). The source and transfer line temperatures were 180 $^{\circ}$ C and 250 $^{\circ}$ C, respectively. Detection was carried out in scan mode: m/z = 45 to m/z = 700. The detector was switched off in the initial 2 min (solvent delay).

4.6. Statistical Analysis of Metabolite Profiles

Obtained raw data were converted to the appropriate format using Mzmine2 software [62]. Converted data were analyzed using GNPS workflow for GC/MS data [63]. Some of the identified compound were analyzed by using KEGG platform in order to verify the involved metabolism [64]. With these data an absence/presence table of features was obtained. All statistical analyses and heat maps have been performed using the R software with package “pheatmap” [65].

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2079-6382/9/5/271/s1>: Figure S1. Phylogenetic multi locus sequence typing (MLSA) tree of isolated strains, Figure S2. Illustration of a bioassay test, Figure S3. Schematization of the biosynthesis pathways along the chromosome of the strains studied, Figure S4. Distribution of GS/MS features in strains, Table S1. Bioassay evaluation of growth inhibition by *Streptomyces*.

Author Contributions: M.N., A.-R.T., C.B., P.L. and E.G. designed the experiments; M.N. and A.-R.T. performed the fermentation experiments and the DNA and metabolite extractions; M.N. and P.L. performed genomic data acquisition and analysis; A.G. performed the biological assays; S.D. performed GC-MS analyses, M.N., E.G., C.B. and P.L. drafted the manuscript, and all authors revised and approved the final submitted manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by financial support from the “Impact Biomolecules” project of the “Lorraine Université d’Excellence” (in the context of the « Investissements d’avenir » program implemented by the French National Research Agency (ANR)).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Cassini, A.; Högberg, L.D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G.S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M.E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 56–66. [CrossRef]
2. Baltz, R.H. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *44*, 573–588. [CrossRef] [PubMed]
3. Barka, E.A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Meier-Kolthoff, J.P.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G.P. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 1–43. [CrossRef] [PubMed]
4. Labeda, D.P.; Goodfellow, M.; Brown, R.; Ward, A.C.; Lanoot, B.; Vannanneyt, M.; Swings, J.; Kim, S.-B.; Liu, Z.; Chun, J.; et al. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **2012**, *101*, 73–104. [CrossRef] [PubMed]

5. Tidjani, A.-R.; Lorenzi, J.-N.; Toussaint, M.; van Dijk, E.; Naquin, D.; Lespinet, O.; Bontemps, C.; Leblond, P. Massive gene flux drives genome diversity between sympatric *Streptomyces* conspecifics. *mBio*. **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
6. van der Meij, A.; Worsley, S.F.; Hutchings, M.I.; van Wezel, G.P. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 392–416. [[CrossRef](#)]
7. Olanrewaju, O.S.; Babalola, O.O. *Streptomyces*: Implications and interactions in plant growth promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 1179–1188. [[CrossRef](#)]
8. Book, A.J.; Lewin, G.R.; McDonald, B.R.; Takasuka, T.E.; Doering, D.T.; Adams, A.S.; Blodgett, J.A.V.; Clardy, J.; Raffa, K.F.; Fox, B.G.; et al. Cellulolytic *Streptomyces* strains associated with herbivorous insects share a phylogenetically linked capacity to degrade lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 4692–4701. [[CrossRef](#)]
9. Aigle, B.; Lautru, S.; Spitteller, D.; Dickschat, J.S.; Challis, G.L.; Leblond, P.; Pernodet, J.-L. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *41*, 251–263. [[CrossRef](#)]
10. Rutledge, P.J.; Challis, G.L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat. Rev. Microbiol.* **2015**, *13*, 509–523. [[CrossRef](#)]
11. Pinnert-Sindico, S. A new species of *Streptomyces* producing antibiotics *Streptomyces ambofaciens* n. sp., cultural characteristics. *Ann. Inst. Pasteur* **1954**, *87*, 702–707.
12. Thibessard, A.; Haas, D.; Gerbaud, C.; Aigle, B.; Lautru, S.; Pernodet, J.-L.; Leblond, P. Complete genome sequence of *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, the spiramycin producer. *J. Biotechnol.* **2015**, *214*, 117–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pang, X.; Aigle, B.; Girardet, J.-M.; Mangenot, S.; Pernodet, J.-L.; Decaris, B.; Leblond, P. Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 575–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Buret, R.; Song, L.; Mendes, M.V.; Corre, C.; Hotel, L.; Rouhier, N.; Framboisier, X.; Leblond, P.; Challis, G.L.; Aigle, B. Characterization and manipulation of the pathway-specific late regulator AlpW reveals *Streptomyces ambofaciens* as a new producer of Kinamycins. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 1142–1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Laureti, L.; Song, L.; Huang, S.; Corre, C.; Leblond, P.; Challis, G.L.; Aigle, B. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 6258–6263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ward, A.C.; Allenby, N.E. Genome mining for the search and discovery of bioactive compounds: The *Streptomyces* paradigm. *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *365*. [[CrossRef](#)]
17. Ochi, K.; Okamoto, S.; Tozawa, Y.; Inaoka, T.; Hosaka, T.; Xu, J.; Kurosawa, K. Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv. Appl. Microbiol.* **2004**, *56*, 155–184.
18. Xia, H.; Li, X.; Li, Z.; Zhan, X.; Mao, X.; Li, Y. The application of regulatory cascades in *Streptomyces*: Yield enhancement and metabolite mining. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 406. [[CrossRef](#)]
19. Li, L.; Liu, X.; Jiang, W.; Lu, Y. Recent advances in synthetic biology approaches to optimize production of bioactive natural products in actinobacteria. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2467. [[CrossRef](#)]
20. Pan, R.; Bai, X.; Chen, J.; Zhang, H.; Wang, H. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using osmac strategy: A literature review. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 294. [[CrossRef](#)]
21. Sivalingam, P.; Hong, K.; Pote, J.; Prabakar, K. Extreme environment *Streptomyces*: Potential sources for new antibacterial and anticancer drug leads? *Int. J. Microbiol.* **2019**, *2019*, 5283948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hu, D.; Chen, Y.; Sun, C.; Jin, T.; Fan, G.; Liao, Q.; Mok, K.M.; Lee, M.-Y.S. Genome guided investigation of antibiotics producing actinomycetales strain isolated from a Macau mangrove ecosystem. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mohammadipanah, F.; Wink, J. Actinobacteria from arid and desert habitats: Diversity and biological activity. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Adam, D.; Maciejewska, M.; Naomé, A.; Martinet, L.; Coppieters, W.; Karim, L.; Baurain, D.; Rigali, S. Isolation, Characterization, and antibacterial activity of hard-to-culture actinobacteria from cave moonmilk deposits. *Antibiotics* **2018**, *7*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Musa, Z.; Ma, J.; Egamberdieva, D.; Abdelshafy Mohamad, O.A.; Abaydulla, G.; Liu, Y.; Li, W.-J.; Li, L. Diversity and antimicrobial potential of cultivable endophytic actinobacteria associated with the medicinal plant thymus roseus. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Wang, Z.; Yu, Z.; Zhao, J.; Zhuang, X.; Cao, P.; Guo, X.; Liu, C.; Xiang, W. Community composition, antifungal activity and chemical analyses of ant-derived actinobacteria. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 201. [[CrossRef](#)]
27. Indraningrat, A.A.G.; Smidt, H.; Sipkema, D. Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds. *Mar. Drugs* **2016**, *14*, 87. [[CrossRef](#)]
28. Antony-Babu, S.; Stien, D.; Eparvier, V.; Parrot, D.; Tomasi, S.; Suzuki, M.T. Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11089. [[CrossRef](#)]
29. Vetsigian, K.; Jajoo, R.; Kishony, R. Structure and evolution of *Streptomyces* interaction networks in soil and in silico. *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001184. [[CrossRef](#)]
30. Sotrorff, I.; Wiese, J.; Lipfert, M.; Preußke, N.; Sönnichsen, F.D.; Imhoff, J.F. Different secondary metabolite profiles of phylogenetically almost identical *Streptomyces* griseus strains originating from geographically remote locations. *Microorganisms* **2019**, *7*, 166. [[CrossRef](#)]
31. Chevrette, M.G.; Carlos-Shanley, C.; Louie, K.B.; Bowen, B.P.; Northen, T.R.; Currie, C.R. Taxonomic and metabolic incongruence in the ancient genus *Streptomyces*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tidjani, A.-R.; Lorenzi, J.-N.; Toussaint, M.; van Dijk, E.; Naquin, D.; Lespinet, O.; Bontemps, C.; Leblond, P. Genome sequences of 11 conspecific *Streptomyces* sp. strains. *Microbiol. Resour. Announc.* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. McDonald, B.R.; Currie, C.R. Lateral gene transfer dynamics in the ancient bacterial genus *Streptomyces*. *mBio.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Brettin, T.; Davis, J.J.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Gerdes, S.; Olsen, G.J.; Olson, R.; Overbeek, R.; Parrello, B.; Pusch, G.D.; et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Blin, K.; Wolf, T.; Chevrette, M.G.; Lu, X.; Schwalen, C.J.; Kautsar, S.A.; Suarez Duran, H.G.; de Los Santos, E.L.C.; Kim, H.U.; Nave, M.; et al. antiSMASH 4.0-improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W36–W41. [[CrossRef](#)]
36. Medema, M.H.; Kottmann, R.; Yilmaz, P.; Cummings, M.; Biggins, J.B.; Blin, K.; de Bruijn, I.; Chooi, Y.H.; Claesen, J.; Coates, R.C.; et al. Minimum information about a biosynthetic gene cluster. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 625–631. [[CrossRef](#)]
37. Cordero, O.X.; Polz, M.F. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 263–273. [[CrossRef](#)]
38. Navarro-Muñoz, J.C.; Selem-Mojica, N.; Mallowney, M.W.; Kautsar, S.A.; Tryon, J.H.; Parkinson, E.I.; De Los Santos, E.L.C.; Yeong, M.; Cruz-Morales, P.; Abubucker, S.; et al. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16*, 60–68. [[CrossRef](#)]
39. Bursy, J.; Kuhlmann, A.U.; Pittelkow, M.; Hartmann, H.; Jebbar, M.; Pierik, A.J.; Bremer, E. Synthesis and uptake of the compatible solutes ectoine and 5-hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in response to salt and heat stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 7286–7296. [[CrossRef](#)]
40. Chater, K.F.; Biró, S.; Lee, K.J.; Palmer, T.; Schrempf, H. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34*, 171–198. [[CrossRef](#)]
41. Čihák, M.; Kameník, Z.; Šmidová, K.; Bergman, N.; Benada, O.; Kofroňová, O.; Petříčková, K.; Bobek, J. Secondary Metabolites produced during the germination of *Streptomyces coelicolor*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Poralla, K.; Muth, G.; Härtner, T. Hopanoids are formed during transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *189*, 93–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Belin, B.J.; Busset, N.; Giraud, E.; Molinaro, A.; Silipo, A.; Newman, D.K. Hopanoid lipids: From membranes to plant-bacteria interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 304–315. [[CrossRef](#)]
44. Yamanaka, K.; Oikawa, H.; Ogawa, H.-O.; Hosono, K.; Shinmachi, F.; Takano, H.; Sakuda, S.; Beppu, T.; Ueda, K. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiol. Read. Engl.* **2005**, *151*, 2899–2905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Gust, B.; Challis, G.L.; Fowler, K.; Kieser, T.; Chater, K.F. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1541–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Komaki, H.; Sakurai, K.; Hosoyama, A.; Kimura, A.; Igarashi, Y.; Tamura, T. Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase gene clusters among taxonomically close *Streptomyces* strains. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Seipke, R.F. Strain-level diversity of secondary metabolism in *Streptomyces albus*. *PLoS One* **2015**, *10*, e0116457. [[CrossRef](#)]
48. Vicente, C.M.; Thibessard, A.; Lorenzi, J.-N.; Benhadj, M.; Hôtel, L.; Gacemi-Kirane, D.; Lespinet, O.; Leblond, P.; Aigle, B. Comparative genomics among closely related *Streptomyces* strains revealed specialized metabolite biosynthetic gene cluster diversity. *Antibiotics* **2018**, *7*, 86. [[CrossRef](#)]
49. Bruns, H.; Crüsemann, M.; Letzel, A.-C.; Alanjary, M.; McInerney, J.O.; Jensen, P.R.; Schulz, S.; Moore, B.S.; Ziemert, N. Function-related replacement of bacterial siderophore pathways. *ISME J.* **2018**, *12*, 320–329. [[CrossRef](#)]
50. Stefanic, P.; Kraigher, B.; Lyons, N.A.; Kolter, R.; Mandic-Mulec, I. Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14042–14047. [[CrossRef](#)]
51. Wielgoss, S.; Didelot, X.; Chaudhuri, R.R.; Liu, X.; Weedall, G.D.; Velicer, G.J.; Vos, M. A barrier to homologous recombination between sympatric strains of the cooperative soil bacterium *Myxococcus xanthus*. *ISME J.* **2016**, *10*, 2468–2477. [[CrossRef](#)]
52. Saravana Kumar, P.; Al-Dhabi, N.A.; Duraipandiyar, V.; Balachandran, C.; Praveen Kumar, P.; Ignacimuthu, S. In vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tourneroche, A.; Lami, R.; Hubas, C.; Blanchet, E.; Vallet, M.; Escoubeyrou, K.; Paris, A.; Prado, S. Bacterial-fungal interactions in the kelp endomicrobiota drive autoinducer-2 quorum sensing. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rogers, S.A.; Huigens, R.W.; Cavanagh, J.; Melander, C. Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2112–2118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Shaala, L.A.; Youssef, D.T.A.; Badr, J.M.; Harakeh, S.M. Bioactive 2(1h)-pyrazinones and diketopiperazine alkaloids from a tunicate-derived actinomycete *Streptomyces* sp. *Molecules* **2016**, *21*, 1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kieser, T.; Bibb, M.J.; Buttner, M.J.; Chater, K.F.; Hopwood, D.A. *Practical Streptomyces Genetics*; John Innes Foundation: Norwich, UK, 2000.
57. Guo, Y.; Zheng, W.; Rong, X.; Huang, Y. A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: Use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 149–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
59. Richter, M.; Rosselló-Móra, R.; Oliver Glöckner, F.; Peplies, J. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2016**, *32*, 929–931. [[CrossRef](#)]
60. Abrudan, M.I.; Smakman, F.; Grimbergen, A.J.; Westhoff, S.; Miller, E.L.; van Wezel, G.P.; Rozen, D.E. Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 11054–11059. [[CrossRef](#)]
61. Cenicerós, A.; Dijkhuizen, L.; Petrusma, M.; Medema, M.H. Genome-based exploration of the specialized metabolic capacities of the genus *Rhodococcus*. *BMC Genomics* **2017**, *18*, 593. [[CrossRef](#)]
62. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Oresic, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kaponov, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 828–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

64. Kanehisa, M.; Goto, S.; Sato, Y.; Furumichi, M.; Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D109–D114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. R Development Core Team. *A Language and Environment for Statistical Computing: Reference Index*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2010; ISBN 978-3-900051-07-5.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

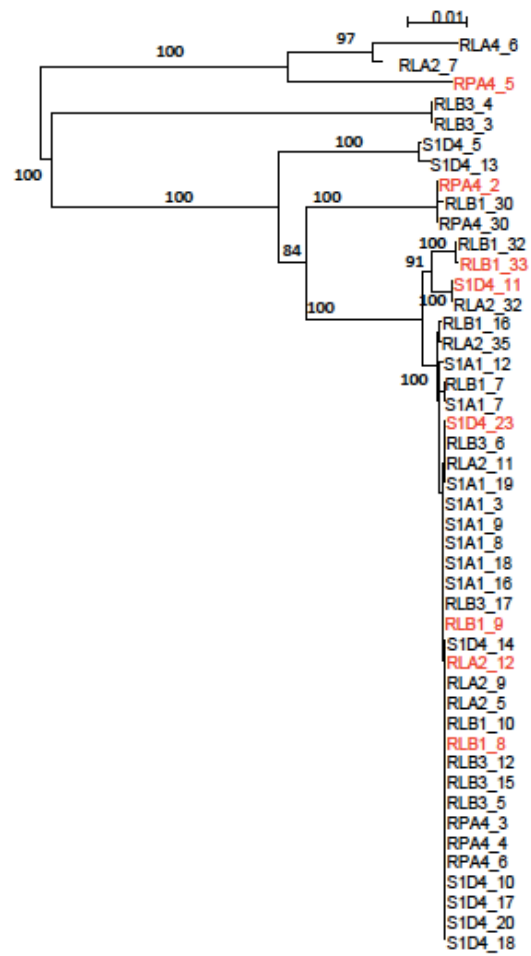


Fig. S1. Phylogenetic multi locus sequence typing (MLSA) tree of isolated strains.

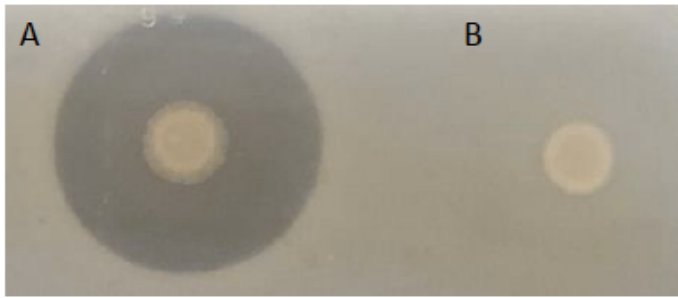


Fig. S2. Illustration of a bioassay test.

Table S1. Bioassay evaluation of growth inhibition by *Streptomyces*.

		Receiver strain											
		Streptomyces							Paenisporosarcina	Rhodococcus		Bacillus	
		RPA4-5	S1D4-11	RPA4-2	RLB1-33	RLB1-9	RLA2-12	RLB1-8	S1D4-23	RB2.1-N3	RB2.2-N6	RB2.1-N6	RB2.2-N4
Tester strain	RPA4-5												
	S1D4-11												
	RPA4-2												
	RLB1-33												
	RLB1-9												
	S1D4-23												
	RLA2-12												
	RLB1-8												

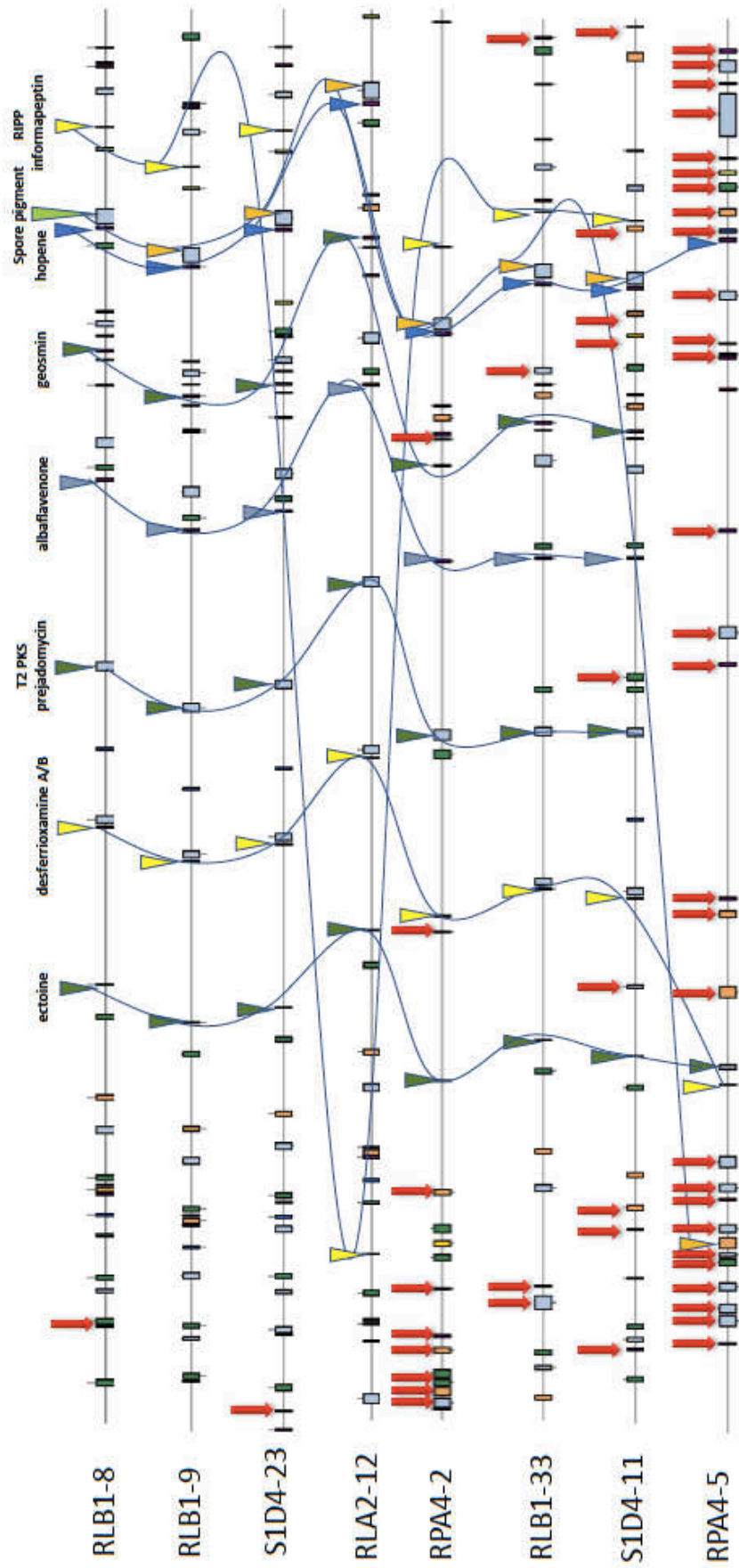


Fig S3. Schematization of the biosynthesis pathways along the chromosome of the strains studied.

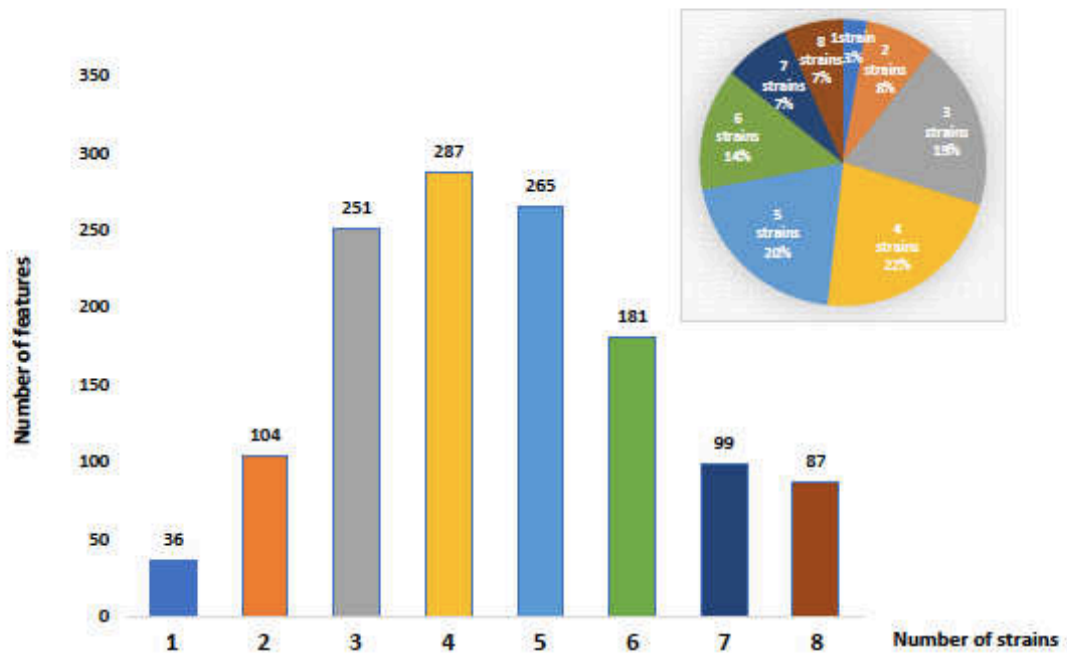


Fig. S4. Distribution of GS/MS features in strains.

CHAPITRE R3 : ÉTUDE GENOMIQUE ET CHIMIQUE DE 7 CHAMPIGNONS
BASIDIOMYCETES

INTRODUCTION

Les basidiomycètes sont la deuxième division des champignons microscopiques la plus représentée derrière les ascomycètes. Elle regroupe près de 30 000 espèces différentes soit 37% des espèces des « vrais champignons » (Kirk et al., **2001**). Ces espèces sont trouvées dans de nombreux environnements tels que les écosystèmes forestiers ou marins (Hibbett and Binder, **2001**). Au sein des écosystèmes forestiers, ces champignons ont des fonctions écologiques essentielles comme par exemple la dégradation de la matière organique (Baldrian, **2008**; Ghobad-Nejhad, **2011**). Les basidiomycètes sont une source non négligeable de nouvelles molécules. En 2005, près de 2 000 composés bioactifs issus de cette division avaient été détectés dont la moitié possède une activité antibiotique (Bérdy, **2005**). Parmi ces champignons et les molécules produites, on peut citer à titre d'exemple *Ganoderma Lucidum* qui possède de nombreux métabolites de type terpènes ou des polysaccharides ayant des activités antibioques, antitumorales et antioxydantes (pour revue voir Cör et al., **2018**). *Trametes versicolor* produit aussi des antibiotiques de type triterpènes ou prenyl phénols (Scarpari et al., **2017**), alors que *Schizophyllum commune* est connu pour produire le diterpène la Schizostatine qui inhibe la synthèse de squalène (Tanaka et al., **2001**).

Sept espèces différentes de champignons appartenant à 5 genres ont été utilisés au cours de ces travaux : *Trametes versicolor*, *Trametes gibbosa*, *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Ganoderma lucidum*, *Stereum hirsutum*, *Schizophyllum commune* et *Postia placenta*. Ces champignons dégradeurs du bois sont des pourritures blanches excepté *Postia Placenta* (pourriture brune) et *Schizophyllum commune* (indeterminé) (Riley et al., **2014a**). Ces champignons ont été choisis sur la base de leur durée de croissance permettant des co-cultures avec les bactéries du genre *Streptomyces*. Seuls les 7 génomes disponibles sur NCBI et JGI ont été analysés

MATERIEL ET METHODES

SOUCHES UTILISEES LORS DE LA THESE ET EXTRACTIONS DES MOLECULES

Les souches de champignons utilisées lors de cette thèse proviennent de la mycothèque du site INRAE de Champenoux. Les pré-cultures de ces champignons ont été réalisées sur milieu MA. Ces champignons ont ensuite été cultivés sur milieu GA, à partir d'un plug de la pré-culture, et un suivi de croissance a été réalisé. Les résultats de suivi de croissance sont présentés dans le tableau suivant (Tableau R8). Après n jours (n correspond à la valeur indiquée dans le tableau), les métabolites ont été extraits dans de l'acétate d'éthyle pendant 1h30 à température ambiante.

Espèce	Souche	Moyenne du temps de croissance* (jours)
<i>Trametes versicolor</i>	Basidio 45	10
<i>Trametes gibbosa</i>	Basidio 74	5
<i>Trametes hirsuta</i>	Basidio 51	6
<i>Stereum hirsutum</i>	Basidio 57	5
<i>Ganoderma lucidum</i>	2R0112	7
<i>Schizophyllum commune</i>	66-01A	15
<i>Postia placenta</i>	PP978/9	11

TABLEAU R8 : SOUCHES UTILISEES POUR LES ANALYSES CHIMIQUES
*temps nécessaire pour remplir la boîte de pétri (n=3)

GENOMES DE REFERENCES UTILISES

Les génomes utilisés ont été récupérés depuis les bases de données NCBI ou JGI (Nordberg et al., **2014**; Sayers et al., **2019**). Les différentes caractéristiques de ces génomes sont résumées dans le tableau suivant (Tableau R9).

Champignon	Taille du génome	G+C %	Nombre de séquences codante	Numéro d'accension	Référence
<i>Trametes gibbosa</i>	33.1 Mb	56,9	12,038	PRJNA331355	<i>Project ID: 1111231</i>
<i>Trametes hirsuta</i>	33.6 Mb	57,6	14,598	GCA_001302255.2	Pavlov et al., 2015
<i>Trametes versicolor</i>	42.9 Mb	57,3	12,634	GCA_000271585.1	Floudas et al., 2012
<i>Stereum hirsutum</i>	45.7 Mb	51,3	12,973	GCA_000264905.1	Floudas et al., 2012
<i>Postia placenta</i>	42.4 Mb	47,2	12,537	GCA_002117355.1	Martinez et al., 2009
<i>Ganoderma lucidum</i>	43.3 Mb	56,1	16,113	GCA_000271565.1	Chen et al., 2012
<i>Schizophyllum commune</i>	38.5 Mb	57,4	13,210	GCA_000143185.1	Ohm et al., 2010

TABLEAU R9 : GENOMES DE REFERENCES DES SOUCHES ANALYSEES

ANALYSE DES GENOMES

Les génomes des champignons ont été analysés et annotés grâce à la plateforme Augustus avec le génome de référence de *Laccaria bicolor* et les paramètres par défauts (Hoff and Stanke, **2013**). Cette plateforme est utilisée pour l'annotation des génomes fongiques (Han et al., **2020**; Pavlov et al., **2015**). Les séquences protéiques ainsi obtenues ont été analysées par CVTree avec pour valeur K=7 (Zuo and Hao, **2015**) pour la construction d'un arbre phylogénétique. Pour un entier fixe K, le nombre de K-peptides qui se chevauchent dans la collection de tous les produits protéiques d'un génome est compté et un vecteur de composition (CV) de dimension 20^K est formé, en attribuant les comptes dans l'ordre lexicographique des caractères d'acides aminés.

Ensuite, un CV « normalisé » est obtenu en soustrayant un compte prédit du compte réel en faisant une hypothèse markovienne d'ordre (K - 2). Cette procédure de soustraction supprime l'effet de fond aléatoire et met en évidence les informations phylogénétiques contenues dans le CV normalisé (Li et al., **2010**). La comparaison des clusters de protéines orthologues a été réalisée par Orthovenn2 (Xu et al., **2019**).

DETERMINATION ET ANALYSE DES VOIES DE BIOSYNTHESE

Les séquences génomiques en acide nucléique ont été soumises à la plateforme Antismash pour l'annotation des voies de biosynthèse et qui peut être utilisée pour les génomes fongiques (Blin et al., **2019**; Han et al., **2020**). La conservation et la spécificité de chacune de ces voies ont été évaluées par un réseau de similarité avec un cut-off de 0,75 grâce à l'outil Big-Scape (Navarro-Muñoz et al., **2018**).

ANALYSE HPLC-DAD

Les profils chimiques ont été réalisés avec un système HPLC-DAD. La colonne semi-préparative était avec une phase stationnaire de type biphényle (300 mm * 4,6 mm, 5 µ particules de 100 Å, Kinetex, USA). L'analyse a été effectuée en mode gradient à un débit de 1 ml / min. Le gradient a commencé de 0% à 100% de méthanol pendant 55 minutes. Après, la colonne a été lavée pendant 25 minutes avec 100% d'eau. Le détecteur utilisé est une barette de diode qui permet le suivi à plusieurs longueurs d'onde. Les longueurs d'onde sélectionnées étaient comprises entre 200 nm et 400 nm avec un pas de 20 nm. Dans le présent manuscrit seuls les résultats obtenus pour 300 nm seront présentés.

RESULTATS

CLASSIFICATION TAXONOMIQUE DES 7 ESPECES DES CHAMPIGNONS BASIDIOMYCETES

Après l'annotation avec Augustus (Hoff and Stanke, **2013**), les séquences protéiques des champignons ont été utilisées pour la conception d'un arbre phylogénétique grâce à la plateforme CTree avec une valeur K=7 conseillée pour l'étude des champignons (Zuo and Hao, **2015**). L'arbre phylogénétique ainsi obtenu est présenté figure R18. Les trois espèces de *Trametes* forment un groupe phylogénétique correspondant à la famille des polyporaceae. Cette famille est proche de celle de *Ganoderma lucidum* (ganodermataceae) et de celle de *Postia Placenta* (Fomitopsidaceae). Ces trois familles appartiennent à l'ordre des Polyporales. Les deux souches *Schizophyllum commune* et *Stereum hirsutum* respectivement de l'ordre des Russulales et des Agaricales sont proches phylogénétiquement selon leur séquence protéique.

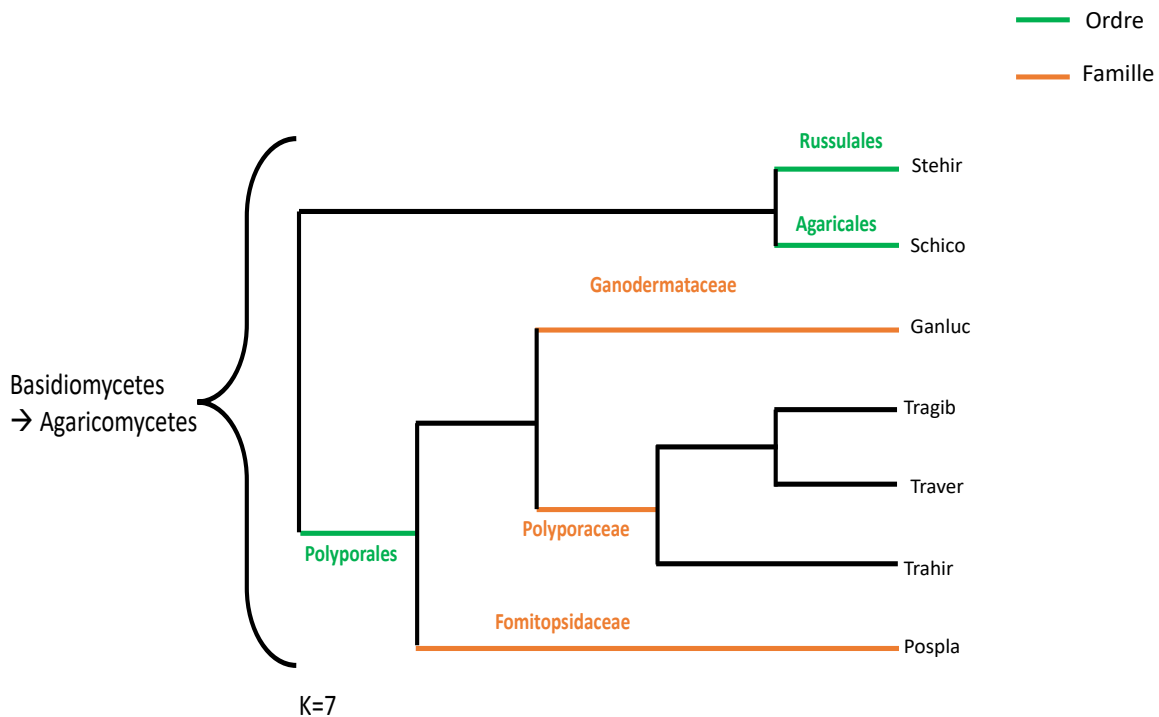


FIGURE R18 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES 7 ESPECES DE CHAMPIGNONS BASIDIOMYCETES

Après l'annotation Augustus, les séquences protéiques des différentes souches ont été analysés par CTree3 pour la construction d'un arbre phylogénétique. La valeur K=7 (voir matériels et méthodes) est la valeur de référence fixée pour les champignons. Les couleurs vertes et oranges indiquent respectivement l'ordre et la famille formée par l'arbre. Pospla : *Postia placenta*, GanLuc : *Ganoderma lucidum*, SteHir : *Stereum hirsutum*, Schico : *Schizophyllum commune*, Traver : *Trametes versicolor*, Trahir : *Trametes Hirsuta* et Tragib : *Trametes gibbosa*

Dans un deuxième temps, les clusters de protéines orthologues des différentes souches ont été analysés. Pour cela, les séquences protéiques obtenues après l'annotation Augustus ont été analysées grâce à la plateforme Orthovenn2 (Xu et al., 2019). Cette plateforme permet de comparer les clusters de protéines orthologues au sein de différentes espèces.

Les espèces étudiées forment entre 6 424 et 8 191 clusters de protéines. Environ 2 000 à 3 400 protéines ne forment pas de clusters particuliers (Tableau supplémentaire R10).

Chacune des souches a été comparée aux autres deux à deux et les résultats obtenus sont visualisés par une heat-map (figure R19). Ces résultats montrent qu'il existe une conservation de certaines protéines codées par des gènes communs au sein de la division des basidiomycètes. Comme attendu, les trois espèces de *Trametes* possèdent une proportion importante de protéines orthologues communes. Les résultats obtenus par l'arbre phylogénétique présentant *S. hirsutum* et *S. commune* comme étant proches sont confirmés par la présence d'un nombre important de protéines orthologues. Si l'on considère l'ensemble des protéines de ces 7 souches (n= 13 233), plus du quart (n= 3 400) est entièrement conservé au sein des 7 espèces considérées et environ 50% des protéines sont présentes chez au moins deux espèces (figure supplémentaire R25). La proportion de gènes spécifiques augmente avec le nombre d'espèce considéré et atteint environ 25% des gènes (n= 4 000) de ces 7 souches (figure supplémentaire R25). Ces gènes pourraient coder des voies de biosynthèses du métabolisme spécialisé. La suite de cette étude se focalisera donc sur les voies du métabolisme spécialisé de ces différentes souches.

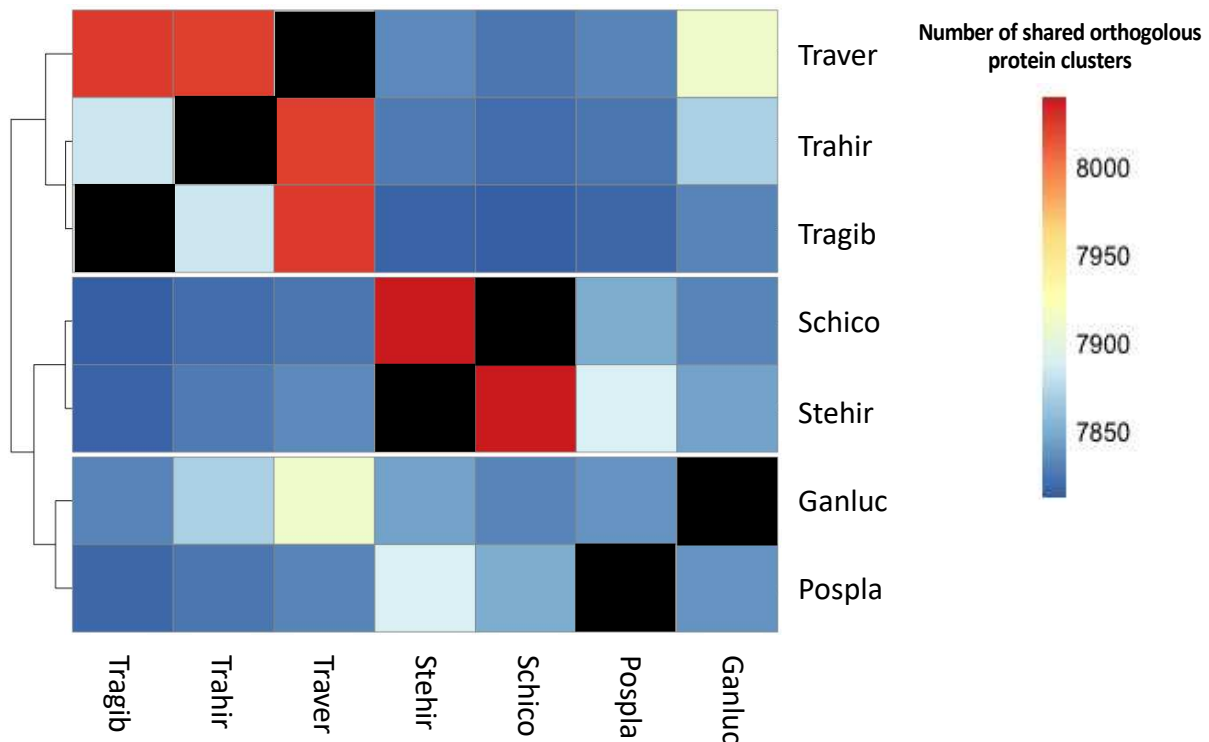


FIGURE R19 : COMPARAISON DEUX A DEUX DES CLUSTERS DE PROTEINES ORTHOLOGUES DES 7 ESPECES DE CHAMPIGNON BASIDIOMYCETES

Après annotation augustus, les séquences protéiques ont été analysés par OrthoVenn2. Les comparaisons deux-à-deux des clusters de protéines orthologues des différentes souches sont représentées sous forme de heatmap. Pospla : *Postia placenta*, Ganluc : *Ganoderma lucidum*, SteHir : *Stereum hirsutum*, SchiCo : *Schizophyllum commune*, Traver : *Trametes versicolor*, Trahir : *TrametesHirsuta* et Tragib : *Trametes gibbosa*

UNE DIVERSITE DES VOIES DE BIOSYNTHESES TRES IMPORTANTES

Les 7 génomes des champignons basidiomycètes ont été analysés *in silico* via Antismash (Blin et al., 2019) dans le but de prédire les différentes voies de biosynthèses et d'estimer leur diversité (figure R20). Un total de 153 BCG a été retrouvé pour l'ensemble des 7 souches avec 15 à 28 voies de biosynthèse par souche. La majorité de ces voies de biosynthèse codent pour des terpènes (n=76) et des NRPS (n=51). Il est connu que les champignons possèdent un terpénome important (pour revue voir Quin et al., 2014). Seuls *Schizophyllum commune* (Fungal RiPPs) et *Stereum hirsutum* (PKS/NRPS hybrids) possèdent une classe de voies de biosynthèse spécifique. Il est a noté que ces deux classes de voies de biosynthèse constitue une source importante de nouveauté et de complexité en termes de composés (Ye et al., 2016).

Antismash est relié à la base de données mibig (Medema et al., 2015) et permet de prédire si des molécules issues des voies de biosynthèse détectées sont déjà connus. Ici, seuls deux composés ont été détectés avec une similarité de 100%. Ils correspondent à 5 voies de biosynthèse sur les 153 prédites. Il s'agit de l'acide clavarique et de la basidioferrine. L'acide clavarique est un terpène connu pour ces activités anti-tumorales (Lingham et al., 1998). La basidioferrine est un sidérophore produit par une voie de biosynthèse NRPS très conservée au sein de la division des Basidiomycètes (Brandenburger et al., 2017). Les 148 voies restantes peuvent correspondre à des composés encore jamais identifiés.

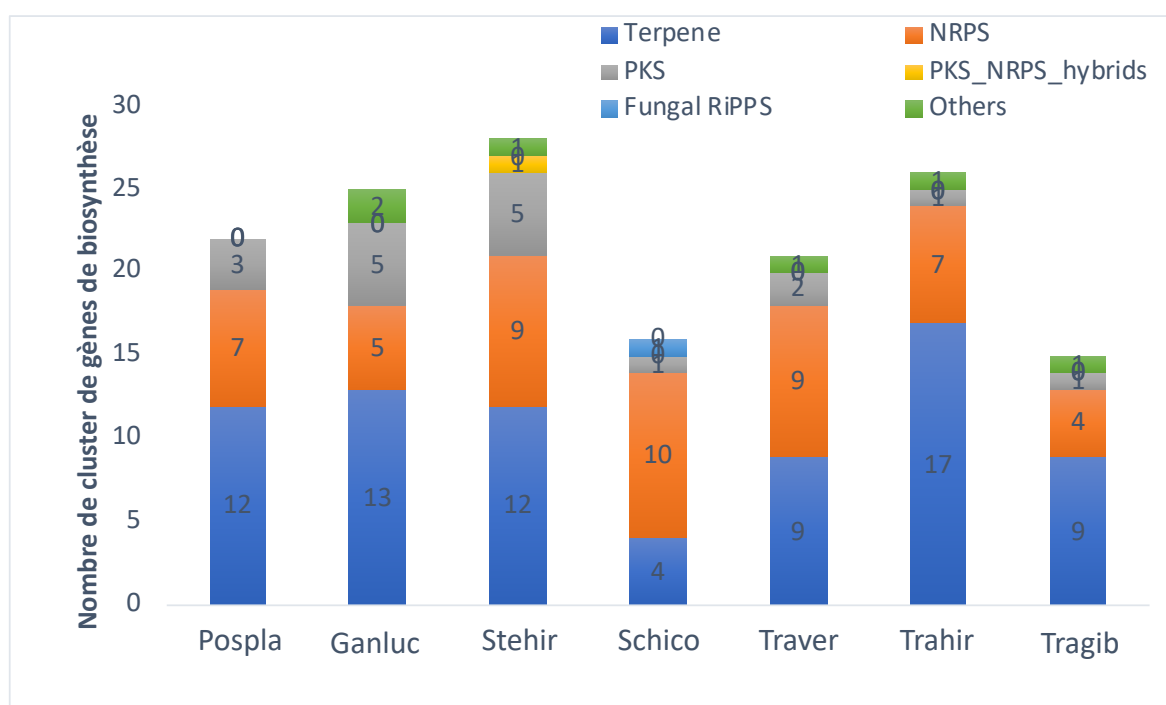


FIGURE R20 : PROPORTION RELATIVE DES VOIES DE BIOSYNTHESE PRESENT CHEZ LES 7 CHAMPIGNONS

Les génomes de champignons ont été analysés par Antismash. Cette plateforme permet d'annoter les voies de biosynthèses présentes dans les champignons. Les résultats obtenus ont été représentés sous forme d'histogramme pour chacune des souches. Chaque couleur indique un type de voie de biosynthèse. Pospla : *Postia placenta*, GanLuc : *Ganoderma lucidum*, SteHir : *Stereum Hirstum*, SchiCo : *Schizophyllum commune*, TraVer : *Trametes versicolor*, TraHir : *Trametes Hirsuta* et TraGib : *Trametes gibbosa*

L'analyse précédente a montré la présence de clusters de protéines conservés alors que d'autres semblent spécifiques de chacun des champignons étudiés. Ces protéines spécifiques pourraient concerner principalement des voies de biosynthèse du métabolisme spécialisé. Pour vérifier cette hypothèse, un réseau de similarité des régions codant des voies de biosynthèse a été réalisé (figure R21).

Grâce à Big-Scape (Navarro-Muñoz et al., **2018**), 142 familles de voies de biosynthèse ont été obtenues. Seules 16 familles soit 50 BCG sont partagées par au moins deux espèces et aucune n'est commune aux 7 espèces. La majorité des voies sont spécifiques puisque 92 familles uniques sont présentes au sein de ces 7 espèces. Il est à noter que 11 voies de biosynthèse sont dupliquées pour 4 espèces de champignons (*Postia placenta*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma lucidum* et *Trametes versicolor*). Les champignons sont des eucaryotes qui peuvent être diploïde voir polyplœide. Cette polyplœidie explique que certains gènes peuvent être dupliqués afin de maintenir une copie dégagée de toute pression de sélection permettant à la copie de muter facilement sans perdre sa fonction de base. Cette faculté de duplication joue un rôle important dans la diversification des voies de biosynthèses des métabolites spécialisés (Kellis et al., **2004**; Wapinski et al., **2007**) ainsi que dans l'évolution des génomes fongiques en général

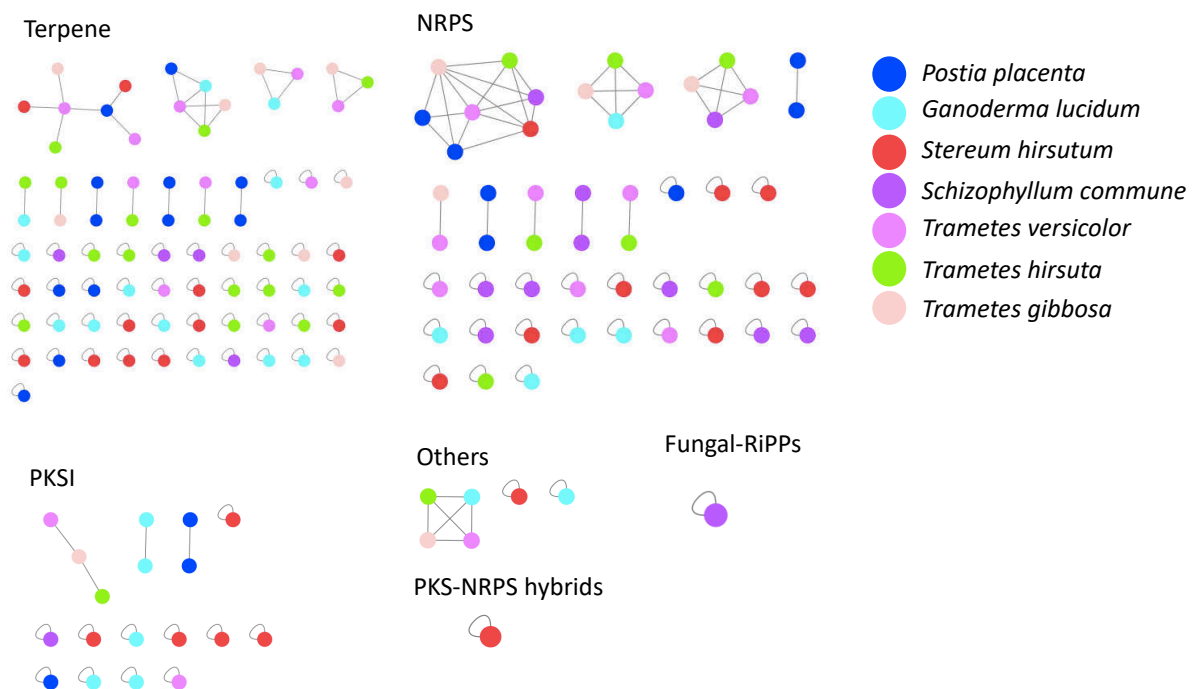


FIGURE R21 : RESEAU DE SIMILARITE DES REGIONS CODANT DES METABOLITES SPECIALISES DES 7 CHAMPIGNONS BASIDIOMYCETES

Les données issues d'Antismash ont été analysées par Big-Scape pour la construction d'un réseau de similarité (cut-off 0.75). Chaque rond représente une région et un trait une similarité entre les voies de biosynthèse. Chaque couleur correspond à une espèce de champignon.

Bien que des légères différences soient possibles, les voies dupliquées seront considérées comme une seule voie de biosynthèse unique dans les analyses suivantes. Les 16 voies de biosynthèse partagées ont été représentés sous forme d'une heat-map (figure R22). Une voie NRPS est présente chez tous les champignons étudiés à l'exception de *Ganoderma Lucidum*. Les trois espèces de *Trametes* possèdent 8 voies communes soit environ un tiers à la moitié de leur potentiel prédit. Ce résultat est concordant avec l'observation précédente sur les protéines orthologues puisque près de la moitié d'entre-elles sont partagées entre ces 3 espèces. Les 4 autres espèces considérées possèdent des gènes communs avec les 3 espèces de *Trametes*. Ces voies communes pourraient être le résultat de conservation de gènes importants intra-genre et ponctuels inter-genre. De plus, il n'existe pas de dichotomie clairement établie mais plutôt un continuum entre les différentes voies de biosynthèses et le type de pourriture comme il l'avait déjà été observé précédemment (Riley et al., 2014a).

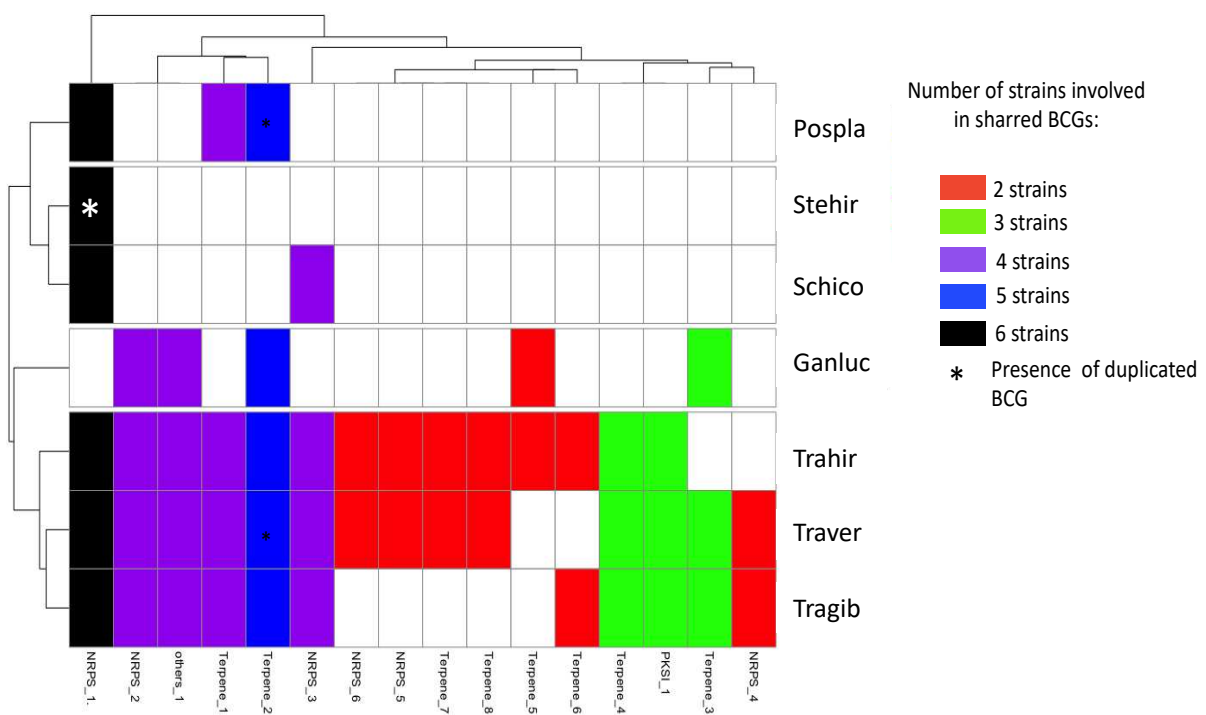


FIGURE R22 : DISTRIBUTION DES VOIES DE BIOSYNTHESE PARTAGEES AU SEIN DES 7 ESPECES DE BASIDIOMYCETES

A partir du réseau de similarité des voies de biosynthèse, une heat map a été créée pour montrer les voies de biosynthèses partagées par les différentes espèces. Pospla : *Postia placenta*, GanLuc : *Ganoderma lucidum*, SteHir : *Stereum Hirstum*, SchiCo : *Schizophyllum commune*, TraVer : *Trametes versicolor*, TraHir : *Trametes Hirsuta* et TraGib : *Trametes gibbosa*

Les 92 voies de biosynthèses spécifiques des 7 espèces ont également été représentées sous forme de heat-map (figure R23). Les deux espèces de *Trametes*, *T. gibbosa* et *T. versicolor* proches phylogénétiquement possèdent le moins de voies de biosynthèse spécifique dont le nombre est respectivement de 4 et de 7 BCG. *Trametes hirsuta* possède 12 voies de biosynthèse spécifiques soit moins de la moitié de son potentiel. Les 4 autres espèces de champignons de genres différents possèdent elles aussi un nombre important de voies de biosynthèse spécifiques : 12 pour *Stereum hirsutum* et *Postia placenta*, 13 pour *Schizophyllum commune* et 19 pour *Ganoderma lucidum*.

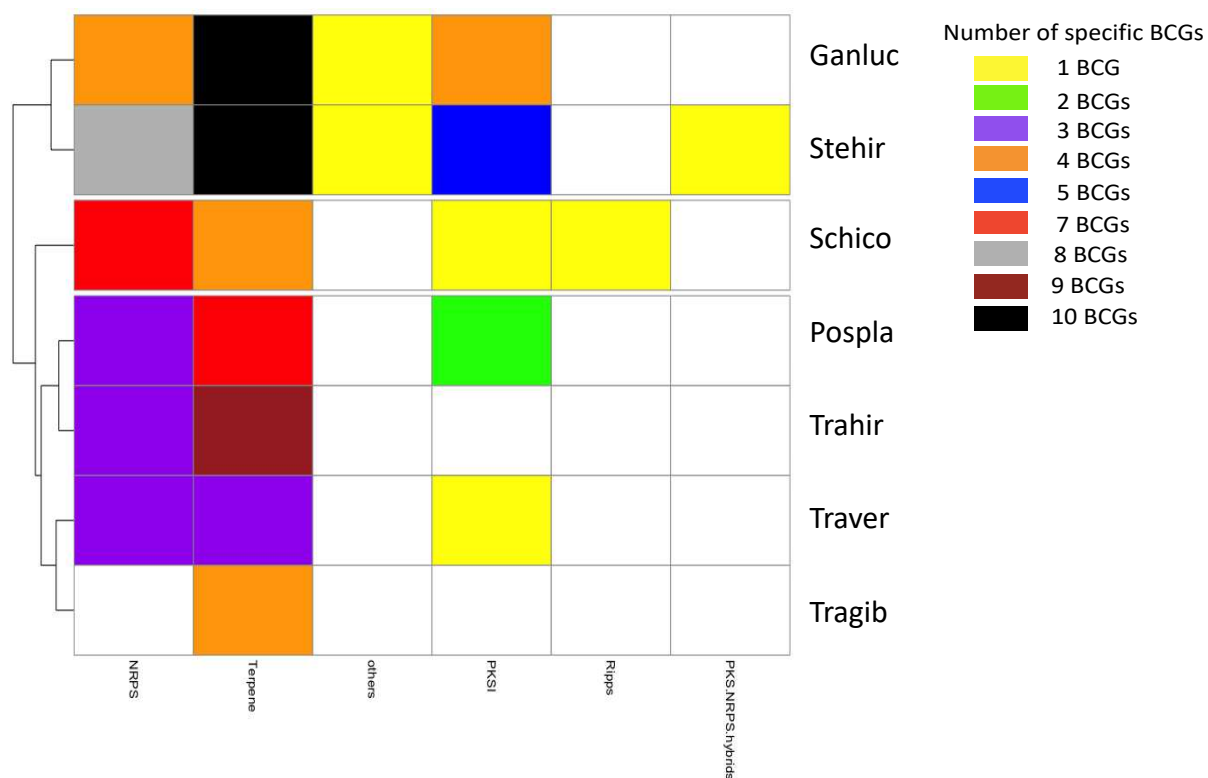


FIGURE R23 : DISTRIBUTION DES VOIES DE BIOSYNTHESES SPECIFIQUES DES 7 ESPECES DE CHAMPIGNONS BASIDIOMYCETES

A partir du réseau de similarité des voies de biosynthèse, une heat map a été créée pour montrer les voies de biosynthèses spécifiques des différentes espèces. Pospla : *Postia placenta*, Ganluc : *Ganoderma lucidum*, Stehir : *Stereum Hirstum*, Schico : *Schizophyllum commune*, Traver : *Trametes versicolor*, Trahir : *Trametes Hirsuta* et Tragib : *Trametes gibbosa*

Pour aller plus loin dans l'analyse de la diversité des souches fongiques, les profils métabolomiques des 7 espèces ont été réalisés. Pour cela, des souches de ces différentes espèces de champignons accessibles au laboratoire ont été utilisées. Après extraction des métabolites, les échantillons obtenus ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV-Visible. La longueur d'onde choisie a été 300 nm (Wagman and Cooper, **1988**). Beaucoup de produits sont des molécules complexes pouvant être conjuguées et donc avoir une longueur d'onde différente de celle du groupement de base. La méthode UV-visible peut être utilisée pour caractériser des souches fongiques (Smedsgaard and Nielsen, **2005**). Les profils ainsi obtenus ont été représentés sous forme de heat-map (figure R24). Avec cette méthode, 644 pics ont été obtenus. La répartition de ces différentes zones (figure supplémentaire R26) a montré que 83% (n=537) des variations obtenues étaient spécifiques de chacune des souches étudiées. De plus, chacune des souches étudiées possède une empreinte chimique unique et non corrélable avec la phylogénie observée précédemment. Ces résultats confirment donc la forte spécificité des molécules potentiellement produites par ces différentes souches. Néanmoins, il sera difficile d'aller plus loin dans l'interprétation de ces résultats car la méthode utilisée ne fournit pas d'informations structurales précises donc ne permet pas de déterminer si les métabolites sont issus du métabolisme primaire ou spécialisé.

De plus, la méthode utilisée possède une forte variabilité couplée à celle intrinsèquement présente dans l'expression des molécules produites par ces souches. Cette variabilité peut également être expliquée par une variation du temps de croissance entre ces différentes souches. En effet, ces champignons ne possèdent pas la même durée de croissance et donc leur l'expression de leur métabolome peut varier de façon considérable.

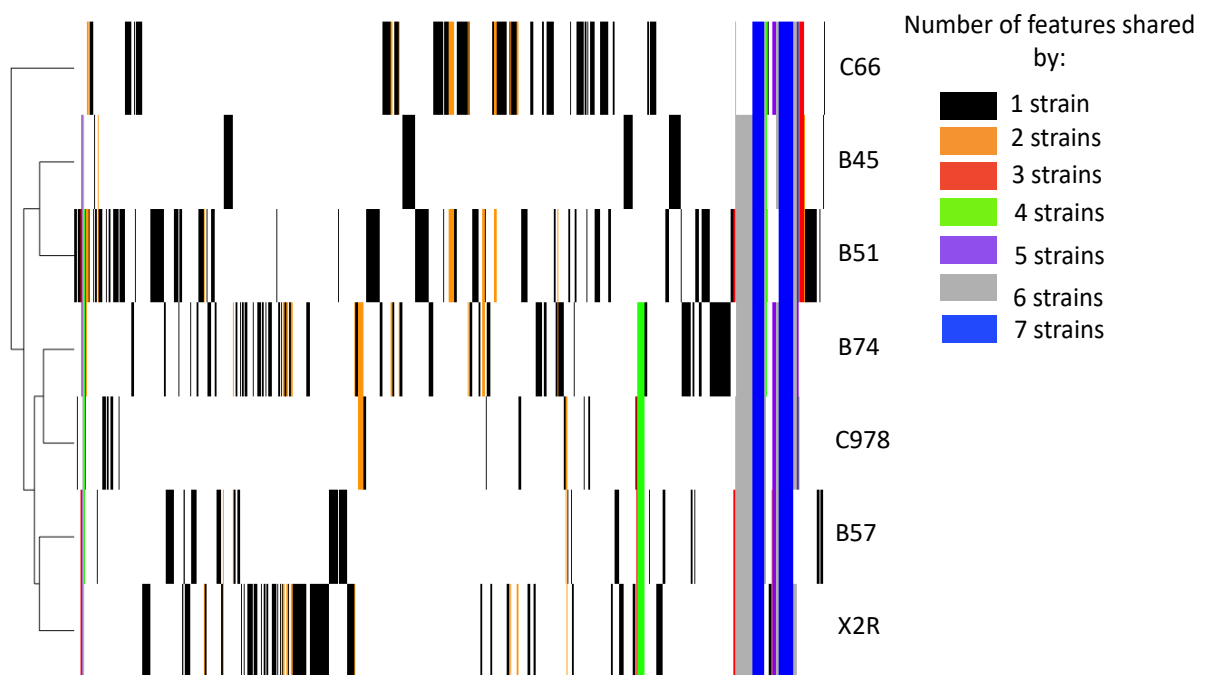


FIGURE R24 : PROFILS CHIMIQUES DES 7 SOUCHES UTILISEES LORS DE CETTE THESE

Les profils chimiques obtenus par chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV-Visible ont été représenté sous forme d'une Heat-map. Chaque trait représente un pic. La couleur des traits indique le nombre de souche partageant ou non les mêmes pics. B45 : *Trametes versicolor* Basidio 45, B74 : *Trametes gibbosa* Basidio 74, B51 : *Trametes hirsuta* Basidio 51, B57 : *Stereum hirsutum* Basidio 57, X2R : *Ganoderma resinaceum* 2R0112, c66 : *Schizophyllum commune* 66-01A, c978 : *Postia placenta* PP978/9

CONCLUSION

Pour conclure, une diversité et une spécificité importante des voies de biosynthèses chez les champignons Basidiomycètes sont observées. Il n'y a également pas de dichotomie clairement établie entre la distribution des voies de biosynthèse et le type de pourriture. Il sera donc intéressant d'exploiter ce potentiel de production par l'activation des voies concernées. Les profils chimiques ont révélé le potentiel réellement exprimé et produit par ces souches. Cette production est importante et spécifique. Par exemple, une approche de co-culture pourra être utilisée pour induire l'expression de ces voies de biosynthèses chez des souches dont le potentiel de production pourrait être plus faible. Pour aller plus loin dans la caractérisation et confirmer la diversité chimique obtenue, l'apport de la spectrométrie de masse sera un avantage majeur et des profils métaboliques pourront être réalisés.

Au cours du chapitre précédent (chapitre R2), nous avons observé une conservation du génome au sein d'un même genre bactérien. Ici, le même phénomène est observé au sein de la division des Basidiomycètes. Ce résultat est étonnant car il s'agit d'espèces et de genres différents. Cette conservation du génome pourrait correspondre à des gènes impliqués dans des voies de biosynthèse de métabolites primaires. Des gènes sont également dupliqués au sein de plusieurs espèces de champignons de la division des Basidiomycètes. Cette duplication peut agir comme moteur de la diversification des métabolites spécialisés et ainsi expliquer la diversité des voies de biosynthèse observées.

DONNEES COMPLEMENTAIRES

Species	Proteins	Clusters	Singletons
Tragib	11,240	7,236	2,056
Trahir	12,163	7,613	2,551
Traver	14,590	8,191	3,450
Stehir	12,896	6,862	2,871
Schico	13,388	6,424	3,339
Pospla	23,969	7,676	2,774
GanLuc	14,212	7,431	3,395

TABLEAU R10 : NOMBRE DE PROTEINES, NOMBRES DE CLUSTERS DE PROTEINES ORTHOLOGUES ET NOMBRE DE PROTEINES ORTHOLOGUES UNIQUES

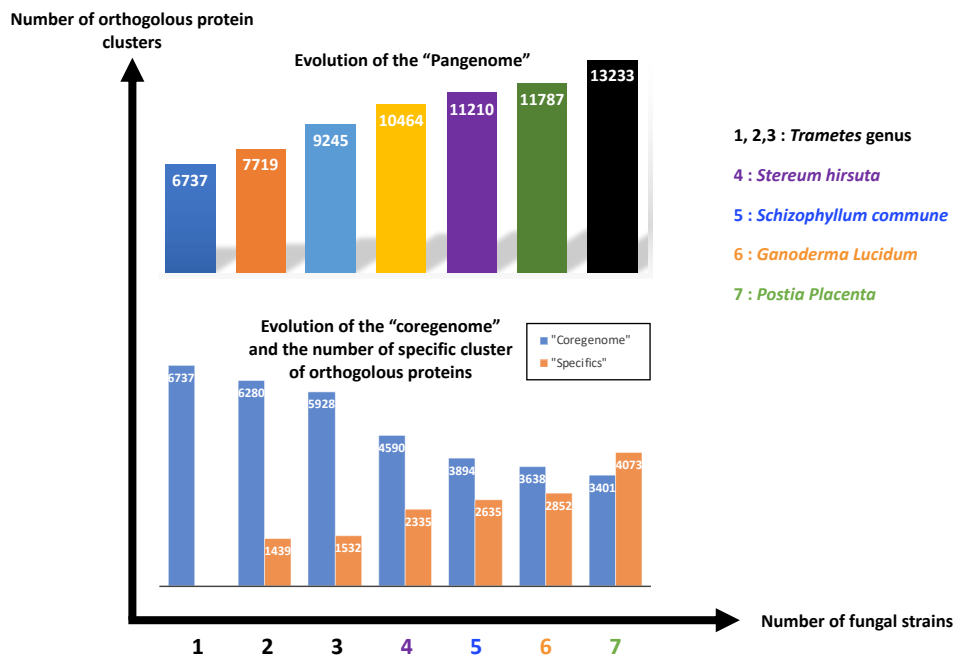


FIGURE R25 : EVOLUTION DU NOMBRE DE CLUSTERS DE PROTEINES ORTHOLOGUES TOTALES, CONSERVEE ET SPECIFIQUE EN FONCTION DU NOMBRE ET D'ESPECES DE CHAMPIGNONS BASIDIOMYCETES

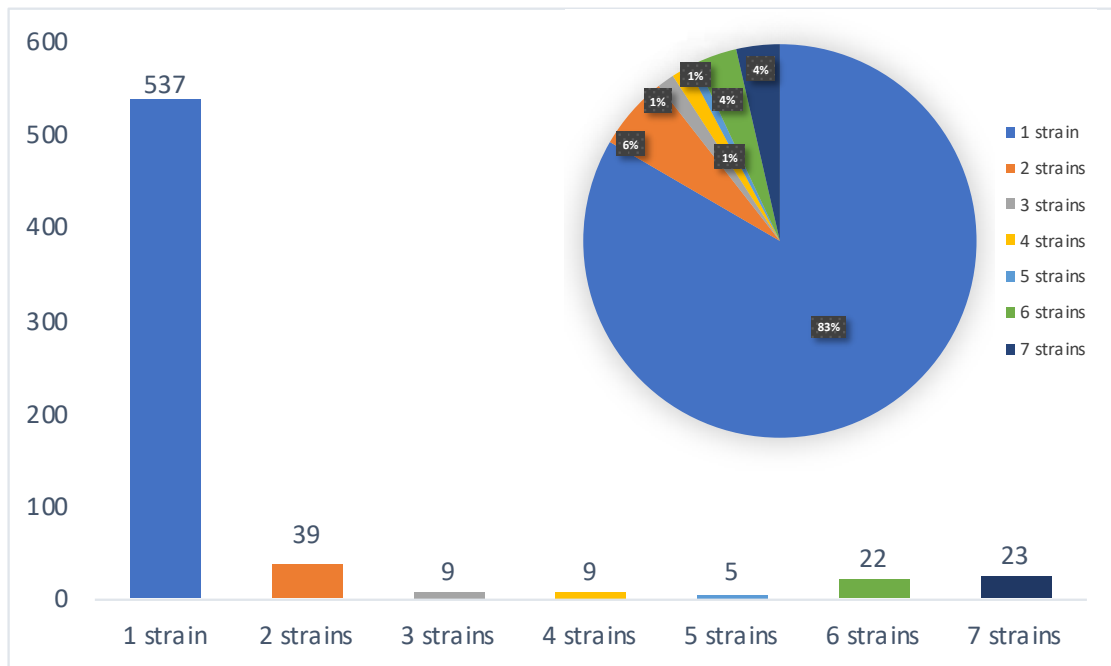


FIGURE R26 : DISTRIBUTION DES ZONES DE CHROMATOGRAMMES EN FONCTION DU NOMBRE DE SOUCHES DE CHAMPIGNONS BASIDIOMYCETES

CHAPITRE R4 : INDUCTION DE COMPOSES ACTIFS ANTIMICROBIENS PAR
DES CO-CULTURES ENTRE *STREPTOMYCES* ET CHAMPIGNONS

Elicitation of antimicrobially active compounds by *Streptomyces*-Fungus co-cultures

Matthieu Nicault, Ali Zaiter, Stéphane Dumarçay, Patrick Chaimbault, Eric Gelhaye, Cyril Bontemps and Pierre Leblond

Article 3 : Soumis dans **MDPI Microorganisms** le 06/10/2020

RESUME DES RESULTATS EN FRANÇAIS :

Au cours des chapitres précédents, il a été démontré que les souches bactériennes et fongiques étudiées présentent un fort potentiel de production de métabolites spécialisés. Ce potentiel n'est néanmoins pas toujours exprimé et ne peut donc pas être exploité au laboratoire. Une façon d'induire et d'exploiter ce potentiel est d'utiliser la co-culture. Cette méthode repose sur le postulat que dans la nature, les micro-organismes produisent des métabolites spécialisés qui jouent un rôle dans leurs interactions avec leur environnement biotique et abiotique. Ces molécules peuvent également être utilisées par l'homme notamment pour la conception de nouveaux antibiotiques. L'objectif de cette partie sera de présenter les résultats obtenus lors de l'étude des interactions entre les souches bactériennes et fongiques choisies dans le cadre de cette thèse.

Les co-cultures ont été réalisées sur milieu GA solide sur des boîtes de Petri. Chaque partenaire a été ensemencé aux extrémités et à l'opposé sur boîte de Petri. Les zones d'interaction résultantes ont été appelées « Streptomyces-Fungus Interaction Zones » ou SFIZ. Les molécules présentes dans les zones d'interactions et dans les témoins ont été extraites et la présence de métabolites spécialisés antimicrobiens a été testée sur la croissance de la souche indicatrice *Bacillus subtilis* ATCC6633. Plusieurs témoins (monocultures) possédaient une activité antimicrobienne à l'exception de *Schizophyllum commune* 66-01A et de quatre souches de *Streptomyces* RLB1-9, RLB1-33, S1D4-11 et S1D4-23. Seules les deux zones d'interactions entre *Schizophyllum commune* 6601A et les deux souches de *Streptomyces* S1D4-11 et S1D4-23 ont montré une inhibition importante de la croissance de la souche indicatrice. Ces deux interactions appelées S1D4-11-FIZ et S1D4-23-FIZ ont été sélectionnées pour la suite de l'étude.

Une approche métabolomique (GC-MS et LC-MS) a été utilisée démontrant la spécificité des profils métaboliques trouvés au sein des SFIZ comparés à ceux des monocultures. Dans la continuité de ce travail, un fractionnement bio-guidé a permis de mettre en évidence la présence de composés potentiellement antimicrobiens au sein de ces SFIZs. Des expériences complémentaires restent nécessaires pour identifier formellement les molécules d'intérêt (fractionnement plus précis, utilisation de la RMN pour l'élucidation structurale, ...).

Elicitation of antimicrobial active compounds by *Streptomyces*-Fungus co-cultures

Matthieu NICAULT^{1,2}, Ali Zaiter⁴, Stéphane DUMARCAY³, Patrick CHAIMBAULT⁴, Eric GELHAYE², Pierre LEBLOND¹, Cyril BONTEMPS¹

¹ Université de Lorraine, INRAE, DynAMic, F-54000 Nancy, France.

² Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France.

³ Université de Lorraine, INRAE, LERMAB, F-54000 Nancy, France.

⁴ Université de Lorraine, CNRS, ICPM, F-57000 Metz, France.

Keywords: *Streptomyces*, fungus, co-culture, specialized metabolism, biosynthetic gene cluster, antimicrobial agents

Running title: Antimicrobial activities induced by *Streptomyces*-fungal co-cultures

Abstract

The bacteria of the genus *Streptomyces* and Basidiomycete fungi harbor many biosynthetic gene clusters (BGCs) that are at the origin of many bioactive molecules with medical or industrial interests. Nevertheless, most of BGCs are not expressed in standard lab growth conditions preventing the full metabolic potential of these organisms from being exploited. Because it generates biotic cues encountered during natural growth conditions, co-culture is a mean to elicit such cryptic compounds. In this study, we explored 72 different *Streptomyces*-fungus interaction zones (SFIZs) generated during the co-culture of 8 *Streptomyces* and 9 fungi. Two SFIZs were selected because they showed an elicitation of an anti-bacterial activity compared to mono-cultures. The study of these SFIZs showed that co-culture had a strong impact on the metabolic expression of each partner and enabled the expression of specific compounds. A dereplication approach was applied to determine the nature of the compound(s) produced during co-cultivation and allowed the identification of potential candidates. These results show that mimicking the biotic interactions present in the ecological niche is promising to explore the metabolic capacities of *Streptomyces* and fungi.

Introduction

Microorganisms form complex multispecies communities in all environments (e.g. the soil, the oceans, the microbiota...) where they play key roles. In soil, they contribute to homeostasis in participating to biogeochemical cycles (Deveau et al., **2018**) or in improving nutrients availability for plants (Velez et al., **2018**). Bacteria and fungi of a same community are in constant interaction (commensalism, mutualism, competition or antagonism) that can affect their growth or induce more specific behaviors such as pathogenicity (Frey-Klett et al., **2011**). These bacterial-fungal interactions (BFIs) are often driven by the production of specialized metabolites (SMs). These latter can have a direct impact (antibiosis, sugar degradation...) but can also act as communication signals and trigger expression of other specific biosynthetic pathways in other niche inhabitants (Netzker et al., **2015**). Among these SMs, some exhibit interesting biological properties as potent antimicrobials and represent a source for the conception of new drugs (Martín and Liras, **2019**).

In that respect, fungi and the bacteria of the genus *Streptomyces* are of special interest as they provide alone 42% and 32% of the natural products used in the human and veterinary medicine respectively (Bérdy, **2005**). For *Streptomyces*, genomic analyses have shown that they possess between 20 to 50 biosynthesis gene clusters (BGCs) predicted to produce specialized metabolites (Baltz, **2017**; Nicault et al., **2020**). Yet, *Streptomyces* strains are generally used for the production of a single or a few compounds. For example, *Streptomyces griseus*, the producer of the antibiotic streptomycin (Waksman et al., **1949**) and *Streptomyces avermitilis*, the producer of the polyketide anthelmintic avermectin (Ikeda et al., **1999**) possess 34 and 25 BGCs, respectively (Ohnishi et al., **2008**; Ōmura et al., **2001**).

The genetic model *Streptomyces coelicolor* A3(2) on its part was known for long times to encode only three antibiotics (aromatic polyketide antibiotic actinorhodin, oligopyrrole prodiginine antibiotics and the non-ribosomal peptide CDA) (Bentley et al., **2002**; Borodina, **2005**) although its genome contained contains 20 BGCs (Bentley et al., **2002**). The access to the genome sequences of many other species since that early times confirmed that the potential to code for specialized metabolites far exceeds the activities and compounds which can be identified based on bioassays or direct molecules detection, and that most BGCs remain silent in standard laboratory conditions (Rutledge and Challis, **2015**).

It is therefore important to find new methods to explore and to induce the production of specialized metabolites by activating these biosynthetic pathways (Brakhage and Schroeckh, 2011; Mao et al., 2018) and many methods were developed in that purpose in the past decades. For instance, it has been successfully achieved by rewiring regulatory networks (overexpression or inactivation of positive specific regulators or repressors (Xia et al., **2020**), ribosome engineering, regulatory unlocking, heterologous expression (Laureti et al., **2011**; Myronovskyi and Luzhetskyy, **2019**; Ochi, **2017**) or in modifying randomly parameters of culture conditions (e.g. nutrient source, culture medium) (Almeida et al., **2020**) to reveal specific physical-chemical conditions allowing the expression of a silent BGC. However, in the recent years, there was a regain of interest to express cryptic SMs in the lab through co-culture approaches (Bertrand et al., **2014**). Biotic stresses are indeed likely to trigger adaptive responses (competitive weapons, hormones, communication molecules...) in mimicking signals emitted by community co-inhabitants (Netzker et al., **2018b**).

Co-cultures were described with various bacteria and fungi (Bertrand et al., **2014**). Regarding fungi, wood decaying fungi have been already used (El Ariebe et al., **2016**; Hiscox et al., **2018**) and are of special interest as they are known to control and modify bacterial communities in their environment (Christofides et al., **2019**; Hervé et al., **2014**) in particular through metabolites production and pH modification (Johnston et al., **2016**). They are thus good candidates to produce antibacterial compounds or to trigger such production in interaction.

For bacteria, as *Streptomyces* remain one of the main source of SMs, they were often co-cultivated together (Traxler et al., **2013b**; Ueda et al., **2000**) or with other bacterial genera (Charusanti et al., **2012**; Luti and Mavituna, **2011**; Onaka et al., **2011**; Pérez et al., **2011**). *Streptomyces*-fungi co-cultures are on the other hand rarer despite they showed promising results. For instance, co-cultures of *Aspergillus fumigatus* MR2012 with *Streptomyces leeuwenhoekii* C34 (Wakefield et al., **2017**) or *Streptomyces rapamycinicus* and the model fungus *Aspergillus nidulans* (Schroeckh et al., **2009**) led to the production of new compounds.

The aim of our work was to exploit a *Streptomyces* strain collection isolated from the same soil microhabitat in co-cultures with different wood decaying fungi in order to stimulate the production of antibacterial compounds. Bi-partite co-cultures were set up and the antimicrobial activity was assessed against indicator bacterial strains (mostly Bacilli). Monitoring the antimicrobial activity was used as a screen throughout the analytical processes. Here we observed an important induced chemical diversity that explains some mechanisms of microbial interactions. Activity guided splitting led to the detection of 32 compound candidates that could be responsible of the induced antimicrobial activities.

Results and discussion

Induction of antibacterial activities by *Streptomyces*-fungus co-culture

To set up bacterial-fungal co-cultures, we used two collections of the soil dwelling bacterium *Streptomyces* and of forest basidiomycetes available in our laboratories (Fig. 1).

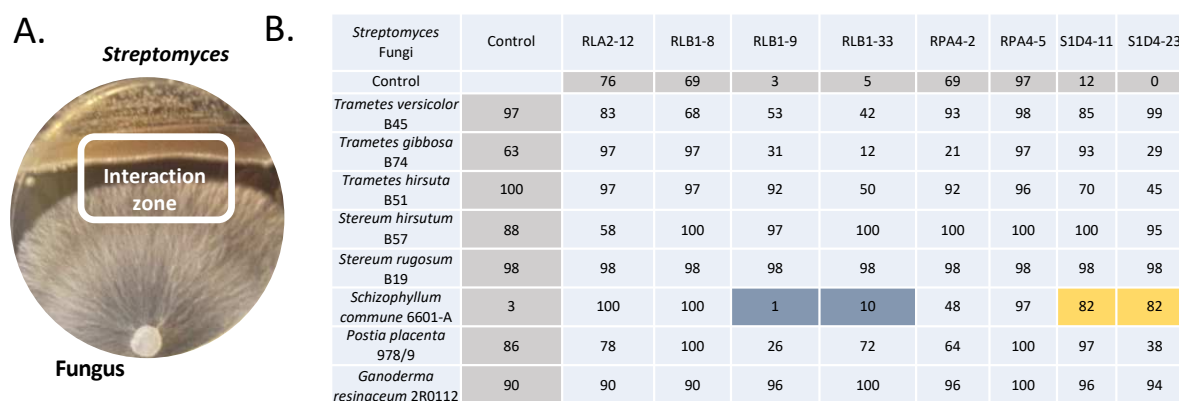


Figure 1: *Streptomyces*-fungus co-culture set-up and screening. **A.** Illustration of a *Streptomyces* fungus co-culture after 14 days of growth. **B.** Screening of bioactive molecules elicited during the co-culture. The compound extracts of mono-cultures of fungi and *Streptomyces* (rows and columns named control) in GA medium were compared with the extracts resulting of their co-culture in a bioassay experiment against the growth of *B. subtilis* ATCC6633. The values in the table indicated the percentage of inhibition of *B. subtilis* ATCC6633 after a 24 h growth in comparison with a control grown in absence of extract. The two co-cultures between *S. commune* 6601-A with S1D4-11 and S1D4-23 were selected as they presented a significant (p value < 0.05) impact on the growth of *B. subtilis* ATCC6633 in comparison with the controls.

On the one hand, the bacterial collection was constituted of 8 *Streptomyces* isolated from the same forest soil micro-habitats and belonging to same or different species as previously described in Nicault et al. (Nicault et al., 2020). Their genome sequences were determined and showed a great diversity of their specialized metabolite biosynthetic gene clusters (BGCs) with 261 BGCs identified for the 8 strains (Nicault et al., 2020). On the second hand, the fungal collection was constituted by wood decaying basidiomycetes.

Beside the well-known ability of wood decaying fungi to control bacterial communities (Hervé et al., 2016; Johnston et al., 2019), the fungi have been chosen for their potential to produce antimicrobial products (Aqueveque et al., 2017; Cilerdzic and Vukojevic, 2016; Han et al., 2013; Knežević et al., 2018; Riley et al., 2014b) as for instance the genera *Trametes* (Moody, 2014) or *Stereum* (Tian et al., 2020). In our experimental design, bacterial and fungal couples were grown on agar plates at each side of the petri dishes (Fig. 1.A) generating a *Streptomyces*-Fungus Interaction Zone named SFIZ. Similar design was previously used to reveal compounds induced during co-cultures as for instance with marine fungi (Oppong-Danquah et al., 2020). In our case, it had the advantage to enable the interaction either by diffusible signal in the agar or by contact between the two partners, two interaction types already described in *Streptomyces* and fungal co-cultures (Fischer et al., 2018; Khalil et al., 2019). As nutritive sources can have a profound effect on specialized metabolism expression, we used a single growth medium that is the GA medium commonly used for *Streptomyces* culture.

Our initial collection consisted of 8 *Streptomyces* and 9 fungi and all of them at the exception of *Phaeolus schweinitzii* were able to grow on GA medium, giving 64 different co-cultures (Fig. 1B). In order to survey the impact of co-culture on metabolome, we focused on metabolites that were expressed specifically through co-culture, that is to say those that remained cryptic in mono- cultures. For that purpose, we tested the inhibition activity of the ethyl acetate extract of the inhibition zone in comparison to the mono-culture controls against the commonly used gram + bacteria indicator *Bacillus subtilis* ATCC6633 strain (Fig. 1B). Each interaction was screened once and only experiments showing an elicitation by co-culture of the anti-*Bacillus* activity were repeated 5 times. Two out of 64 interactions revealed co-culture elicitation (Fig. 1B).

This number is in the same range as reported in Schroeck *et al.* where elicitation was found in one interaction out of 58 between *Aspergillus nidulans* and different *Streptomyces* (Schroeck *et al.*, 2009). In our case, most controls, either bacterial or fungal, showed an activity against *B. subtilis* ATCC6633 and prevented to reveal a potential elicitation in our screening. This result confirms that fungi and *Streptomyces* are a prominent source of bioactive molecules and we can speculate that the number of elicitations is here probably underestimated.

The two selected couples were both composed of the fungus *S. commune* 66-01A with *Streptomyces* S1D4-11 or S1D4-23. *S. commune* is a wood decay fungus that can induce melanin, indole, flavonoids and carotenoids when grown in presence of co-occurring bacteria or fungi (Krause *et al.*, 2020) It also represents a good interaction model with *Streptomyces* as it was shown to restore hyphal formation deficient phenotypes in some strains (Tillotson *et al.*, 1998). S1D4-11 and S1D4-23 are closely related, but different species of *Streptomyces*. Based on data from our previous study, each were predicted to harbor 36 BGCs with 25 in common and 11 specific ones (Nicault *et al.*, 2020),(Nicault *et al.*-Sup fig S1 comparaison BGCs). It can be noticed, that the two other *Streptomyces* RLB1-33 and RLB1-9 that showed no anti-*B. subtilis* activity in monoculture (Fig. 1.B) had no induced capacity in their SFI zones with *S. commune*. This result highlights that whether the elicited activity came from the fungus or the bacteria, it was specific between *S. commune* and the strains S1D4-11 and S1D4-23.

Interactions with elicitation against *B. subtilis* ATCC6633 were named S1D4-11-FIZ and S1D4-23-FIZ. They were tested against three additional environmental *Bacillus* strains, isolated from the same soil than the *Streptomyces* collection (Fig. 2) and strains RB2-2N12 and RB2-2N10 appeared sensitive to the SFIZ extracts although at different levels in comparison with controls.

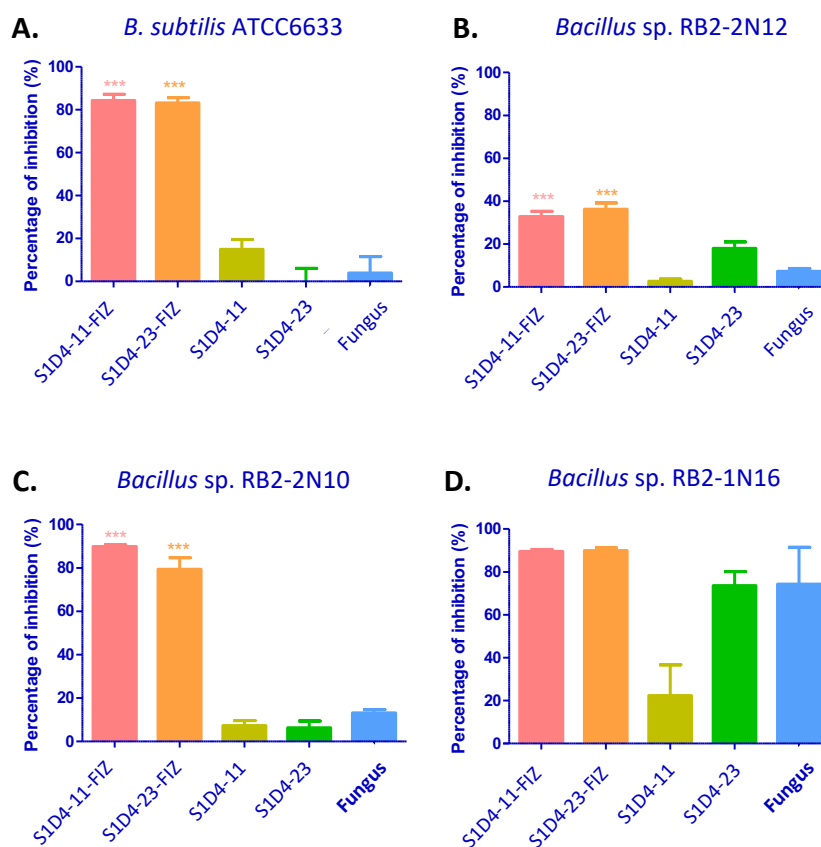


Figure 2: Antimicrobial activities of S1D4-11-FIZ and S1D4-23-FIZ against different *Bacilli*. Inhibition was quantified as a percentage of growth inhibition in comparison with a control without extract. The growth was measured by spectrometry at OD 600nm after 24 h of growth. The different *Bacilli* strains are **A.** *Bacillus subtilis* ATCC6633, **B.** *Bacillus* sp. RB2-2 N12, **C.** *Bacillus* sp. RB2-2 N10 and **D.** *Bacillus* sp. RB2-1 N16. Statistical difference was assessed with a *t*-test. *** = *p* value < 0.005 for both comparisons between fungus and SFIZ and *Streptomyces* and SFIZ.

Antibacterial activity of S1D4-11-FIZ and S1D4-23-FIZ extracts were also tested against other indicator strains: *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Escherichia coli* ATCC25922, *Enterococcus faecalis* ATCC292212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, *Klebsiella pneumonia* ABC42 and *Enterobacter cloacae* ABC291. No significant activity was detected against these bacterial species (data not shown).

Although we did not perform an extensive screening and only revealed anti-*Bacillus* activities, our results show that co-culture easily revealed antibacterial activities not expressed in standard lab conditions. This extended approach to other bacteria of interest, such as antibiotic multi-resistant bacteria, should provide a simple and easily generalizable means of discovering new biomolecules.

Impact of co-culture on metabolome

In order to decipher the metabolic impact of co-culture, a molecular profiling of the two selected SFIZs as well as the corresponding pure culture extracts were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS). Based on ions extracted from mass spectra, 2,796 features were detected with the MzMine 2 software. Partial Least Square-Discriminant analysis (PLS-DA) showed that each extract (controls and SFIZs) produced different metabolites and can be discriminate from the others (Fig. 3.A). From the PLS-DA, discriminating variables (26%) were compared in a heatmap (Fig. 3.B) and only showed little overlap, giving a unique and specific bar code for each condition. These results first showed that mono-cultures extracts are different and that each microbe had a specific metabolomics signature. Secondly, the extracts from the co-cultures differed from their controls indicating that a specific production of compounds was induced during the interaction.

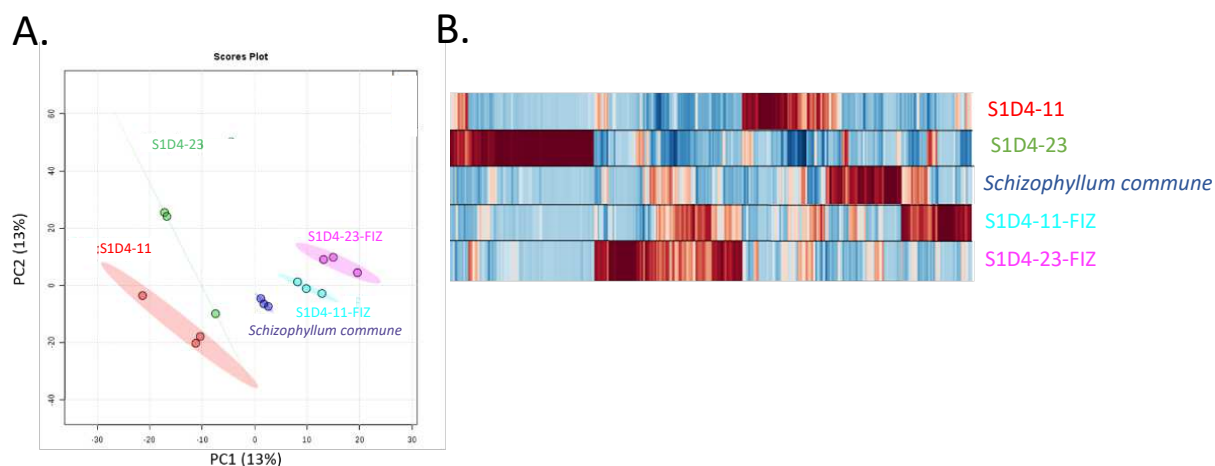


Figure 3: GC-MS spectrum comparison. **A.** PLS-DA comparison of GC-MS spectra of mono- and co-cultures. **B.** Heat-map of the first 750 discriminant features (26%) revealed by PLS-DA. The scale indicates the relative abundance of features calculate by centred-reduced of initial intensity.

To get access to more polar and soluble compounds (Halket et al., **2005**), SFIZ and control extracts were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. In the co-culture experiment between S1D4-11 and *S. schizophyllum*, **387** features were identified in the fungus extract, **163** in the bacterial extract and **225** in the SFIZ extract (**Fig. 4**).

Molecular networking

To identify the chemical actors of these specific metabolic responses a LC-MS molecular networking with GNPS that gathers MS/MS spectra into networks corresponding to chemical families was performed. In total, 187 networks were detected with 169 identified as chemical families (**Fig. 5**). On these 187, 52 networks are related to SFIZs which gave 321 SFIZs compounds. The non-identified molecule families (labelled “no matches”) could correspond to new type of molecules and half of the 321 SFIZs compounds were present in this category. It might suggest that the co-culture induced a less characterized metabolism than single cultures that can be the source of innovative molecules. Four networks were found to be specific of one or both SFIZs. Among them, S1D4-11-FIZ presented specific oligosaccharides, S1D4-23-FIZ phytoceramides and vinyl bromides and both SFIZs had specific alkaloids and derivatives compounds that can have pharmaceutical properties, including antibacterial activities (Gurudeeban et al., **2013**).

Bio-directed splitting

To identify potential compounds responsible of the *Bacillus* inhibition activity that guided our co-culture screening, we performed a dereplication analysis of the two SFIZ extracts. Extracts (solubilized in methanol as DMSO was disruptive to our analytic device at this step) were fractionated into 27 fractions by a chromatographic separation (C18 reverse phase) *prior* MS/MS detection. For both SFIZ extracts, the activity against the indicator strain was only found in two fractions (N°22 and 23). To identify potential candidates induced during the studied interactions, we selected compounds found in the fractions 22 and 23 and in SFIZs but not in the controls (**Fig. 6**). As controls extracts were solubilized in DMSO (see previous paragraph), we restricted this analysis to SFIZ extract molecules found in both DMSO and methanol recognizing that some methanol-soluble and DMSO-insoluble candidates could be omitted.

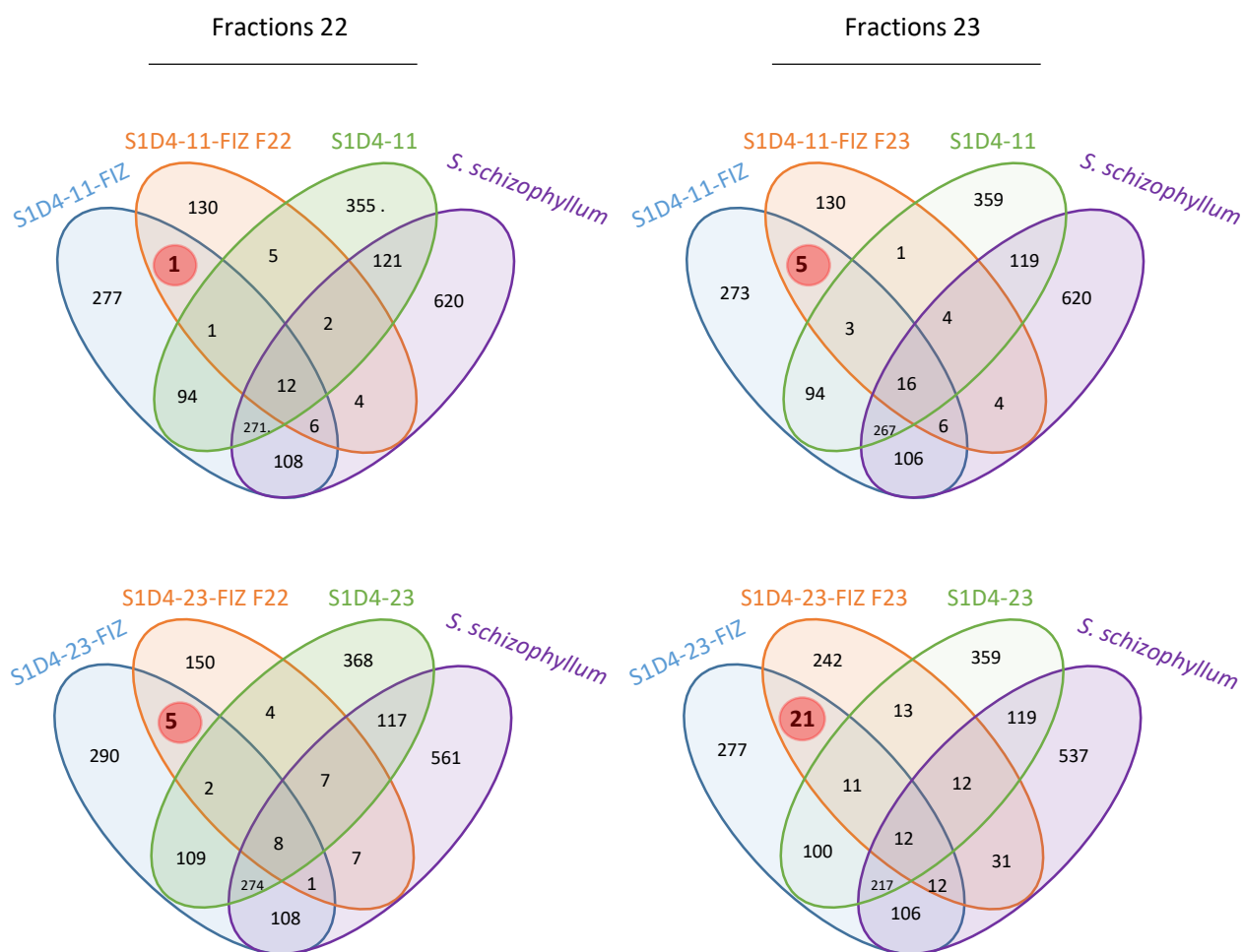


Figure 6: Identification of specific compounds in bioactive fractions. LC-MS spectra of fractions N°22 and N°23 (named S1D4-11-FIZ F22 and S1D4-23-FIZ F23) with anti-*Bacillus* activity were compared with single culture controls and as well with total extract of SFIZ in DMSO that also has similar activity. Compounds with potential activities (highlighted in red) are those at the intersection of the total SFIZ extract and in the fraction considered. Number of features found in each condition is indicated. Features were analyzed and compared with DEREPLICATOR+ in order to build the Venn diagram.

LC-MS spectra were analyzed and compared with DEREPLICATOR+ (see materials and methods), an algorithm that enables the identification of peptidic natural products and other major classes of molecules (e.g. polyketides, terpenes, benzenoids, alkaloids, flavonoids) with potential antibacterial activities. All detected compounds were well predicted with DEREPLICATOR+ scores between 12 and 39 (table 1).

Fraction	Compounds	Molecular class	Mass (Da)	Score*
S1D4-11-FIZ-F22	Boletinin_H	Carboxylic acid and derivatives	418.24	13
S1D4-11-FIZ-F23	hippolide_H	Sesterpenoids	418.27	12
	Daldinin-B2	Alkaloids and derivatives	474.33	13
	Oudemansin_L	Alcohols	474.26	15
	Fumonisin_P2	Carboxylic acid and derivatives	784.41	15
	janthinolide_A	Piperidone	448.22	14
S1D4-23-FIZ-F22	delta-8'-Merulinic_acid-A	Carboxylic acid and derivatives	390.28	14
	Trichodepsipeptide_B	Cyclic depsipeptides	674.39	12
	petroaspailyne_A1	/	252.17	14
	9,10,12,13-Tetrahydroxyheneicosanoic_acid	Carboxylic acid and derivatives	390.30	14
	Aureobasidin-U2	Sphingolipids	1072.66	39
S1D4-23-FIZ-F23	CB-182130	Peptide	1628.76	27
	theonellapeptolide_IV	Peptide	1361.89	25
	Pseudotrienic_acid_A	Carboxylic acid and derivatives	546.37	22
	hippolide_F	Diterpenoids	418.27	12
	1-hydroxyyanuthone_C	Sesquiterpenoids	418.24	13
	Pyoverdin_TII	Oligopeptides	1092.46	17
	phakellistatin_3	Peptides	814.40	18
	Leupeptin_acid	Carboxylic acid and derivatives	442.29	16
	delta-8'-Merulinic_acid-A	Carboxylic acid and derivatives	390.28	14
	petroaspailyne_A1	/	252.17	12
	Biverlactone_C	Carboxylic acid and derivatives	336.19	16
	janthinolide_A	Piperidone	448.22	18
	Viridiofungin_Z2	Carboxylic acid and derivatives	414.26	15
	cis-7-tetradecenoyl-D-asparagine_structure_1	Amino acid and derivatives	340.24	12
	Octadecanamide	Carboxylic acid and derivatives	283.29	13
	Aureobasidin-T3	Sphingolipids	1100.69	16
	perthamide_K	Peptides	984.46	21
	FR_900403	Peptides	393.18	12
	Streptothricin_F_acid	Delta Amino acid and derivatives	520.26	14
	mixirin_A		1000.50	13
Aureobasidin-U2	Sphingolipids	1072.66	20	

Table 1. Specific compounds identified with DEREPLICATOR+ in bioactive fractions with potential anti-*Bacillus* activity * Score values correspond to the number of shared peaks between experimental spectrum with theoretical spectrum

For the four fractions, one specific compound was identified in fraction 22 of S1D411-SFIZ, 5 in fraction 23 of S1D411-SFIZ, 5 in fraction 22 of S1D423-SFIZ and 21 in the fraction 23 of S1D4-23-FIZ. For each co-culture couple, no compound was common between the two fractions, indicating that different molecules can be responsible of the anti-*Bacillus* inhibition activity or that a low concentration in a fraction in comparison to the other prevents its detection by MS, but not the biological activity.

Out of the 32 identifications, 31% (n=10) were classified as carboxyl acid and derivatives and 15% (n=5) as peptides. These two major molecule classes in addition with cyclic depsipeptides, diterpenoids or sesquiterpenoids encompass many antibacterial compounds. Other classes such as sphingolipids (n=3) are more related to membrane constitution and could result from physiological modification of the partners or be involved during the mechanism of the co-culture. For example, plants alkaloids derivatives have both antimicrobial and radical scavenging activities that could be useful to trap ROS induced during bacterial and fungal interactions (Gurudeeban et al., 2013). Defining which partner produce these different compounds was difficult to determine, and unfortunately, no strict correlation could be made between them and the BGCs present in the *Streptomyces* genomes. It can be noticed that few compounds were common between the two SFIZs. As the fungal partner is the same in both co-cultures, this suggests that most of the compounds were produced by variable gene pools in *Streptomyces* or that the fungal response is different and specific depending of its partner.

In search of potential candidates responsible of the anti-*Bacillus* inhibition activity, we identified the only compound found in fraction 22 of S1D4-11-SFIZ that is a carboxylic acid identified as boletin H. To our knowledge no anti-microbial activity is known so far regarding this compound, but it can act as inhibitor of superoxide anion generation in macrophage cells

(Kamo et al., 2004). Between the two co-cultures only two compounds were found in common. It was the piperidone janthinolide and the terpenoide hippolide both present in fractions 23. Few information is available on these compounds except that janthinolide was initially isolated from the coral endophytic *Penicillium janthinellum* (Xue et al., 2006) and that hippolide isolated from marine sponges could have antifungal properties (Jiao et al., 2017; Piao et al., 2014). Their presence in both fractions 23 makes them good candidates responsible of the activity in these fractions. As *Schizophyllum* is the common denominator between these two co-cultures, one can speculate that these compounds might have a fungal origin. A lactam derivative (streptothricin_F_acid) found in fraction 23 of S1D4-23-FIZ represents another good candidate as potential anti-bacterial compound and might have in this case a *Streptomyces* origin (Ji et al., 2009).

CONCLUSION

Taken together, these results suggest that co-culture had a significant effect on the metabolic expression of both organisms and that the metabolome of the interaction is not the simple addition of compounds produced by the fungi and those of the bacteria. In order to best explore this important diversity of metabolites, we have chosen an approach guided by an anti-*Bacillus* inhibition activity induced by co-culture and tried to link metabolome and phenotype. Interestingly, even if the precise identification of one or several metabolites could not be achieved to the end, we were able to show that bioactive fractions had specific molecules, potentially candidates as antimicrobial. Our results confirm that co-culture coupled with an activity-targeted approach represent an excellent means of activating cryptic metabolites in the laboratory and could lead to the discovery of molecules of interest.

Materials and methods

Strains and culture conditions

The bacterial and fungal strains used in this work are listed in Table S1. The *Streptomyces* strains were stored at -20°C as spore suspensions in glycerol 20% and were grown on GA medium (15 g starch, 5 g NaCl, 5 g KCl, 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g KNO₃, 0.5 g MgSO₄, 15 mg FeSO₄, and 15 g Bacto Agar into 1 L of water adjusted in pH 7.2). *Bacillus* strains were grown in LB (10 g tryptone, 5 g yeast extract, 10 g NaCl for 1 L) at 30 °C. Fungi were maintained on MA medium (15 g Malt extract and 15 g Bacto Agar) by successive cultures. Co-cultures were performed in triplicate on GA medium plates. On one side of the Petri dish, an agar plug with fresh fungal mycelium was inoculated and 10 µL of *Streptomyces* spore suspension (10⁵ spores/mL) were streaked on the opposite side (on approximately one third of the Petri dish as illustrated in Fig. 1.A). The co-cultures were grown for 10 to 14 days at 25°C in the dark. Controls were performed similarly but only with one microorganism.

Metabolite extraction

Interaction zones (**Fig. 1.A**) from three independent Petri dishes were excised and pooled together in a flask with one volume of ethyl acetate (99.8%, Biosolve). After 90 min of agitation (120 rpm) at room temperature, ethyl acetate extracts were recovered by filtering on paper filter of 100 µm and were vacuum dried at room temperature. Dry extracts were resuspended at a concentration of 10 mg/mL either in DMSO (extra dry, 99.8%, Biosolve)% or in methanol (HPLC quality, 99.9%, Carlo Erba). For fractioning experiments, 80 Petri dishes were pooled to obtain the final extract.

Anti-bacterial screening

Anti-bacterial screening tests were performed in 96-well plates by adding 5 μ L of extract to a 200 μ L culture (0.05 OD 600nm) of the *Bacillus* indicator strain. Culture growth was monitored every 10 min for 24H (30 °C , rapid shake mode) on a BioTech (Synergy HT). The initial 64 different co-culture extracts were screened once against *B. subtilis* ATCC6633 and those with activity, as well as controls, were repeated at least five time independently. Antibacterial assays against other bacterial species (*Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 292212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumonia* ABC 42 and *Enterococcus cloacae* ABC 291) were performed on the ABC Platform (Université de Lorraine) according to the ISO 20776-1 protocol.

GC-MS and LC-MS/MS metabolite profiling

Dried extracts were silylated by adding 50 μ L of BSTFA/TMSCI (99/1) and heated at 50 °C for 12 h. After evaporation of the derivatizing reagent, the extract derivatives were solubilized in ethyl acetate and transferred for gas chromatography analysis. GC-MS analysis was performed on a Clarus 680 gas chromatograph coupled to a Clarus SQ8 quadrupole mass spectrometer (Perkin Elmer Inc., USA). Gas chromatography was carried out on a 5 % diphenyl /95 % dimethyl polysiloxane fused-silica capillary column (DB-5ms, 30 m \times 0.25 mm, 0.25- μ m film thickness, J&W Scientific, USA) with helium as carrier gas at a constant flow of 1 mL/min. The gas chromatograph was equipped with an electronically controlled split/splitless injection port. The injection (1 μ L) was performed at 250 °C in the splitless mode.

The oven temperature program was as follows: 80 °C for 2 min, increase from 80 to 190°C at a rate of 10°C/min, increase from 190 to 280°C at a rate of 15°C/min and hold for 5 min, then 10°C/min until 300°C hold for 14 min. Ionization was achieved under the electron impact mode (70 eV ionization energy). The source and transfer line temperatures were 180 and 250°C, respectively. Detection was carried out in scan mode: $m/z=45$ to $m/z=700$. The detector was switched off in the initial 2 min (solvent delay). LC-MS/MS was performed with a Thermo Scientific ultimate 3000 liquid chromatography with a mass detector IonTrap Velos pro. Separation was carried out with a C18 Hypersil gold aQ column (100 mm * 2.1 mm, 5 μ particle of 175A, Thermo Scientific, USA). Analysis was performed in gradient mode at a flow rate of 200 μ L/min. The column was washed during 20 minutes with 10% of Methanol, 5% of Acetonitrile and 85% of Water. Then the gradient started from 10% to 50% of methanol, from 5% to 50% of acetonitrile during 30 minutes.

Extract fractioning

Fractioning was performed with a HPLC Shimadzu LC-20AT coupled with DAD SPD-20A detector. Semi-preparative column was in a stationary phase Biphenyl (300 mm * 4.6 mm, 5 μ particle of 100 A, Kinetex, USA). Analysis was performed in gradient mode at a flow rate of 1 mL/min. The gradient started from 0% to 100% of methanol during 55 minutes. The column was washed during 25 minutes with 100% of Water. All fractioning were realized 4 times with 100 μ l of 10 mg/mL extracts.

Dereplication and molecular networking

A molecular network was created using the online workflow (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) on the GNPS website (<http://gnps.ucsd.edu>). The data were filtered by removing all MS/MS fragment ions within +/- 17 Da of the precursor m/z. MS/MS spectra were window filtered by choosing only the top 6 fragment ions in the +/- 50Da window throughout the spectrum. The precursor ion mass tolerance was set to 2.0 Da and a MS/MS fragment ion tolerance of 0.5 Da. A network was created where edges were filtered to have a cosine score above 0.7 and more than 6 matched peaks. Further, edges between two nodes were kept in the network if and only if each of the nodes appeared in each other's respective top 10 most similar nodes. Finally, the maximum size of a molecular family was set to 100, and the lowest scoring edges were removed from molecular families until the molecular family size was below this threshold. The spectra in the network were then searched against GNPS' spectral libraries. The library spectra were filtered in the same manner as the input data. All matches kept between network spectra and library spectra were required to have a score above 0.7 and at least 6 matched peaks. Tool dereplicator+ (Mohimani et al., 2018) as also used directly on raw data with the following parameters: Precursor Ion Mass Tolerance of 0.4 Da, Fragment Ion Mass Tolerance of 0.1 Da, Max charge of 2, Min Score to Consider a PSM of 9.0 and the Fragmentation Mode was general_6_1_6.

Statistical analysis

PLS-DA and heat-map were performed with Metaboanalyst platform. Statistical analysis were *t*-test and were performed with R 3.6.1.

ANNEXES AU CHAPITRE R4 (DONNEES SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE)

	Strain	Source	Genome	Genbank Acc. numb
Streptomyces	<i>Streptomyces</i> RLA2-12	Bontemps et al., 2013	Nicault et al., 2020	JABAQG000000000
	<i>Streptomyces</i> RLB1-8	Bontemps et al., 2013	Tidjani et al., 2019	NZ_CP041650
	<i>Streptomyces</i> RLB1-9	Bontemps et al., 2013	Tidjani et al., 2019	NZ_CP041654
	<i>Streptomyces</i> RLB1-33	Bontemps et al., 2013	Nicault et al., 2020	CP050974
	<i>Streptomyces</i> RPA4-2	Bontemps et al., 2013	Nicault et al., 2020	CP050975
	<i>Streptomyces</i> RPA4-5	Bontemps et al., 2013	Nicault et al., 2020	CP050976
	<i>Streptomyces</i> S1D4-11	Bontemps et al., 2013	Nicault et al., 2020	CP051010
	<i>Streptomyces</i> S1D4-23	Bontemps et al., 2013	Tidjani et al., 2019	NZ_CP041613
Fungus	<i>Trametes versicolor</i> Basidio 45	NCBI/JGI	Floudas et al., 2012	GCA_000271585.1
	<i>Trametes gibbosa</i> Basidio 74	NCBI/JGI	Project ID: 1111231	PRJNA331355
	<i>Trametes hirsuta</i> Basidio 51	NCBI/JGI	Pavlov et al., 2015	GCA_001302255.2
	<i>Stereum hirsutum</i> Basidio 57	NCBI/JGI	Floudas et al., 2012	GCA_000264905.1
	<i>Ganoderma resinaceum</i> 2R0112	NCBI/JGI	Chen et al., 2012	GCA_000271565.1
	<i>Stereum rugosum</i> Basidio 19	/	/	/
	<i>Schizophyllum commune</i> 66-01A	NCBI/JGI	Ohm et al., 2010	GCA_000143185.1
	<i>Postia placenta</i> PP978/9	NCBI/JGI	Martinez et al., 2009	GCA_002117355.1
	<i>Phaeolus schweinitzii</i> Basidio 76	/	/	/
Bacillus	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	/	/	/
	<i>Bacillus</i> sp. RB2-2N12	Bontemps et al., 2013	/	/

Table S1: Strains used during this study

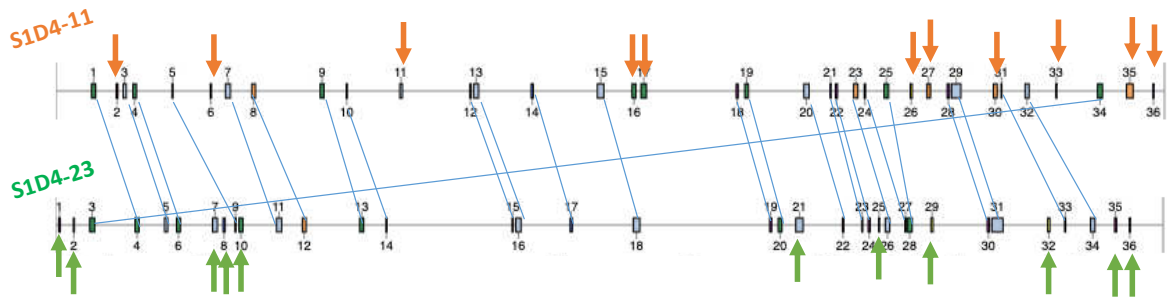


Figure S1. Genome BGCs comparison between the two *Streptomyces* strains

CHAPITRE R5 : EFFETS DES INTERACTIONS SUR LA PRODUCTION DE
MOLECULES IMPLIQUEES DANS LES REPOSES ANTI-INFLAMMATOIRES ET
DANS LES STRESS OXYDANTS

Cette étude a été réalisée par Stéfania Sesisto post-doctorante aux laboratoires IMOPA et Citéphor sous la direction de la Professeur Sophie Rahuel-Clermont et de la Docteur Caroline Gaucher. Seuls les tests de la capacité de chélation du fer ont été réalisés au laboratoire.

INTRODUCTION

Les bactéries sont confrontées, au sein de leur environnement, à différents stress et notamment à un stress oxydant est présent dans de nombreux environnements (Čáp et al., **2012**; Dimkpa et al., **2009**; Imlay, **2019**; Kashmiri and Mankar, **2014**). Ce stress est principalement causé par la présence/production d'espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (« Reactive Oxygen Species » ou ROS et « Reactive Nitrogen species » ou RNS) (Imlay, **2019**). Parmi les ROS, on peut citer l'ion superoxide ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) capable de former des radicaux hydroxyles ($^{\bullet}OH$). Parmi les RNS, il y a le monoxyde d'azote (« Nitric oxide » ou NO) qui est une molécule capable d'induire un stress « nitrosatif » sur les cellules bactériennes mais aussi virales (Akaike and Maeda, **2000**; Hochgräfe et al., **2008**). Cette molécule, naturellement présente dans le sol, peut être produite par les micro-organismes par dégradation de l'ion nitrate en oxyde nitrique (Ren et al., **2000**). Le NO peut être produit par les bactéries du genre *Streptomyces* en réponse à la production de certains métabolites d'un champignon ou induire un stress oxydant pour les micro-organismes (Crack et al., **2015**; Khalil et al., **2019**). Ces espèces réactives vont être capable d'interagir avec les enzymes contenant du fer entraînant la perte de l'activité enzymatique (Cornelis et al., **2011**). Dans certains cas, ils entraînent une dérégulation cellulaire, un dysfonctionnement enzymatique voire la mort de la cellule (figure R27) (Fu et al., **2015**).

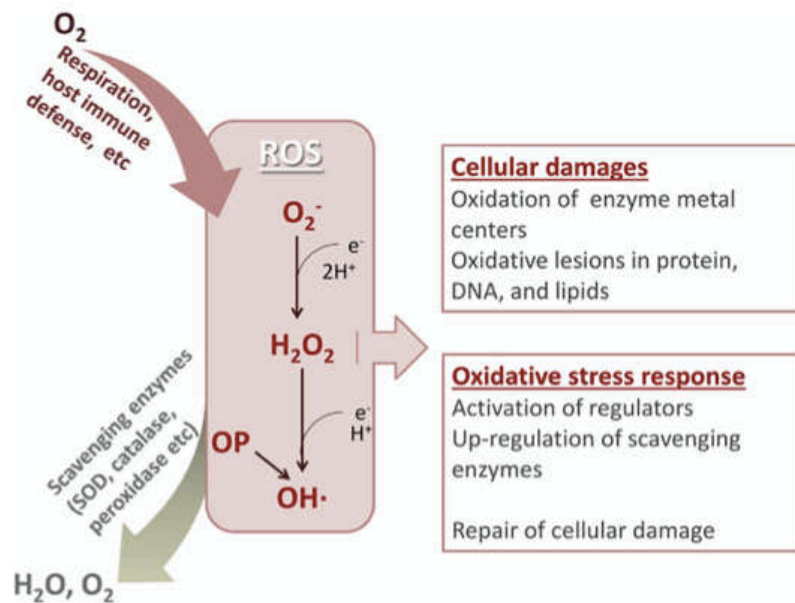


FIGURE R27 : SOURCES ET IMPACTS DES ROS SUR LES MICROBES. (FU ET AL., 2015)

Les sources des espèces ROS (à savoir O_2 , H_2O_2 et $OH\cdot$) comprennent principalement la respiration et la défense immunitaire des hôtes animaux et végétaux. Ces ROS peuvent provoquer divers dommages cellulaires et induire une réponse au stress oxydatif. Des enzymes de piégeage dédiées sont responsables du nettoyage de l' O_2 et du H_2O_2 dommageables.

La production de métabolites spécialisés capables de piéger et ou de limiter la production de ROS/RNS est un des mécanismes majeurs de défense mis en place par les organismes sujets à un stress oxydatif. La réponse à ce stress peut ainsi impliquer l'activation de gènes impliqués le transport et le stockage de métaux tels que le fer par la production de sidérophores qui peuvent eux-mêmes piéger les radicaux libres comme l'enterobactine chez *E. coli* (Seo et al., 2015). La présence de métaux présents au sein de la plante entraîne un stress oxydant contrôlé par la production de sidérophore par les bactéries (Dimkpa et al., 2009). Les microorganismes (*Streptomyces* et *Schizophyllum commune*) utilisés au cours de cette étude sont connus pour produire des molécules anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Arbaayah and Umi Kalsom, 2013; Basso et al., 2020; Braña et al., 2015; Du et al., 2017; Tan et al., 2017). Chez l'homme, les réactions inflammatoires peuvent être causées par la présence d'oxide nitrique (Ormerod et al., 1999). Les micro-organismes sont capables de synthétiser des molécules permettant de piéger le NO et qui pourraient être utilisées comme agents anti-inflammatoires (Sauder et al., 2016).

Les objectifs de cette partie étaient donc d'étudier la production de molécules anti-oxydantes, anti-inflammatoires et chélatrices de métaux lors des co-cultures mises en place au cours de cette étude.

MATERIEL ET METHODES

TESTS DE CYTOTOXICITE ET ANTI-INFLAMMATOIRE (INHIBITION DE LA PRODUCTION DE NO)

Dans un premier temps, la cytotoxicité des extraits a été évaluée grâce au test MTT (figure R28) (Mosmann, **1983**). Il s'agit d'un test colorimétrique qui permet de mesurer l'activité métabolique d'une cellule et sa viabilité. Il est mesuré par la transformation du MTT (jaune) en formazan par des cellules actives. Cette transformation est réalisée par une déshydrogénase présente dans les mitochondries des cellules vivantes. La quantité de formazan produite est donc directement reliée à la quantité initiale de MTT. En effet, le rapport de la quantité de formazan sur la quantité de MTT donne une indication de la viabilité des cellules. Plus ce rapport sera proche de 1 (100%), plus les cellules sont vivantes.

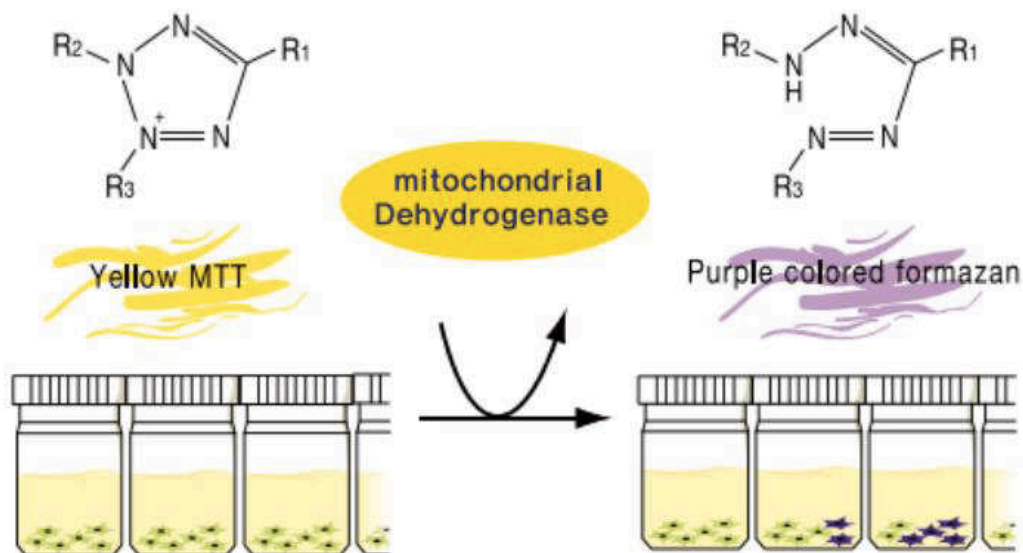


FIGURE R28 : TEST DE VIABILITE DES CELLULES MACROPHAGES AU MTT

Les cellules macrophages de muridés (RAW 264.7) ont été cultivées en microplaques 96-puits pendant 24h (concentration de 10^4 cellules par puits) dans du milieu DMEM high glucose, SVF 10%, PenStrep, Hepes 20 mM, pH 7.3. Après 24h, le milieu a été enlevé et les cellules ont été traitées avec 1 et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extraits (0,1% DMSO). Après une nuit

d'incubation, une solution de MTT a été ajoutée à une concentration finale de 0,5 mg/mL. Après 3h de réaction, le surnageant a été enlevé et les cristaux de formazan dissous dans 100 μ L d'isopropanol 0,1N HCl. L'absorbance a été ensuite mesurée à 570 nm.

Dans un second temps, pour les tests anti-inflammatoires, un test basé sur la production d'oxyde nitrique (NO) a été utilisé. Durant ce test, la mesure du NO se fait à travers la réaction de Griess (Weissman and Gross, **1998**).

Les cellules traitées pendant 1h à 37°C avec l'extrait sont stimulées ou non en présence de LPS (0,1 ng/mL) isolé de *Salmonella typhimurium* pendant 24h. Les LPS induisent une réponse inflammatoire en se fixant sur les récepteurs TLR4 d'une cellule et un stress oxydant impliquant la formation de NO. Après 24h, le surnageant est récupéré et la réaction de Griess est utilisée pour quantifier la présence et la quantité de NO (figure R29). En présence de l'ion nitrite, l'acide sulfanilique va former un sel de diazonium. Ce sel, en réagissant ensuite avec une naphthalamine va former un composé de couleur rouge.

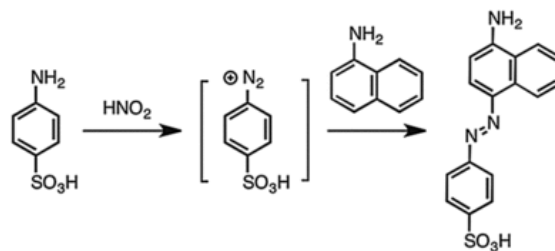


FIGURE R29 : REACTION DE GRIESS

TESTS ANTIOXYDANTS (INHIBITION DE LA PRODUCTION DE ROS)

Les tests antioxydants ont été réalisés grâce au test d'activité antioxydant cellulaire ou « Cellular Antioxidant Assays » (CAA) (figure R30) (Kellett et al., **2018**; Wolfe and Liu, **2007**). L'idée de ce test a été de développer une méthode qui soit proche des conditions physiologiques se produisant lors d'un stress oxydant lié aux ROS. Ce test est basé sur la mesure de la fluorescence de la molécule dichlorofluorescine (DCF) qui agit comme une sonde de la fluorescence. Au système cellulaire est ajouté un générateur de radicaux libres ici ABAP. En absence de composés antioxydants, la DCF est formée par action enzymatique et entraîne une augmentation de la fluorescence. Dans le cas où des composés antioxydants sont présents, cette molécule (la DCF) n'est pas formée et donc il y a une diminution de la fluorescence. Les composés antioxydants selon leurs propriétés physico-chimiques peuvent agir soit de façon intracellulaire soit de façon extracellulaire. En effet, des composés non ionique et non polaire vont pouvoir pénétrer la cellule.

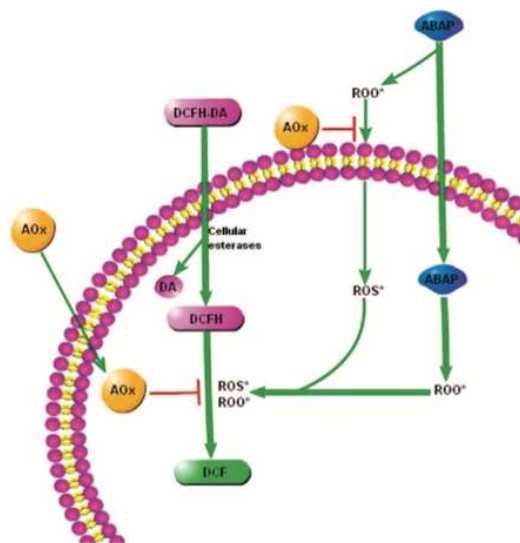


FIGURE R30 : PRINCIPE DU TEST CAA

Pour faire ces tests, les cellules utilisées ont été des cellules humaines épithéliales Caco-2 (Fogh, **1975**) cultivées en milieu DMEM. Après 48h de culture à 37°C, les cellules sont lavées grâce au PBS. Les cellules sont ensuite traitées avec 50 µL d'extraits et 50 µL d'une solution de DCFH-DA à 25µM pendant 1h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS.

Pour lancer la réaction, 100µL du générateur de radicaux ABAP est ajouté puis la plaque est ensuite placée pour la mesure de la fluorescence. Les longueurs d'ondes utilisées sont 485 nm pour l'excitation et 538 nm pour l'émission.

TESTS DE CHELATION DU FER

Le test de chélation utilisé et réalisé au laboratoire IAM repose sur une réaction chimique présentée ci-contre (figure R31) (Canabady-Rochelle et al., **2015**). En présence de Fer (II), un complexe coloré (560 nm) va se former entre un équivalent de fer et 3 équivalents de Ferrozine. En présence d'un chélateur qui va capter le fer, ce complexe avec la ferrozine ne va pas se former et conduire à une diminution de l'absorbance mesurée..

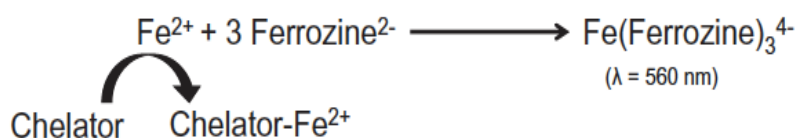


FIGURE R31 : REACTION CHIMIQUE DU TEST DE CHELATION DU FER

Pour faire ce test, une gamme d'étalonnage est nécessaire pour calculer le pourcentage de l'activité de chélation du fer. La formule utilisée est la suivante :

$$\text{Iron chelating capacity (\%)} = ((A_0 - A_S) / A_0) * 100 \text{ où } A_0 \text{ correspond à la valeur d'absorbance initiale et } A_S \text{ à la valeur d'absorbance obtenue pour chacun des échantillons.}$$

L'étalon utilisé a été l'EDTA qui est une molécule inorganique chélatrice des métaux. Pour faire cette gamme, 10 concentrations d'EDTA ont été utilisées de 0 à 100 µM avec un gap de 10 à chaque fois. Les différentes conditions utilisées pour ce test sont résumées dans le tableau et le protocole suivant :

Concentration finale (µM)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
FeCl2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
EDTA (µL)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Ferrozine	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Eau (µL)	185	175	165	155	145	135	125	115	105	95	85

Dans une plaque de 96 puits, ajouter 5 µL de FeCl2 à 2 mM et X µL d'EDTA à 200 µM en fonction de la concentration. Laisser incuber 3 minutes à température ambiante puis ajouter

10 μL de ferrozine à 5 mM et laisser incuber 10 minutes à température ambiante et lire l'absorbance à 560 nm

La courbe d'étalonnage obtenu présente un coefficient de corrélation R^2 très bon de 0,9923. Cette analyse se fait sur la partie linéaire de la courbe car à partir de 50 μM d'EDTA la courbe atteint un plateau. Cette valeur montre que les réactifs utilisés lors de cette expérience sont de bonnes qualités et que les données obtenues pour les extraits seront fiables.

Pour les extraits, ajouter 5 μL de FeCl_2 à 2 mM et 2 μL d'extractibles à 10 mg/mL puis de l'eau qsp 200 μL . Laisser incuber 3 minutes à température ambiante puis 10 μL de ferrozine à 5 mM. Laisser incuber 10 minutes à température ambiante et Lire l'absorbance à 560 nm

RESULTATS

EFFETS DES INTERACTIONS SUR L'INHIBITION DU NO (ANTI-INFLAMMATOIRE)

Dans l'objectif d'étudier l'effet anti-inflammatoire des métabolites extraits des SFIZs sur des cellules macrophages RAW.264.7, une première étape a été de vérifier si les extraits testés n'affectaient pas la viabilité des cellules. En présence de 1 et 10 µg/mL d'extraits, la viabilité des cellules restait supérieure à 80% (Données présentées en figure supplémentaire R35).

A la vue des résultats de viabilité obtenus, les test anti-inflammatoires ont pu être réalisés. Ces tests ont été réalisés (i) en absence et (ii) en présence de LPS (cf matériels et méthodes).

En absence de LPS, aucun extrait n'a déclenché de production de NO par les macrophages. Ce résultat démontre donc que les extraits seuls ne déclenchent pas de réponse pro-inflammatoire.

En présence de LPS, l'extrait issu de la monoculture de *S. commune* n'induit pas de diminution de la production de NO (figure R32). En présence des extraits issus des monocultures des deux souches de *Streptomyces* et des deux SFIZ, une diminution significative de la production de NO est observée avec néanmoins une très grande variabilité des résultats obtenus (Figure Supplémentaire R36).

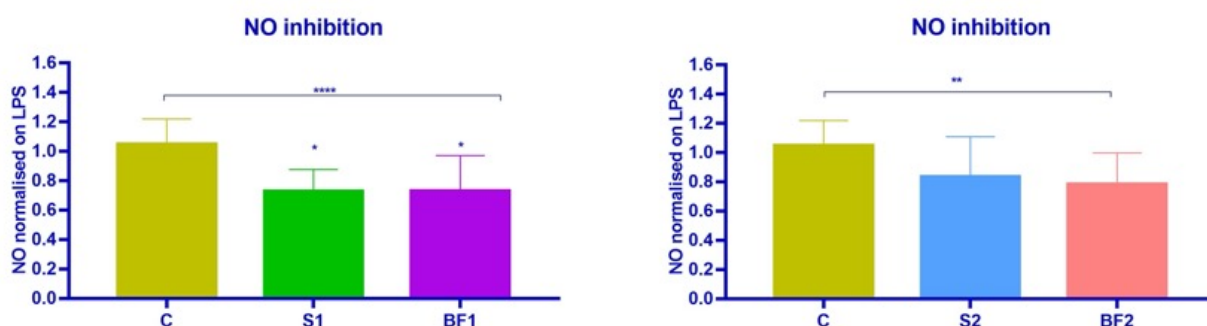


FIGURE R32 : EFFET DES EXTRAITS SUR LA PRODUCTION DE NO REVELANT LEUR POTENTIEL EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE

Chacun des extraits a été testés pour vérifier leur effet anti-inflammatoire ou non. Ici sont représentés les résultats obtenus, après normalisation sur LPS, pour chacun des extraits. Plus la valeur est faible plus l'effet anti-inflammatoire est important. C : *Schizophyllum commune* ; S1 : S1D4-11 ; S2 : S1D4-23 ; BF1 : S1D4-11-FIZ ; BF2 : S1D4-23-FIZ. Chacune des conditions ont été comparés par t-tests.

Les produits induits par l'interaction peuvent être issus de la bactérie ou du champignon sous l'effet de signaux générés par l'un ou l'autre des protagonistes. Des études de fractionnement complémentaires seraient nécessaires pour éclaircir ce point.

EFFET DES INTERACTIONS SUR L'INHIBITION DES ROS (ANTIOXYDANTS)

L'objectif de cette partie a été d'appréhender l'effet antioxydant des interactions. Les résultats de la quantité de ROS mesurée grâce à la sonde fluorescente DCF sont résumés dans la figure suivante (figure R33). Les deux extraits issus des interactions présentent une activité antioxydante importante, néanmoins l'effet obtenu le plus important est celui de l'extrait issu de la monoculture de *S. commune*. Pour la seconde interaction, la co-cultures BF2 (S1D4-23-FIZ) possède une activité statistiquement différente par rapport au champignon et à la bactérie S1D4-23 seuls. Il pourrait donc y avoir un effet de l'interaction dans le cas où cette activité ne résulte pas d'un effet additif des monocultures. Cet effet pourrait être lié à une augmentation de la capacité anti-oxydante de la bactérie où à l'inhibition de molécules produites par le champignon. De la même manière que pour l'activité anti-inflammatoire, des expériences complémentaires seront nécessaires pour conclure sur l'induction de molécules anti-oxydantes spécifiques lors des co-cultures.

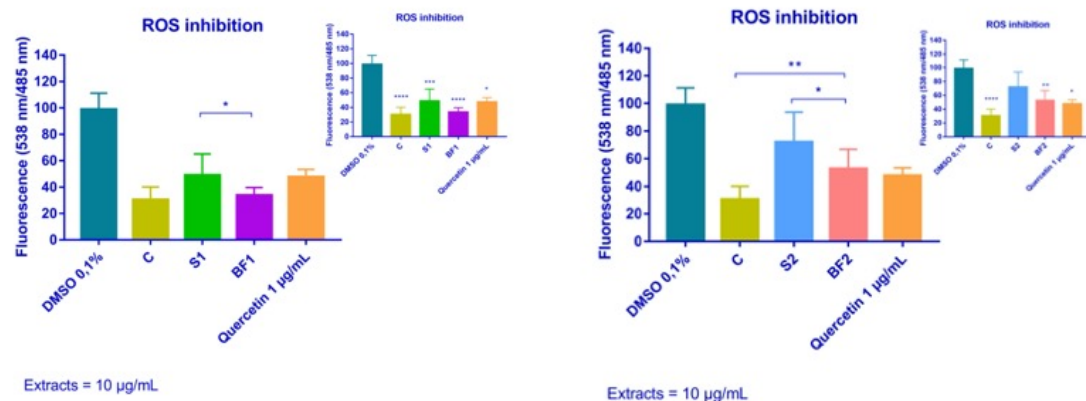


FIGURE R33 : EFFET DES INTERACTIONS SUR L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE CELLULAIRE

Chacun des extraits a été testé pour vérifier leur effet antioxydant ou non. Ici sont représentés les résultats obtenus pour chacun des extraits. La partie supérieure droite correspond à la comparaison des résultats obtenus pour les extraits à la valeur obtenus pour le DMSO 0,1% seul. Le graphique central correspond à la comparaison des extraits entre eux. Les comparaisons sont faites grâce aux t-tests. Plus la valeur est faible plus l'effet antioxydant est important. Un contrôle avec la quercétine a été effectué. Ici, tous les extraits possèdent une diminution significative de la fluorescence exceptée pour la bactérie S1D4-23. C : *Schizophyllum commune* ; S1 : S1D4-11 ; S2 : S1D4-23 ; BF1 : S1D4-11-FIZ ; BF2 : S1D4-23-FIZ.

EFFET DES INTERACTIONS SUR LA CHELATION DU FER

La mesure de la chélation du fer a été réalisée *in vitro* grâce à une réaction chimique impliquant la complexation par la ferrazine en comparant les extraits des monocultures des *Streptomyces* (S1D4-11 et S1D4-23), de *S. commune* et des FIZ résultant de leurs co-cultures respectives (Figure R34).

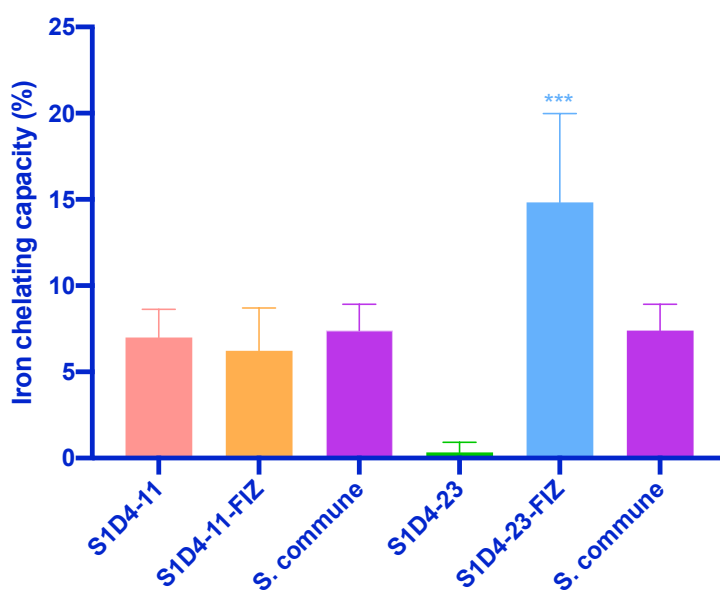


FIGURE R34 : EFFET DES INTERACTIONS SUR LA CHELATION DU FER

Chacun des extraits a été testés pour vérifier leur capacité de chélation du fer. Ici sont représentés les résultats obtenus, après calcul grâce à la formule mathématique (voir matériel et méthodes), pour chacun des extraits. Plus la valeur est importante, plus l'extrait possède de molécules capables de capter le fer.

Dans de le cadre de l'interaction S1D4-11-FIZ, la capacité de chélation de fer des extraits issus de la co-culture et des monocultures était similaire. Dans le cas de l'interaction S1D4-23-FIZ, l'extrait issu de la co-culture présentait une activité chélatrice significativement supérieure à celles des extraits des deux monocultures, suggérant une augmentation de production et/ou une production spécifique de sidérophores lors de la co-culture.

CONCLUSION

Les résultats préliminaires décrits dans ce chapitre devront être confirmés par des expériences supplémentaires en répétant les différentes manipulations et/ou en les complétant par d'autres approches. Néanmoins ces résultats suggèrent que les extraits issus des co-cultures pourraient contenir des molécules d'intérêt. C'est notamment le cas lors de l'interaction S1D4-23-FIZ où la production de sidérophore semble induite suggérant que le fer pourrait jouer un rôle important dans le mécanisme de l'interaction.

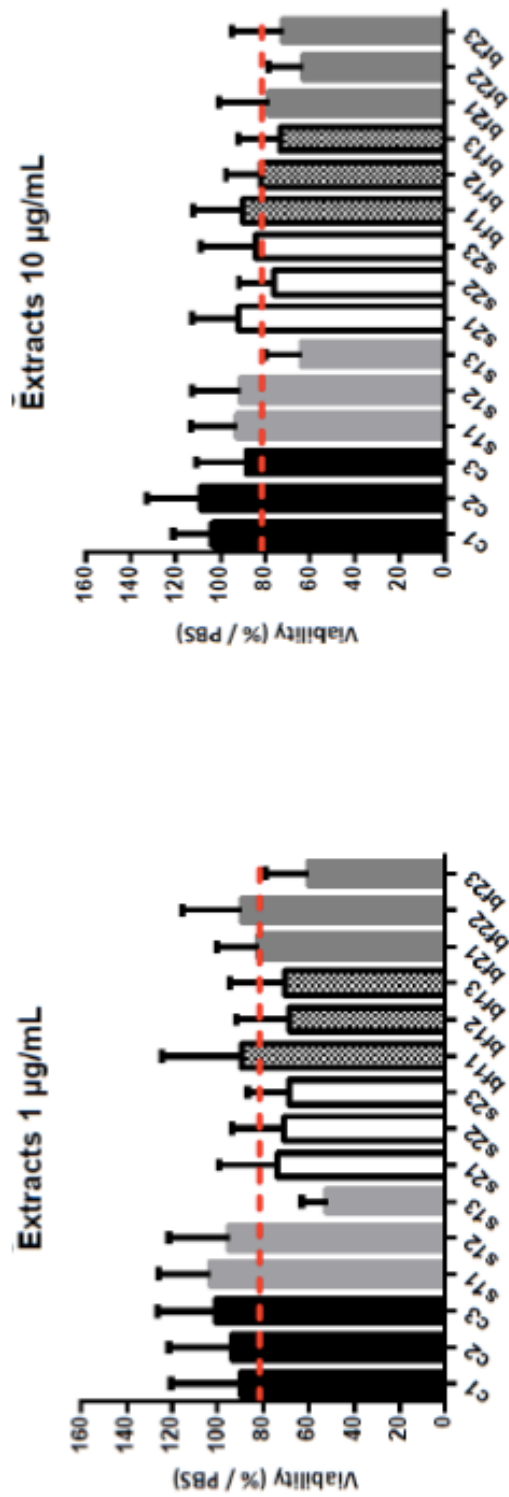


FIGURE R35 : TEST DE VIABILITE DES MACROPHAGES UTILISES EN PRESENCE DES EXTRAITS

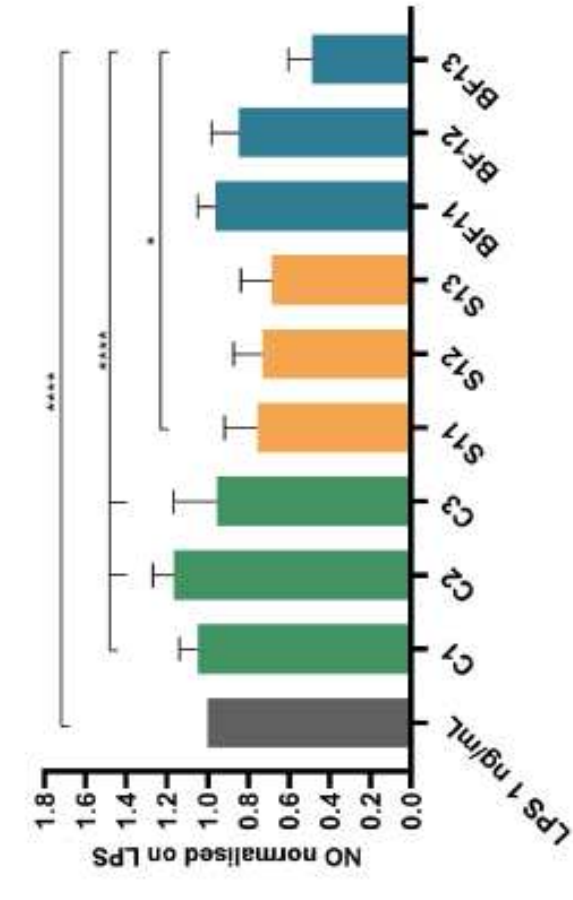
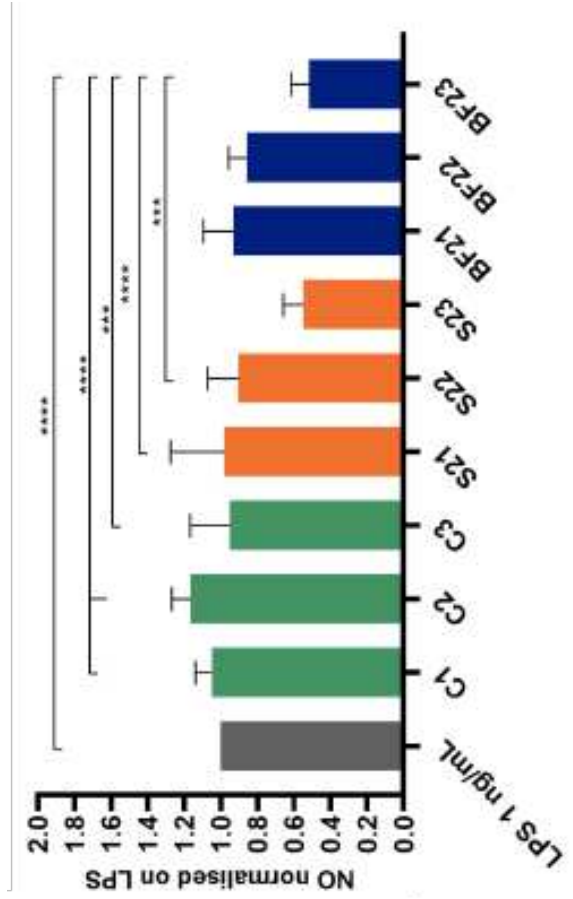


FIGURE R36 : VARIABILITE DES ECHANTILLONS EN TRIPLICAT BIOLOGIQUES

PARTIE 3 : CONCLUSIONS – DISCUSSIONS – PERSPECTIVES

Étude de la diversité des voies de biosynthèse du métabolisme spécialisé à l'échelle d'une population de *Streptomyces*

La recherche et l'identification de nouvelles molécules bioactives, notamment antibiotiques, est une urgence en santé publique. Les bactéries du genre *Streptomyces* et les champignons de la division des Basidiomycètes constituent des sources prometteuses de métabolites d'intérêt. Ces deux micro-organismes, fournissaient à eux seuls, en 2012, plus de 14.000 composés connus (Bérdy, **2012**) et possèdent un potentiel important, notamment si l'on considère le nombre de voies de biosynthèse dans le génome de chacun des organismes (Aigle et al., **2014**; Sandargo et al., **2019**). Toutefois un écueil majeur de la recherche de nouvelles molécules reste la 'redécouverte' de composés déjà connus ou apparentés. Une approche présumée contourner ce problème consiste ainsi à échantillonner des organismes dits 'rares' isolés le plus souvent dans d'écosystèmes atypiques qualifiés d'extrêmes. Ainsi des souches de *Streptomyces* ont été isolées des grottes, des mangroves, des déserts ou encore à partir du microbiote d'animaux (Adam et al., **2018**; Indraningrat et al., **2016**; Musa et al., **2020**; Sivalingam et al., **2019**) et ont permis de découvrir de nouvelles molécules et des larges spectres d'activités (principalement antimicrobienne)

Dans notre étude, une stratégie d'échantillonnage alternative a été mise en œuvre : le potentiel de synthèse a été exploré au sein d'une communauté de *Streptomyces*, constituées des souches phylogénétiquement proches (à des degrés divers) et isolées d'un même micro-habitat (grain de sol, (Bontemps et al., **2013**). L'analyse génomique de 8 de ces souches a permis de découvrir une richesse potentiellement importante de la capacité de synthèse de métabolites avec au total 261 voies de biosynthèse. Parmi elles, 93 voies de biosynthèse étaient uniques, et seules 5 de ces voies étaient présentes chez l'ensemble des 8 souches. Ces voies de biosynthèse communes constituent un « core specialized metabolome » (Drago Hass, **2015**) et contribuent à son développement dans l'environnement. Ainsi des composés tels que la desferrioxamine ou la géosmine sont synthétisés par la plupart des espèces et souches de *Streptomyces* (Bursy et al., **2008**; Yamanaka et al., **2005**). Parmi les 88 autres BGC uniques identifiés dans la communauté, 35 sont conservés entre au moins deux souches et plus de la moitié (n=53) se sont avérés présents chez une seule souche.

Ces résultats *in silico* indiquent qu'il existe potentiellement peu de redondance fonctionnelle au sein de la communauté et que notre stratégie d'échantillonnage s'est révélée appropriée, même avec un nombre limité de souches, pour identifier un nombre important de MS potentiels.

Une forte proportion de ces BGC variables se situe dans les extrémités du chromosome. Cette observation faite à l'échelle de la communauté est cohérente avec une analyse antérieure réalisée à l'échelle de la population où il a été démontré qu'il existait des flux de gènes massifs entraînant une diversification génomique dans les bras chromosomiques (Aigle et al., **2014**; Tidjani et al., **2019b**). Cette diversification pourrait s'expliquer par une tolérance plus importante de ces régions chromosomiques aux réarrangements et par l'intégration de fragments d'ADN exogène de taille suffisante pour véhiculer tout ou partie d'un BGC. Les transferts de gènes pourraient donc représenter un facteur important pour expliquer la diversité et la localisation chromosomique des BGC (Nicault et al., **2020**).

L'ensemble de ces résultats *in silico* indique que la forte capacité d'échange de gènes et de recombinaison existant chez les *Streptomyces* est un moteur évolutif suffisant fort pour générer à l'échelle de la communauté une diversité importante de BGC et donc un potentiel de production de MS prometteur pour la découverte de nouveaux composés d'intérêts. L'objectif de cette thèse a été d'explorer et d'exploiter cette diversité par l'utilisation d'interactions biotiques.

Explorer des souches apparentées : une nouvelle stratégie pour identifier de nouvelles molécules ?

La prospection du potentiel métabolique des microorganismes, dont les *Streptomyces*, reste une approche prometteuse pour l'identification de nouvelles molécules biologiques. Toutefois la question du choix des souches reste importante. En ce qui concerne les *Streptomyces*, il apparaît de plus en plus que la vitesse d'évolution et de brassage des BGC est susceptible de générer facilement chez des souches proches la présence de MS différents, même au sein d'une population. De plus en plus d'exemple, ainsi que nos résultats ont également confirmé au niveau métabolique ces observations *in silico* (Antony-Babu et al., **2017**; Chevrette et al., **2020**; Nicault et al., **2020**). En effet, nos souches possèdent certes des profils métaboliques proches liés à leur proximité phylogénétique et correspondant à l'expression du métabolisme primaire et des voies de biosynthèse communes, mais elles ont également suffisamment de variabilité pour que ces profils soient différenciables et se répercutent sur les profils d'activités, et notamment antibactériennes (chapitre R2, Nicault et al., **2020b**). Le plus souvent, pour garantir cette diversité, le premier critère de choix des souches est la classification phylogénétique notamment basée sur l'ARN 16s. En effet, il est estimé que plus des souches sont proches phylogénétiquement plus elles auront des similitudes biologiques (fonctions écologiques, capacités métaboliques). Chez *Streptomyces*, il a été démontré que l'étude des fonctions écologiques et la capacité métabolique n'avaient aucun lien avec la phylogénie 16s (Chevrette et al., **2019**).

Une autre forme de diversité révélée par l'analyse des BGC de souches apparentées est celle qui a été observée entre les voies de biosynthèse présentes chez 2 ou plus isolats de la population. Initialement, il était attendu que si un BGC était présent chez plusieurs isolats apparentés, le contenu en gène du BGC serait identique et conduirait au même métabolite produit. Cependant, une analyse fine des BGC conservés, c'est-à-dire prédits à l'identique par antiSMASH, n'ont pas le même contenu, ils présentent des gènes variables (présence/absence) affectant les gènes de biosynthèse ou de décoration. Ainsi, les métabolites synthétisés présentent probablement des différences de structures qui pourraient s'accompagner d'activités distinctes.

Ces différences génomiques entre deux souches phylogénétiquement proches se situent principalement dans des îlots généralement acquis par des HGT. Ces îlots génomiques regroupent principalement les gènes codants pour des voies du métabolisme spécialisé. Par exemple, l'utilisation de l'outil BreakViewer développé dans le cadre de la thèse de Drago Haas (2015) permettrait de mettre en évidence des îlots qui ne sont pas détectés par des approches classiques. L'étude de ces îlots permettrait de mettre en évidence des voies du métabolisme spécialisé encore inconnus.

Pour découvrir de nouvelles molécules actives, il s'agit de trouver de nouveaux moyens de sélectionner et d'analyser des souches microbiennes. Pour cela, il serait possible d'obtenir des profils métaboliques ainsi que de tester les activités des différentes souches microbiennes pour ne sélectionner que celles qui possèdent des profils atypiques et/ou des activités d'intérêts. A l'échelle de notre collection, il s'agira de sélectionner plusieurs souches aléatoirement, de tester leurs activités et de dresser leurs profils métaboliques afin de différencier différents groupements de bactéries. L'établissement d'un lien statistique entre la classification selon le profil métabolique et la classification selon l'activité pourrait permettre d'avoir une corrélation entre molécules et activités biologiques. Une fois une molécule ou un ensemble des molécules identifiées, des étapes de fractionnements et de purifications ainsi que l'élucidation structurale pourront être utilisés. Néanmoins, il sera important de définir des conditions de cultures des composés afin d'induire leur production. En effet, ces composés ne sont pas toujours produits au laboratoire.

Les interactions biotiques : un levier à activer pour la découverte de nouvelles molécules

La plupart des BGC ne sont pas exprimés dans les conditions de laboratoire, ces dernières ne reproduisant pas les conditions naturelles dans lesquels des stimuli biotiques ou abiotiques induisent la production de métabolites (Chapitre R2, Nicault et al., 2020). La synthèse de métabolites ayant un cout énergétique important, une régulation étroite des BGC est généralement la règle ; la biosynthèse répond à des stimuli transduits par des capteurs/effecteurs et est inféodée à de nombreux niveaux de régulations globales et spécifiques (au niveau transcriptionnel et traductionnel).

Une des approches visant à activer la production de ces molécules peut consister à faire varier les conditions de cultures. C'est le cas des approches dites OSMAC qui à partir d'une souche microbienne et en faisant varier les conditions de culture a permis d'obtenir l'induction de composés qui ne sont pas produits dans des conditions normales de culture (Pan et al., 2019). En effet, dans un écosystème comme le sol, des études ont montré que les antibiotiques pouvaient avoir un rôle de molécules de signalisation (Romero et al., 2011). A forte concentration les antibiotiques sont toxiques mais à faible concentration, ils peuvent agir comme un signal pour le micro-organisme. Ainsi l'application d'un gradient de concentration d'antibiotiques entraine des changements physiologiques et métaboliques comme l'induction de la production d'autres molécules (Romero et al., 2011). Par exemple, La rifampicine connue pour son effet d'inhibition de la transcription entraine la production d'actinorhodine et d'undecylprodigiosine. De même, L'oligomycine A connue pour son effet d'inhibition de l'ATP synthase entraine la production d'actinorhodine. Une des possibilités pour induire la production de nouvelles molécules serait donc de faire varier la concentration en antibiotique dans notre milieu de culture.

Souvent le rôle écologique des antibiotiques est interprété comme une « arme » visant à inhiber la croissance d'un compétiteur. Ces composés pourraient également jouer un rôle dans la communication, et notamment en concentration sub-inhibitrice.

Les antibiotiques peuvent également constituer des biens communs chez les bactéries où seule une fraction des individus au sein de la population va produire un composé qui sera utile à l'ensemble de la population. C'est par exemple le cas pour des sidérophores chez des Vibrionaceae (Cordero et al., **2012**) et vraisemblablement pour des antibiotiques produits par les souches environnementales de *Streptomyces* utilisées au laboratoire (Tidjani et al., **2019**). Le partage du travail permet d'augmenter la cohésion sociale du groupe ainsi que le fitness d'une population. Dans le cas où certains individus assument une tâche à leur dépens mais au bénéfice du groupe génétiquement apparenté, il est possible de parler d'altruisme. Récemment, chez *S. coelicolor* il a été montré qu'une hétérogénéité génétique résultant d'amplifications ou de délétions de grandes tailles existait au sein d'une même colonie. Ces variants produisent des antibiotiques en plus grande quantité que leurs congénères 'sauvages' alors que leur fitness est altéré ; notamment, ces variants sporulent moins efficacement et transmettent donc leur patrimoine génétique moins efficacement. Les antibiotiques produits le sont donc au bénéfice de l'ensemble de la colonie (Zhang et al., **2020**). Chez les procaryotes, la mort cellulaire programmée au bénéfice de la communauté, autrement dit le sacrifice, est un mécanisme qui a été retenu au cours de l'évolution (Allocati et al., **2015**). Cette mort cellulaire programmée a pour objectif de contribuer à des processus comme les réponses aux stress, le développement de la communauté ou la formation de biofilms.

Le choix de mettre en présence bactéries et champignons, qu'ils proviennent du même écosystème ou pas, c'est-à-dire que la co-culture mime des interactions 'naturelles' ou pas, présente un intérêt biotechnologique certains. Ainsi, il s'agit d'une approche sans a priori du rôle des métabolites produits : réponse à un stress (modification des conditions abiotiques), une agression (réponse à un composé toxique), un signal... Ainsi, cette approche donne accès à une diversité chimique sans avoir à identifier les stimuli et rôles des molécules induites. Néanmoins, nous avons cherché quels pouvaient être le(s) mécanisme(s) sous-jacent(s) des interactions étudiées.

Les interactions microbiennes sont régies par de nombreux mécanismes allant de la production de petites molécules aux transferts d'ADN (Abdelmohsen et al., **2015**). Ces mécanismes font intervenir des molécules solubles ou volatiles. Nous nous sommes donc interrogés sur les mécanismes impliqués dans nos interactions.

Au cours des interactions étudiées, nous avons observé (i) la prédiction par une approche métabolomique de composés dont la classe moléculaire pourrait correspondre à des sidérophores et (ii) augmentation de la capacité chélatrice du fer pour l'une des interactions. Afin de capter le fer dans l'environnement, les micro-organismes produisent des molécules chélatrices appelées sidérophores. Le fer étant un élément relativement rare dans l'environnement, les microorganismes sont souvent en compétition pour le capter. Différents systèmes mis en œuvre lors de ces compétitions ont été décrits afin de le capter. Les sidérophores d'une bactérie peuvent par exemple être « piratés » par d'autres bactéries (Galet et al., **2015**). Ces compétitions peuvent également induire la production d'autres composés dans le but d'inhiber la croissance des compétiteurs (Kramer et al., **2020**) et certains sidérophores possèdent également une activité antimicrobienne à part entière (Kramer et al., **2020**). C'est le cas des molécules de type sidéromycines qui possèdent également un groupement leur conférant une activité antibiotique (Braun et al., **2009**; Sassone-Corsi et al., **2016**). Nous avons également observé que les bactéries et le champignon utilisé lors de cette thèse possédaient des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires (chapitre R5). En plus d'une application biotechnologique potentielle, ces propriétés peuvent être le reflet que ces micro-organismes possèdent un arsenal métabolique capable de répondre à la présence d'un stress oxydant. Cette réponse au stress oxydant peut passer par une augmentation de la chélation de métaux et de la synthèse de la membrane issue de la régulation OxyR (Hahn et al., **2002**; Seo et al., **2015**) induisant la production de sidérophores. Cette induction peut donc être corrélée avec les observations précédentes ainsi qu'avec la prédiction de la production de dérivés lipidiques utilisés lors de la synthèse de la membrane (Seo et al., **2015**). La réponse au stress oxydants des micro-organismes peut également être la production de métabolites spécialisés antimicrobiens (Beites et al., **2014, 2011**; Miranda et al., **2014**; Prajapati et al., **2019**) et expliquer ainsi l'augmentation de l'activité antimicrobienne observée lors d'une interaction. De plus des antibiotiques peuvent entraîner un stress oxydant par leur mécanisme d'action (Albesa et al., **2004**).

Pour vérifier et confirmer si le fer ou les sidérophores jouent un rôle important dans le mécanisme de nos interactions notamment si une compétition pour le fer est établie ou s'il s'agit d'une réponse au stress oxydant, il sera intéressant de faire varier la concentration de fer ou d'espèces induisant un stress oxydant sur les souches individuellement et voir si cela impacte également les co-cultures (activité, profils métaboliques).

Au cours de cette thèse, de nombreuses classes de molécules biologiques tels que les terpènes, les dérivés benzéniques ou encore des cétales ont été induits lors des interactions étudiées. Ces composés peuvent être des composés volatiles et contribuer aux mécanismes des interactions (Pour revue par (Schulz-Bohm et al., **2017**). Par exemple, les terpènes semblent jouer un rôle prépondérant lors des interactions entre bactéries et champignons comme, par exemple, agents antimicrobiens (Song et al., **2015**).

D'autres mécanismes tels que le Quorum Sensing, ont été décrits comme un possible inducteur de la production de métabolites spécialisés chez *Streptomyces* (Romero et al., **2011**). Pour vérifier si un mécanisme de QS est impliqué dans nos interactions il serait intéressant d'utiliser l'outil décrit dans Tourneroche et al. (**2019**) présenté dans l'introduction. Dans le cas où des signaux de régulation de la production de molécules biologiques seraient génériques, une autre approche serait d'utiliser des exsudats fongiques ou bactériens pour voir leurs effets sur le métabolisme des souches microbiennes utilisées. Une extraction de ces exsudats couplée à une approche métabolomique pourrait permettre l'identification des molécules de signalisation extracellulaires.

L'apport de la transcriptomique et/ou de la protéomique pour l'identification du producteur du ou des composés d'intérêts ainsi que le voie de biosynthèse associée

Grâce à un fractionnement des métabolites guidé par l'activité et couplé à la métabolomique, des molécules candidates pour leur activité antimicrobienne ont été obtenues. Néanmoins, cette approche ne permet pas à elle seule de déterminer qui est l'organisme producteur. En se basant, sur des expériences d'imagerie par spectrométrie de masse il serait possible de déterminer quel micro-organisme est responsable de la production de la molécule recherchée et quel est le facteur impliquant sa production (Shih et al., **2014**). Cette méthode peut permettre aussi d'établir un lien entre une molécule et son action biologique/rôle dans l'interaction. Par exemple, dans le cadre de l'interaction entre *M. xantus* et *E. coli*, les rôles de prédation et de variation de croissance de deux métabolites spécialisés ont été validés (Ellis et al., **2019**).

En parallèle, pour pouvoir exploiter l'organisme producteur, par exemple par expression hétérologue pour la production de la molécule d'intérêt, il est essentiel d'identifier la voie de biosynthèse impliquée. Une limitation, de la métabolomique seule, pourrait être l'impossibilité de d'identifier les gènes responsables de la production des molécules d'intérêts. Dans ce travail de thèse, des molécules de types polycétides (dérivés d'acides carboxyliques) ou des peptides ont été identifiées. Ces molécules pourraient résulter de l'activation de voies de biosynthèse de type NRPS ou PKS. Pour confirmer cette hypothèse, il pourrait être intéressant d'utiliser la protéomique ou la transcriptomique pour compléter les informations obtenues à partir de la métabolomique. Ces techniques permettraient d'identifier les gènes ou les protéines dont la production est modifiée durant l'interaction. La protéomique est utilisée pour caractériser les interactions microbiennes impliquant des mécanismes de quorum sensing ou de formation de biofilms (Di Cagno et al., **2011**; Goo et al., **2010**; Herschend et al., **2017**). Des chercheurs, ont étudié plus précisément le protéome de la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa* et ont mis en évidence des protéines régulatrices du quorum sensing (Arevalo-Ferro et al., **2003**).

De plus, cette approche de protéomique peut être utilisée pour la découverte de nouvelles voies de biosynthèse ou de molécules biologiques (Du and van Wezel, **2018**). Par exemple, Chen et al. ont découvert 10 voies de biosynthèse de type NPRS/PKS dans 6 souches d'Actinobactéries qui n'étaient pas séquencées (Y. Chen et al., **2012**). Une approche consiste à coupler la protéomique avec des données de métabolomique peut permettre de remonter à la voie de biosynthèse impliquée : le « Natural products Proteomining » (Du and van Wezel, **2018**). Pour cela, il s'agit de faire varier les conditions de cultures entraînant un stress biotique (co-culture) ou abiotique (changement de paramètres physico-chimique des milieux de cultures) qui permet une différence de bio-activité. Grâce à des outils statistiques, il est alors possible d'établir une corrélation entre la production de produits naturels et des changements de l'expression du protéome. Pour cela, la variation des conditions de culture entraîne une modification de l'expression du métabolome et du protéome et il est possible de corréliser ces deux données. Cette corrélation statistique permet de déterminer les voies de biosynthèse potentiellement impliquées. Cette méthode a permis de découvrir un antibiotique dérivé de la juglomycine produite par les bactéries du genre *Streptomyces* (Gubbens et al., **2014**).

Une autre approche « -omique » est celle de la transcriptomique qui vise à étudier l'expression des gènes lors d'un stress ou lors d'une interaction microbienne (Hennessy et al., **2017**; Perazzolli et al., **2016**). En effet, les régulations se font aussi à l'échelle du transcriptome. Il est donc intéressant de mesurer l'expression des gènes lors de co-cultures entre micro-organismes. Ces variations de l'expression des gènes peuvent entraîner des changements au niveau de la croissance, de la morphologie comme par exemple lors de l'interaction entre le champignon *Laccaria bicolor* et *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 (Deveau et al., **2015**). Dans d'autres cas de co-culture, certains gènes codant pour des métabolites spécialisés bioactifs peuvent être surexprimés (Schroeck et al., **2009**). Par exemple, lors de l'interaction par contact entre la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* et le champignon *Aspergillus nidulans*, l'expression de nombreux gènes chez le champignon est modifiée (Schroeckh et al., **2009**). Ainsi, 395 gènes sont exprimés de façon différente entre la monoculture et la co-culture (147 sous- et 248 surexprimés). Parmi les 248 gènes surexprimés, 7 correspondent à une voie de biosynthèse de type PKS présente chez le champignon.

Dans notre analyse, nous avons observé que des composés induits lors des deux interactions étaient communs tandis que d'autres étaient spécifiques. Les deux souches de *Streptomyces* utilisées, proches phylogénétiquement possèdent des BGC communes (n=25) et d'autres spécifiques (n=11). En analysant le contenu en BGC des deux souches de *Streptomyces* et du champignon, nous nous sommes aperçus que des voies de biosynthèse étaient partagées entre les deux souches bactériennes. Les métabolites communs pourraient provenir de l'activation d'une voie de biosynthèse commune entre les deux bactéries ou bien d'une réponse aspécifique du champignon. Les métabolites spécifiques pourraient résulter de réponse spécifique du champignon contre les bactéries ou de réponses spécifiques des bactéries en présence du champignon. Pour vérifier ces hypothèses, l'emploi de la protéomique et/ou de la transcriptomique pourraient nous aider à déterminer quelles voies de biosynthèse sont activées et quels organismes sont producteurs. Il est également possible de créer des mutants de certaines voies de biosynthèse et d'identifier la molécule par comparaison des profils métaboliques chez la souche mutée par rapport à la souche initiale.

La métabolomique pour l'étude du fonctionnement des communautés microbiennes et leurs interactions

En plus d'avoir observé la production de composés antimicrobiens, les interactions bactéries/champignons étudiées m'ont permis prédire une diversité importante de molécules induites. Je me suis donc interrogé sur les rôles de ces molécules et notamment sur la compréhension écologique des interactions microbiennes par une approche métabolomique. Cette démarche, la métabolomique écologique ou encore éco-métabolomique est l'application de la technique à des questionnements écologiques, comme par exemple l'étude de la réponse du métabolome d'un organisme à des changements liés à des facteurs biotiques ou abiotiques. Ces facteurs abiotiques peuvent être l'hygrométrie, le climat (multifactoriel) ou encore la disponibilité des nutriments. Ces facteurs biotiques sont la présence d'autres organismes et les interactions établies entre eux. Des approches métabolomiques ont ainsi été utilisées pour étudier les échanges trophiques entre bactéries, la capacité d'assimilation de certains nutriments tels que l'azote ou le carbone, l'impact de la pollution des sols sur leur métabolome ou encore le rôle des interactions microbiennes sur la santé et la protection de l'hôte (Chatzimitakos and Stalikas, **2016** ; Giardina et al., **2018** ; Uehling et al., **2019** ; Lehr et al., **2009**; Tourneroché et al., **2019**).

Les micro-organismes utilisés lors de cette thèse sont issus du sol et notamment du système racinaire des plantes. Il serait intéressant de comprendre le rôle des métabolites produits (i) à l'échelle de la communauté microbienne et (ii) lors d'interactions complexes entre celle-ci et la plante. L'approche de l'éco-métabolomique pourrait être utilisée pour identifier ces molécules. Par exemple, le rôle des dérivés terpènes, dont l'induction a été décrite lors de notre étude, ne se limitent pas qu'à leur activité antimicrobienne lors de relations antagonistes. Ces molécules peuvent être des signaux chimiques pouvant affecter la physiologie du partenaire comme sa motilité (Schmidt et al., **2015**). Les terpènes peuvent aussi intervenir dans les interactions entre la plante et les micro-organismes par exemple comme source de carbone pour les bactéries (Giudice et al., **2008**; Kleinheinz et al., **1999**). Pour aller plus loin dans cette compréhension métabolomique des interactions microbiennes entre elles et sur leur hôte et sur le fonctionnement « interne » des communautés microbiennes, deux perspectives peuvent se présenter.

La première serait d'étudier l'impact des interactions entre micro-organismes sur la croissance la plante ou à l'inverse l'impact de la plante sur les interactions entre micro-organismes. Pour cela, il pourrait être intéressant d'étudier l'interaction plante/bactérie/champignon ou encore de préparer des exsudats microbiens ou de plantes et de voir l'impact sur l'organisme seul et les interactions. Une autre idée serait de faire une expérience d'interaction entre une ou un mélange complexe de bactéries en présence de la plante sous la présence biotique d'un organisme (phytopathogène ou partenaire). Dans ce dernier cas, l'approche métabolomique permettrait de mettre en évidence la production de composés produits lors de relation antagoniste (utiles pour le bio-contrôle par la suite), d'autres sur la compréhension des échanges signalétiques ou trophiques entre les plantes et/ou les micro-organismes.

La seconde serait de caractériser plus précisément le rôle que les micro-organismes utilisés jouent au sein de la communauté (toutes ces souches ne servent pas qu'à produire des composés antimicrobiens). En effet, lors de sa thèse Maxime Toussaint, a montré que les souches de la collection possédaient des propriétés fonctionnelles diversifiées comme par exemple la dégradation cellulolytique ou leurs activités antimicrobiennes. Chacun pourrait donc avoir un rôle distinct à jouer au sein de la population. Précédemment, il a été évoqué la production d'antibiotiques par une souche comme bien commun de la population mais tous les métabolites spécialisés n'ont pas vocation à être des armes. En effet, les métabolites spécialisés peuvent aussi contribuer à l'établissement de symbiose (exemple lichens), à la croissance de la plante ou encore à la mobilité des organismes (Tyc, et al., **2017**).

BIBLIOGRAPHIE

NB: Seules les références non présentées dans les articles apparaîtront dans cette bibliographie

Abdelmohsen, U.R., Cheng, C., Viegelmann, C., Zhang, T., Grkovic, T., Ahmed, S., Quinn, R.J., Hentschel, U., Edrada-Ebel, R., 2014. Dereplication Strategies for Targeted Isolation of New Antitrypanosomal Actinosporins A and B from a Marine Sponge Associated-Actinokineospora sp. EG49. *Marine Drugs* 12, 1220–1244. <https://doi.org/10.3390/md12031220>

Abdelmohsen, U.R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M.S., Quinn, R.J., Hentschel, U., 2015. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances* 33, 798–811. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.003>

Adam, D., Maciejewska, M., Naômé, A., Martinet, L., Coppieters, W., Karim, L., Baurain, D., Rigali, S., 2018. Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Hard-to-Culture Actinobacteria from Cave Moonmilk Deposits. *Antibiotics* 7, 28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020028>

Aigle, B., Lautru, S., Spiteller, D., Dickschat, J.S., Challis, G.L., Leblond, P., Pernodet, J.-L., 2014. Genome mining of *Streptomyces ambofaciens*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41, 251–263. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1379-y>

Akaike, T., Maeda, H., 2000. Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 101, 300–308. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00142.x>

Albesa, I., Becerra, M.C., Battán, P.C., Páez, P.L., 2004. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, 605–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.085>

Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., 2015. Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. *Cell Death Dis* 6, e1609–e1609. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.570>

Almeida, R.S., Freitas, P.R., Araújo, A.C.J., Alencar Menezes, I.R., Santos, E.L., Tintino, S.R., Moura, T.F., Filho, J.R., Ferreira, V.A., Silva, A.C.A., Silva, L.E., do Amaral, W., Deschamps, C., Iriti, M., Melo Coutinho, H.D., 2020. GC-MS Profile and Enhancement of Antibiotic Activity by the Essential Oil of *Ocotea odorifera* and *Safrole*: Inhibition of *Staphylococcus aureus* Efflux Pumps. *Antibiotics* 9, 247. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050247>

Amiri Moghaddam, J., Crüsemann, M., Alanjary, M., Harms, H., Dávila-Céspedes, A., Blom, J., Poehlein, A., Ziemert, N., König, G.M., Schäberle, T.F., 2018. Analysis of the Genome and Metabolome of Marine Myxobacteria Reveals High Potential for Biosynthesis of Novel Specialized Metabolites. *Scientific Reports* 8, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34954-y>

Antony-Babu, S., Stien, D., Eparvier, V., Parrot, D., Tomasi, S., Suzuki, M.T., 2017. Multiple *Streptomyces* species with distinct secondary metabolomes have identical 16S rRNA gene sequences. *Sci Rep* 7, 11089. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11363-1>

Aqueveque, P., Céspedes, C.L., Becerra, J., Aranda, M., Sterner, O., 2017. Antifungal activities of secondary metabolites isolated from liquid fermentations of *Stereum hirsutum* (Sh134-11) against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). *Food and Chemical Toxicology* 109, 1048–1054. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.036>

Arbaayah, H., Umi Kalsom, Y., 2013. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. *Mycosphere* 4, 661–673. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/4/4/2>

Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Görg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., Riedel, K., Eberl, L., 2003. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environmental Microbiology* 5, 1350–1369. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00532.x>

- Austin, M.B., Noel, J.P., 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* 20, 79–110. <https://doi.org/10.1039/b100917f>
- Azzollini, A., Boggia, L., Boccard, J., Sgorbini, B., Lecoultré, N., Allard, P.-M., Rubiolo, P., Rudaz, S., Gindro, K., Bicchi, C., Wolfender, J.-L., 2018. Dynamics of Metabolite Induction in Fungal Co-cultures by Metabolomics at Both Volatile and Non-volatile Levels. *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00072>
- Bach, E.M., Williams, R.J., Hargreaves, S.K., Yang, F., Hofmockel, K.S., 2018. Greatest soil microbial diversity found in micro-habitats. *Soil Biology and Biochemistry* 118, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.12.018>
- Baidoo, E.E.K., Teixeira Benites, V., 2019. Mass Spectrometry-Based Microbial Metabolomics: Techniques, Analysis, and Applications, in: Baidoo, E.E.K. (Ed.), *Microbial Metabolomics*. Springer New York, New York, NY, pp. 11–69. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8757-3_2
- Baldrian, P., 2008. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology* 1, 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.02.001>
- Baltz, R.H., 2017. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol* 44, 573–588. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1815-x>
- Barry, S.M., Challis, G.L., 2009. Recent advances in siderophore biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 13, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.008>
- Basso, V., Schiavenin, C., Mendonça, S., de Siqueira, F.G., Salvador, M., Camassola, M., 2020. Chemical features and antioxidant profile by *Schizophyllum commune* produced on different agroindustrial wastes and byproducts of biodiesel production. *Food Chemistry* 329, 127089. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127089>
- Bates, S.T., Cropsey, G.W.G., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2011. Bacterial Communities Associated with the Lichen Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1309–1314. <https://doi.org/10.1128/AEM.02257-10>
- Becker, J., Eisenhauer, N., Scheu, S., Jousset, A., 2012. Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters* 15, 468–474. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01759.x>
- Beites, T., Pires, S.D.S., Santos, C.L., Osório, H., Moradas-Ferreira, P., Mendes, M.V., 2011. Crosstalk between ROS Homeostasis and Secondary Metabolism in *S. natalensis* ATCC 27448: Modulation of Pimaricin Production by Intracellular ROS. *PLoS ONE* 6, e27472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027472>
- Beites, T., Rodríguez-García, A., Moradas-Ferreira, P., Aparicio, J.F., Mendes, M.V., 2014. Genome-wide analysis of the regulation of pimaricin production in *Streptomyces natalensis* by reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 2231–2241. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5455-z>
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O’Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., Hopwood, D.A., 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141–147. <https://doi.org/10.1038/417141a>
- Bérdy, J., 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot* 65, 385–395. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>
- Bérdy, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *The Journal of Antibiotics* 58, 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>

- Berg, G., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere: Plant species, soil type and rhizosphere communities. *FEMS Microbiology Ecology* 68, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., Wolfender, J.-L., 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances* 32, 1180–1204. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.001>
- Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Bujard, A., Azzollini, A., Monod, M., Gindro, K., Wolfender, J.-L., 2013. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Chromatography A* 1292, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.098>
- Bladt, T.T., Dürr, C., Knudsen, P.B., Kildgaard, S., Frisvad, J.C., Gotfredsen, C.H., Seiffert, M., Larsen, T.O., 2013. Bio-Activity and Dereplication-Based Discovery of Ophiobolins and Other Fungal Secondary Metabolites Targeting Leukemia Cells. *Molecules* 18, 14629–14650. <https://doi.org/10.3390/molecules181214629>
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S.Y., Medema, M.H., Weber, T., 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* 47, W81–W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
- Bobrovskyy, M., Vanderpool, C.K., Richards, G.R., 2015. Small RNAs Regulate Primary and Secondary Metabolism in Gram-negative Bacteria, in: Conway, Cohen (Eds.), *Metabolism and Bacterial Pathogenesis*. American Society of Microbiology, pp. 59–94. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0009-2014>
- Bode, H.B., Wegner, B., Zeeck, A., 2000. Biosynthesis of Cladospirone Bisepoxide, A Member of the Spirobisnaphthalene Family. *J. Antibiot.* 53, 153–157. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.153>
- Bode, H.B., Zeeck, A., 2000. UV mutagenesis and enzyme inhibitors as tools to elucidate the late biosynthesis of the spirobisnaphthalenes. *Phytochemistry* 55, 311–316. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00307-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00307-1)
- Bok, J.W., Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Reyes-Dominguez, Y., Davidson, A.D., Sanchez, J.F., Lo, H.-C., Watanabe, K., Strauss, J., Oakley, B.R., Wang, C.C.C., Keller, N.P., 2009. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature Chemical Biology* 5, 462–464. <https://doi.org/10.1038/nchembio.177>
- Bok, J.W., Keller, N.P., 2004. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell* 3, 527–535. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.527-535.2004>
- Bonfante, P., Anca, I.-A., 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology* 63, 363–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073504>
- Bontemps, C., Toussaint, M., Revol, P.-V., Hotel, L., Jeanbille, M., Uroz, S., Turpault, M.-P., Blaudez, D., Leblond, P., 2013. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. *FEMS Microbiol Lett* 342, 157–167. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12126>
- Borodina, I., 2005. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Research* 15, 820–829. <https://doi.org/10.1101/gr.3364705>
- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H.J., Coenye, T., 2011. Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to Antibiotics In Vitro and In Vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 2655–2661. <https://doi.org/10.1128/AAC.00045-11>
- Brakhage, A.A., 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol* 11, 21–32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Brakhage, A.A., Schroeckh, V., 2011. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters.

Fungal Genetics and Biology 48, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.004>

Braña, A.F., Fiedler, H.-P., Nava, H., González, V., Sarmiento-Vizcaíno, A., Molina, A., Acuña, J.L., García, L.A., Blanco, G., 2015. Two *Streptomyces* Species Producing Antibiotic, Antitumor, and Anti-Inflammatory Compounds Are Widespread Among Intertidal Macroalgae and Deep-Sea Coral Reef Invertebrates from the Central Cantabrian Sea. *Microb Ecol* 69, 512–524. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0508-0>

Brandenburger, E., Gressler, M., Leonhardt, R., Lackner, G., Habel, A., Hertweck, C., Brock, M., Hoffmeister, D., 2017. A Highly Conserved Basidiomycete Peptide Synthetase Produces a Trimeric Hydroxamate Siderophore. *Appl Environ Microbiol* 83, e01478-17, e01478-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01478-17>

Braun, V., Pramanik, A., Gwinner, T., Köberle, M., Bohn, E., 2009. Sideromycins: tools and antibiotics. *Biometals* 22, 3–13. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9199-7>

Bursy, J., Kuhlmann, A.U., Pittelkow, M., Hartmann, H., Jebbar, M., Pierik, A.J., Bremer, E., 2008. Synthesis and Uptake of the Compatible Solutes Ectoine and 5-Hydroxyectoine by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in Response to Salt and Heat Stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7286–7296. <https://doi.org/10.1128/AEM.00768-08>

Canabady-Rochelle, L.L.S., Harscoat-Schiavo, C., Kessler, V., Aymes, A., Fournier, F., Girardet, J.-M., 2015. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry* 183, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.147>

Čáp, M., Váchová, L., Palková, Z., 2012. Reactive Oxygen Species in the Signaling and Adaptation of Multicellular Microbial Communities. *Oxid Med Cell Longev* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/976753>

Cassán, F., Vanderleyden, J., Spaepen, S., 2014. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul* 33, 440–459. <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>

Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D.A., Oliveira, T.C., Struelens, M.J., Suetens, C., Monnet, D.L., Strauss, R., Mertens, K., Struyf, T., Catry, B., Latour, K., Ivanov, I.N., Dobрева, E.G., Tambic Andrašević, A., Soprek, S., Budimir, A., Paphitou, N., Žemlicková, H., Schytte Olsen, S., Wolff Sönksen, U., Märtin, P., Ivanova, M., Lyytikäinen, O., Jalava, J., Coignard, B., Eckmanns, T., Abu Sin, M., Haller, S., Daikos, G.L., Gikas, A., Tsiodras, S., Kontopidou, F., Tóth, Á., Hajdu, Á., Guólaugsson, Ó., Kristinsson, K.G., Murchan, S., Burns, K., Pezzotti, P., Gagliotti, C., Dumpis, U., Liuimiene, A., Perrin, M., Borg, M.A., de Greeff, S.C., Monen, J.C., Koek, M.B., Elstrøm, P., Zabicka, D., Deptula, A., Hryniewicz, W., Caniça, M., Nogueira, P.J., Fernandes, P.A., Manageiro, V., Popescu, G.A., Serban, R.I., Schréterová, E., Litvová, S., Štefkovicová, M., Kolman, J., Klavs, I., Korošec, A., Aracil, B., Asensio, A., Pérez-Vázquez, M., Billström, H., Larsson, S., Reilly, J.S., Johnson, A., Hopkins, S., 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 19, 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)

Ceniceros, A., Dijkhuizen, L., Petrusma, M., Medema, M.H., 2017. Genome-based exploration of the specialized metabolic capacities of the genus *Rhodococcus*. *BMC Genomics* 18, 593. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3966-1>

Chagas, F.O., Dias, L.G., Pupo, M.T., 2013. A Mixed Culture of Endophytic Fungi Increases Production of Antifungal Polyketides. *Journal of Chemical Ecology* 39, 1335–1342. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0351-7>

Chagas, F.O., Pupo, M.T., 2018. Chemical interaction of endophytic fungi and actinobacteria from *Lychnophora ericoides* in co-cultures. *Microbiological Research* 212–213, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.005>

Champness, W., 2000. Actinomycete Development, Antibiotic Production, and Phylogeny: Questions and Challenges. *Prokaryotic Development* 11–31. <https://doi.org/10.1128/9781555818166.ch1>

- Chandra, G., Chater, K.F., 2008. Evolutionary flux of potentially bldA-dependent *Streptomyces* genes containing the rare leucine codon TTA. *Antonie van Leeuwenhoek* 94, 111–126. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9231-5>
- Charusanti, P., Fong, N.L., Nagarajan, H., Pereira, A.R., Li, H.J., Abate, E.A., Su, Y., Gerwick, W.H., Palsson, B.O., 2012. Exploiting Adaptive Laboratory Evolution of *Streptomyces clavuligerus* for Antibiotic Discovery and Overproduction. *PLOS ONE* 7, e33727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033727>
- Chatzimitakos, T.G., Stalikas, C.D., 2016. Qualitative Alterations of Bacterial Metabolome after Exposure to Metal Nanoparticles with Bactericidal Properties: A Comprehensive Workflow Based on ¹H NMR, UHPLC-HRMS, and Metabolic Databases. *J. Proteome Res.* 15, 3322–3330. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00489>
- Chen, S., Xu, J., Liu, C., Zhu, Y., Nelson, D.R., Zhou, S., Li, C., Wang, L., Guo, X., Sun, Y., Luo, H., Li, Y., Song, J., Henrissat, B., Levasseur, A., Qian, J., Li, J., Luo, X., Shi, L., He, L., Xiang, L., Xu, X., Niu, Y., Li, Q., Han, M.V., Yan, H., Zhang, J., Chen, H., Lv, A., Wang, Z., Liu, M., Schwartz, D.C., Sun, C., 2012. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat Commun* 3, 913. <https://doi.org/10.1038/ncomms1923>
- Chen, Y., Ntai, I., Ju, K.-S., Unger, M., Zamdborg, L., Robinson, S.J., Doroghazi, J.R., Labeda, D.P., Metcalf, W.W., Kelleher, N.L., 2012. A Proteomic Survey of Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis in Actinobacteria. *J Proteome Res* 11, 85–94. <https://doi.org/10.1021/pr2009115>
- Chevrette, M.G., Gutiérrez-García, K., Selem-Mojica, N., Aguilar-Martínez, C., Yañez-Olvera, A., Ramos-Aboites, H.E., Hoskisson, P.A., Barona-Gómez, F., 2020. Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 37, 566–599. <https://doi.org/10.1039/C9NP00048H>
- Christofides, S.R., Hiscox, J., Savoury, M., Boddy, L., Weightman, A.J., 2019. Fungal control of early-stage bacterial community development in decomposing wood. *Fungal Ecology* 42, 100868. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.100868>
- Cichewicz, R.H., 2010. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Nat. Prod. Rep.* 27, 11–22. <https://doi.org/10.1039/B920860G>
- Cilerdzic, J., Vukojevic, M.S. and J., 2016. Potential of Submergedly Cultivated Mycelia of *Ganoderma* spp. as Antioxidant and Antimicrobial Agents [WWW Document]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. URL <http://www.eurekaselect.com/135344/article> (accessed 4.8.20).
- Cör, D., Knez, Ž., Knez Hrnčič, M., 2018. Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review. *Molecules* 23, 649. <https://doi.org/10.3390/molecules23030649>
- Cordero, O.X., Datta, M.S., 2016. Microbial interactions and community assembly at microscales. *Current Opinion in Microbiology* 31, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.03.015>
- Cordero, O.X., Wildschutte, H., Kirkup, B., Proehl, S., Ngo, L., Hussain, F., Le Roux, F., Mincer, T., Polz, M.F., 2012. Ecological populations of bacteria act as socially cohesive units of antibiotic production and resistance. *Science* 337, 1228–1231. <https://doi.org/10.1126/science.1219385>
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S.C., Vinckx, T., 2011. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* 3, 540. <https://doi.org/10.1039/c1mt00022e>
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Crack, J.C., Munnoch, J., Dodd, E.L., Knowles, F., Al Bassam, M.M., Kamali, S., Holland, A.A., Cramer, S.P., Hamilton, C.J., Johnson, M.K., Thomson, A.J., Hutchings, M.I., Le Brun, N.E., 2015. NsrR from *Streptomyces*

- coelicolor Is a Nitric Oxide-sensing [4Fe-4S] Cluster Protein with a Specialized Regulatory Function. *J Biol Chem* 290, 12689–12704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643072>
- Crevelin, E.J., Crotti, A.E.M., Zucchi, T.D., Melo, I.S., Moraes, L.A.B., 2014. Dereplication of *Streptomyces* sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 49, 1117–1126. <https://doi.org/10.1002/jms.3432>
- David, E., Whitworth, E., Elliot, M.A., Buttner, M.J., Nodwell, J.R., n.d. in *Streptomyces*.
- de Crécy-Lagard, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., Bamas-Jacques, N., Crouzet, J., Thibaut, D., 1997. Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. *J Bacteriol* 179, 705–713.
- de Mattos-Shiple, K.M.J., Ford, K.L., Alberti, F., Banks, A.M., Bailey, A.M., Foster, G.D., 2016. The good, the bad and the tasty: The many roles of mushrooms. *Studies in Mycology* 85, 125–157. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.002>
- Deveau, A., Barret, M., Diedhiou, A.G., Leveau, J., de Boer, W., Martin, F., Sarniguet, A., Frey-Klett, P., 2015. Pairwise Transcriptomic Analysis of the Interactions Between the Ectomycorrhizal Fungus *Laccaria bicolor* S238N and Three Beneficial, Neutral and Antagonistic Soil Bacteria. *Microbial Ecology* 69, 146–159. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0445-y>
- Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervé, V., Labbé, J., Lastovetsky, O.A., Mieszkina, S., Millet, L.J., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, B.P., Olsson, S., van Elsas, J.D., Wick, L.Y., 2018. Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. *FEMS Microbiology Reviews* 42, 335–352. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy008>
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Calasso, M., Gobbetti, M., 2011. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. *Journal of Proteomics* 74, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.09.003>
- Dimkpa, C.O., Merten, D., Svatoš, A., Büchel, G., Kothe, E., 2009. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.010>
- Du, B., Yang, Y., Bian, Z., Xu, B., 2017. Characterization and Anti-Inflammatory Potential of an Exopolysaccharide from Submerged Mycelial Culture of *Schizophyllum commune*. *Front Pharmacol* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00252>
- Du, C., van Wezel, G.P., 2018. Mining for Microbial Gems: Integrating Proteomics in the Postgenomic Natural Product Discovery Pipeline. *Proteomics* 18. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700332>
- Du, J., Zhou, J., Xue, J., Song, H., Yuan, Y., 2012. Metabolomic profiling elucidates community dynamics of the *Ketogulonicigenium vulgare*–*Bacillus megaterium* consortium. *Metabolomics* 8, 960–973. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0392-2>
- El Ariebi, N., Hiscox, J., Scriven, S.A., Müller, C.T., Boddy, L., 2016. Production and effects of volatile organic compounds during interspecific interactions. *Fungal Ecology* 20, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.12.013>
- Ellis, B.M., Fischer, C.N., Martin, L.B., Bachmann, B.O., McLean, J.A., 2019. Spatiochemically Profiling Microbial Interactions with Membrane Scaffolded Desorption Electrospray Ionization-Ion Mobility-Imaging Mass Spectrometry and Unsupervised Segmentation. *Anal. Chem.* 91, 13703–13711. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02992>
- Felsenfeld, G., Groudine, M., 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453. <https://doi.org/10.1038/nature01411>

- Fernandes, P., 2006. Antibacterial discovery and development—the failure of success? *Nat Biotechnol* 24, 1497–1503. <https://doi.org/10.1038/nbt1206-1497>
- Fisch, K.M., 2013. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Adv.* 3, 18228. <https://doi.org/10.1039/c3ra42661k>
- Fischer, J., Müller, S.Y., Netzker, T., Jäger, N., Gacek-Matthews, A., Scherlach, K., Stroe, M.C., García-Altare, M., Pezzini, F., Schoeler, H., Reichelt, M., Gershenzon, J., Krespach, M.K., Shelest, E., Schroeckh, V., Valiante, V., Heinzl, T., Hertweck, C., Strauss, J., Brakhage, A.A., 2018. Chromatin mapping identifies BasR, a key regulator of bacteria-triggered production of fungal secondary metabolites. *eLife* 7, e40969. <https://doi.org/10.7554/eLife.40969>
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martínez, A.T., Otilar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P.M., Vries, R.P. de, Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Górecki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J.A., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Kues, U., Kumar, T.K.A., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L.F., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D.J., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nagy, L.G., Nolan, M., Ohm, R.A., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J.C., John, F.S., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, D.C., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, I.V., Hibbett, D.S., 2012. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science* 336, 1715–1719. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>
- Fogh, J. (Ed.), 1975. *Human Tumor Cells in Vitro*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1647-4>
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A., 2011. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75, 583–609. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11>
- Fu, H., Yuan, J., Gao, H., 2015. Microbial oxidative stress response: Novel insights from environmental facultative anaerobic bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 584, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.08.012>
- G, J., Rc, B., Rp, N., 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12055–12059. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.26.12055>
- Gago, G., Diacovich, L., Arabolaza, A., Tsai, S.-C., Gramajo, H., 2011. Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev* 35, 475–497. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00259.x>
- Galet, J., Deveau, A., Hôtel, L., Frey-Klett, P., Leblond, P., Aigle, B., 2015. *Pseudomonas fluorescens* Pirates both Ferrioxamine and Ferricoelichelin Siderophores from *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3132–3141. <https://doi.org/10.1128/AEM.03520-14>
- Galm, U., Hager, M.H., Van Lanen, S.G., Ju, J., Thorson, J.S., Shen, B., 2005. Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Eneidyne, and Mitomycin. *Chem. Rev.* 105, 739–758. <https://doi.org/10.1021/cr030117g>
- Ghobad-Nejhad, M., 2011. Wood-inhabiting Basidiomycetes in the Caucasus Region: systematics and biogeography.
- Giudice, L.D., Massardo, D.R., Pontieri, P., Berteà, C.M., Mombello, D., Carata, E., Tredici, S.M., Talà, A., Mucciarelli, M., Groudeva, V.I., Stefano, M.D., Vigliotta, G., Maffei, M.E., Alifano, P., 2008. The microbial community of Vetiver root and its involvement into essential oil biogenesis. *Environmental Microbiology* 10, 2824–2841. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01703.x>
- Gobat, J.-M., Aragno, M., Matthey, W., 2010. *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. PPUR Presses polytechniques.

- Gokhale, R.S., Saxena, P., Chopra, T., Mohanty, D., 2007. Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids. *Nat. Prod. Rep.* 24, 267–277. <https://doi.org/10.1039/B616817P>
- Goo, E., Kang, Y., Kim, H., Hwang, I., 2010. Proteomic Analysis of Quorum Sensing-Dependent Proteins in *Burkholderia glumae*. *J. Proteome Res.* 9, 3184–3199. <https://doi.org/10.1021/pr100045n>
- Goss, R.J.M., Shankar, S., Fayad, A.A., 2012. The generation of “unNatural” products: Synthetic biology meets synthetic chemistry. *Nat. Prod. Rep.* 29, 870. <https://doi.org/10.1039/c2np00001f>
- Grant, C., Rahman, F., Piekarz, R., Peer, C., Frye, R., Robey, R.W., Gardner, E.R., Figg, W.D., Bates, S.E., 2010. Romidepsin: a new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors. *Expert Review of Anticancer Therapy* 10, 997–1008. <https://doi.org/10.1586/era.10.88>
- Greiner, L., Keller, A., Grêt-Regamey, A., Papritz, A., 2017. Soil function assessment: review of methods for quantifying the contributions of soils to ecosystem services. *Land Use Policy* 69, 224–237. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2017.06.025>
- Gubbens, J., Zhu, H., Girard, G., Song, L., Florea, B.I., Aston, P., Ichinose, K., Filippov, D.V., Choi, Y.H., Overkleeft, H.S., Challis, G.L., van Wezel, G.P., 2014. Natural Product Proteomining, a Quantitative Proteomics Platform, Allows Rapid Discovery of Biosynthetic Gene Clusters for Different Classes of Natural Products. *Chemistry & Biology* 21, 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.03.011>
- Gurudeeban, S., Ramanathan, T., Satyavani, K., 2013. Antimicrobial and radical scavenging effects of alkaloid extracts from *Rhizophora mucronata*. *Pharm Chem J* 47, 50–53. <https://doi.org/10.1007/s11094-013-0895-4>
- Hahn, J.-S., Oh, S.-Y., Roe, J.-H., 2002. Role of OxyR as a Peroxide-Sensing Positive Regulator in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *JB* 184, 5214–5222. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5214-5222.2002>
- Halket, J.M., Waterman, D., Przyborowska, A., Patel, R.K.P., Fraser, P.D., Bramley, P.M., 2005. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of experimental botany*. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri069>
- Han, J., Liu, M., Jenkins, I.D., Liu, X., Zhang, L., Quinn, R.J., Feng, Y., 2020. Genome-Inspired Chemical Exploration of Marine Fungus *Aspergillus fumigatus* MF071. *Marine Drugs* 18, 352. <https://doi.org/10.3390/md18070352>
- Han, J.-J., Bao, L., He, L.-W., Zhang, X.-Q., Yang, X.-L., Li, S.-J., Yao, Y.-J., Liu, H., 2013. Phaeolschidins A–E, Five Hispidin Derivatives with Antioxidant Activity from the Fruiting Body of *Phaeolus schweinitzii* Collected in the Tibetan Plateau. *J. Nat. Prod.* 76, 1448–1453. <https://doi.org/10.1021/np400234u>
- Hao, C., Huang, S., Deng, Z., Zhao, C., Yu, Y., 2014. Mining of the Pyrrolamide Antibiotics Analogs in *Streptomyces netropsis* Reveals the Amidohydrolase-Dependent “Iterative Strategy” Underlying the Pyrrole Polymerization. *PLOS ONE* 9, e99077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099077>
- Hassani, M.A., Durán, P., Hacquard, S., 2018. Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6, 58. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0445-0>
- Heitman, Howlett, Crous, Stukenbrock, James, Gow (Eds.), 2017. Fungi that Infect Humans, in: *The Fungal Kingdom*. American Society of Microbiology, pp. 813–843. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016>
- Hennessy, R.C., Glaring, M.A., Olsson, S., Stougaard, P., 2017. Transcriptomic profiling of microbe–microbe interactions reveals the specific response of the biocontrol strain *P. fluorescens* In5 to the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *BMC Res Notes* 10. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2704-8>
- Herschend, J., Damholt, Z.B.V., Marquard, A.M., Svensson, B., Sørensen, S.J., Häggglund, P., Burmølle, M., 2017.

A meta-proteomics approach to study the interspecies interactions affecting microbial biofilm development in a model community. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16633-6>

Hertweck, C., 2009. The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 4688–4716. <https://doi.org/10.1002/anie.200806121>

Hervé, V., Ketter, E., Pierrat, J.-C., Gelhaye, E., Frey-Klett, P., 2016. Impact of *Phanerochaete chrysosporium* on the Functional Diversity of Bacterial Communities Associated with Decaying Wood. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147100>

Hervé, V., Le Roux, X., Uroz, S., Gelhaye, E., Frey-Klett, P., 2014. Diversity and structure of bacterial communities associated with *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Environmental Microbiology* 16, 2238–2252. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12347>

Hibbett, D.S., Binder, M., 2001. Evolution of Marine Mushrooms. *Biological Bulletin* 201, 319–322. <https://doi.org/10.2307/1543610>

Hiscox, J., O’Leary, J., Boddy, L., 2018. Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. *Studies in Mycology, Leading women in fungal biology* 89, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.02.003>

Hochgräfe, F., Wolf, C., Fuchs, S., Liebeke, M., Lalk, M., Engelmann, S., Hecker, M., 2008. Nitric Oxide Stress Induces Different Responses but Mediates Comparable Protein Thiol Protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *JB* 190, 4997–5008. <https://doi.org/10.1128/JB.01846-07>

Hoff, K.J., Stanke, M., 2013. WebAUGUSTUS--a web service for training AUGUSTUS and predicting genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 41, W123–W128. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt418>

Holinsworth, B., Martin, J.D., 2009. Siderophore production by marine-derived fungi. *Biometals* 22, 625–632. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9239-y>

Hoskisson, P.A., Fernández-Martínez, L.T., 2018. Regulation of specialised metabolites in Actinobacteria – expanding the paradigms. *Environ Microbiol Rep* 10, 231–238. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12629>

Huang, J., Shi, Y., Zeng, G., Gu, Y., Chen, G., Shi, L., Hu, Y., Tang, B., Zhou, J., 2016. Acyl-homoserine lactone-based quorum sensing and quorum quenching hold promise to determine the performance of biological wastewater treatments: An overview. *Chemosphere* 157, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.032>

Hubert, J., Nuzillard, J.-M., Renault, J.-H., 2017. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochemistry Reviews* 16, 55–95. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9448-7>

Ikeda, H., Nonomiya, T., Usami, M., Ohta, T., Omura, S., 1999. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 9509–9514. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9509>

Imlay, J.A., 2019. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environ Microbiol* 21, 521–530. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14445>

Indraningrat, A.A.G., Smidt, H., Sipkema, D., 2016. Bioprospecting Sponge-Associated Microbes for Antimicrobial Compounds. *Marine Drugs* 14, 87. <https://doi.org/10.3390/md14050087>

Jacob, M., Malkawi, A., Albast, N., Al Bougha, S., Lopata, A., Dasouki, M., Abdel Rahman, A.M., 2018. A targeted metabolomics approach for clinical diagnosis of inborn errors of metabolism. *Analytica Chimica Acta* 1025, 141–153. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.03.058>

Jain, S.K., Pathania, A.S., Parshad, R., Raina, C., Ali, A., Gupta, A.P., Kushwaha, M., Aravinda, S., Bhushan, S.,

- Bharate, S.B., Vishwakarma, R.A., 2013. Chrysomycins A–C, antileukemic naphthocoumarins from *Streptomyces sporeverrucosus*. *RSC Advances* 3, 21046. <https://doi.org/10.1039/c3ra42884b>
- Jenal, U., Reinders, A., Lori, C., 2017. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology* 15, 271–284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>
- Ji, Z., Wang, M., Wei, S., Zhang, J., Wu, W., 2009. Isolation, structure elucidation and antibacterial activities of streptothricin acids. *J Antibiot* 62, 233–237. <https://doi.org/10.1038/ja.2009.16>
- Jiao, W.-H., Hong, L.-L., Sun, J.-B., Piao, S.-J., Chen, G.-D., Deng, H., Wang, S.-P., Yang, F., Lin, H.-W., 2017. (±)-Hippolide J - A Pair of Unusual Antifungal Enantiomeric Sesterterpenoids from the Marine Sponge *Hippospongia lachne*: (±)-Hippolide J - A Pair of Unusual Antifungal Enantiomeric Sesterterpenoids from the Marine Sponge *Hippospongia lachne*. *Eur. J. Org. Chem.* 2017, 3421–3426. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700248>
- Johnston, S.R., Boddy, L., Weightman, A.J., 2016. Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 92, fiw179. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw179>
- Johnston, S.R., Hiscox, J., Savoury, M., Boddy, L., Weightman, A.J., 2019. Highly competitive fungi manipulate bacterial communities in decomposing beech wood (*Fagus sylvatica*). *FEMS Microbiol Ecol* 95. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy225>
- Juola, M., Kinnunen, K., Nielsen, K.F., von RIGHT, A., 2014. Surfactins in Natto: The Surfactin Production Capacity of the Starter Strains and the Actual Surfactin Contents in the Products. *Journal of Food Protection* 77, 2139–2143. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-030>
- Kamo, T., Sato, K., Sen, K., Shibata, H., Hirota, M., 2004. Geranylgeraniol-Type Diterpenoids, Boletinins A–J, from *Boletinus c avipes* as Inhibitors of Superoxide Anion Generation in Macrophage Cells. *J. Nat. Prod.* 67, 958–963. <https://doi.org/10.1021/np030535g>
- Kashmiri, Z.N., Mankar, S.A., 2014. Free radicals and oxidative stress in bacteria 7.
- Keller, N.P., 2019. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology* 17, 167–180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W., 2005. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3, 937–947. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1286>
- Kellett, M.E., Greenspan, P., Pegg, R.B., 2018. Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line. *Food Chemistry* 244, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.035>
- Kellis, M., Birren, B.W., Lander, E.S., 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428, 617–624. <https://doi.org/10.1038/nature02424>
- Khalil, Z.G., Cruz-Morales, P., Licon-Cassani, C., Marcellin, E., Capon, R.J., 2019. Inter-Kingdom beach warfare: Microbial chemical communication activates natural chemical defences. *ISME J* 13, 147–158. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0265-z>
- Khare, E., Mishra, J., Arora, N.K., 2018. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A., 2001. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi: 9th edition. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi: 9th edition.
- Kleinheinz, G.T., Bagley, S.T., St. John, W.P., Rughani, J.R., McGinnis, G.D., 1999. Characterization of Alpha-

- Pinene-Degrading Microorganisms and Application to a Bench-Scale Biofiltration System for VOC Degradation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 151–157. <https://doi.org/10.1007/s002449900500>
- Knežević, A., Stajić, M., Sofrenić, I., Stanojković, T., Milovanović, I., Tešević, V., Vukojević, J., 2018. Antioxidative, antifungal, cytotoxic and antineurodegenerative activity of selected *Trametes* species from Serbia. *PLOS ONE* 13, e0203064. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203064>
- König, C.C., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Nietzsche, S., Brakhage, A.A., Hertweck, C., 2013. Bacterium Induces Cryptic Meroterpenoid Pathway in the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem* 14, 938–942. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300070>
- König, G.M., Wright, A.D., Aust, H.-J., Draeger, S., Schulz, B., 1999. Geniculol, a New Biologically Active Diterpene from the Endophytic Fungus *Geniculosporium* sp. *J. Nat. Prod.* 62, 155–157. <https://doi.org/10.1021/np9802670>
- Koyama, A., Wallenstein, M.D., Simpson, R.T., Moore, J.C., 2014. Soil bacterial community composition altered by increased nutrient availability in Arctic tundra soils. *Front Microbiol* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00516>
- Kramer, J., Özkaya, Ö., Kümmerli, R., 2020. Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nat Rev Microbiol* 18, 152–163. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>
- Krause, K., Jung, E.-M., Lindner, J., Hardiman, I., Poetschner, J., Madhavan, S., Matthäus, C., Kai, M., Menezes, R.C., Popp, J., Svatoš, A., Kothe, E., 2020. Response of the wood-decay fungus *Schizophyllum commune* to co-occurring microorganisms. *PLoS One* 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232145>
- Lanfear, D.E., Gibbs, J.J., Li, J., She, R., Petucci, C., Culver, J.A., Tang, W.H.W., Pinto, Y.M., Williams, L.K., Sabbah, H.N., Gardell, S.J., 2017. Targeted Metabolomic Profiling of Plasma and Survival in Heart Failure Patients. *JACC: Heart Failure* 5, 823–832. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2017.07.009>
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5111–5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00335-09>
- Laureti, L., Song, L., Huang, S., Corre, C., Leblond, P., Challis, G.L., Aigle, B., 2011. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *PNAS* 108, 6258–6263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019077108>
- Lefevre, F., Robe, P., Jarrin, C., Ginolhac, A., Zago, C., Auriol, D., Vogel, T.M., Simonet, P., Nalin, R., 2008. Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. *Research in Microbiology* 159, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.011>
- Lehr, N.A., Adomas, A., Asiegbu, F.O., Hampp, R., Tarkka, M.T., 2009. WS-5995 B, an antifungal agent inducing differential gene expression in the conifer pathogen *Heterobasidion annosum* but not in *Heterobasidion abietinum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 347–358. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2254-7>
- Lehr, N.-A., Schrey, S.D., Hampp, R., Tarkka, M.T., 2008. Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol* 177, 965–976. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02322.x>
- Leonard, C.A., Brown, S.D., Hayman, J.R., 2013. Random Mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* Genome Results in Fungal Antibacterial Activity. *International Journal of Microbiology* 2013, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2013/901697>
- Li, L., Ma, T., Liu, Q., Huang, Y., Hu, C., Liao, G., 2013. Improvement of Daptomycin Production in *Streptomyces roseosporus* through the Acquisition of Pleuromutilin Resistance. *BioMed Research International* 2013, 1–6.

<https://doi.org/10.1155/2013/479742>

Li, Q., Xu, Z., Hao, B., 2010. Composition vector approach to whole-genome-based prokaryotic phylogeny: Success and foundations. *Journal of Biotechnology* 149, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.015>

Lichius, A., Lord, K.M., 2014. Chemoattractive Mechanisms in Filamentous Fungi. *TOMYCJ* 8, 28–57. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010028>

Lingham, R.B., Silverman, K.C., Jayasuriya, H., Kim, B.M., Amo, S.E., Wilson, F.R., Rew, D.J., Schaber, M.D., Bergstrom, J.D., Koblan, K.S., Graham, S.L., Kohl, N.E., Gibbs, J.B., Singh, S.B., n.d. Clavarinic Acid and Steroidal Analogues as Ras- and FPP-Directed Inhibitors of Human Farnesyl-Protein Transferase 10.

Liu, X.-T., Winkler, A.L., Schwan, W.R., Volk, T.J., Rott, M.A., Monte, A., 2010. Antibacterial Compounds from Mushrooms I: A Lanostane-Type Triterpene and Prenylphenol Derivatives from *Jahnoporus hirtus* and *Albatrellus flettii* and Their Activities Against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*. *Planta Med* 76, 182–185. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1186001>

Luti, K.J.K., Mavituna, F., 2011. Elicitation of *Streptomyces coelicolor* with dead cells of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* in a bioreactor increases production of undecylprodigiosin. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 461–466. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3032-2>

Macintyre, L., Zhang, T., Viegelmann, C., Martinez, I.J., Cheng, C., Dowdells, C., Abdelmohsen, U.R., Gernert, C., Hentschel, U., Edrada-Ebel, R., 2014. Metabolomic Tools for Secondary Metabolite Discovery from Marine Microbial Symbionts. *Marine Drugs* 12, 3416–3448. <https://doi.org/10.3390/md12063416>

MacLean, R.C., San Millan, A., 2019. The evolution of antibiotic resistance. *Science* 365, 1082–1083. <https://doi.org/10.1126/science.aax3879>

Mao, D., Okada, B.K., Wu, Y., Xu, F., Seyedsayamdost, M.R., 2018. Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 45, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.05.001>

Martín, J.F., Liras, P., 2019. Harnessing microbiota interactions to produce bioactive metabolites: communication signals and receptor proteins. *Current Opinion in Pharmacology, • Anti-infectives • New technologies • Neurosciences -CNS diseases and the microbiome* 48, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.02.014>

Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, A.T., Kersten, P., Hammel, K.E., Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Splinter BonDurant, S., Larrondo, L.F., Canessa, P., Vicuna, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A.G., Lavín, J.L., Oguiza, J.A., Master, E., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Harris, P., Magnuson, J.K., Baker, S.E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P.J., Kües, U., Ramaiya, P., Lucas, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C.L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I.V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka, R., Cullen, D., 2009. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1954–1959. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809575106>

Medema, M.H., Kottmann, R., Yilmaz, P., Cummings, M., Biggins, J.B., Blin, K., de Bruijn, I., Chooi, Y.H., Claesen, J., Coates, R.C., Cruz-Morales, P., Duddela, S., Dusterhus, S., Edwards, D.J., Fewer, D.P., Garg, N., Geiger, C., Gomez-Escribano, J.P., Greule, A., Hadjithomas, M., Haines, A.S., Helfrich, E.J.N., Hillwig, M.L., Ishida, K., Jones, A.C., Jones, C.S., Jungmann, K., Kegler, C., Kim, H.U., Kötter, P., Krug, D., Masschelein, J., Melnik, A.V., Mantovani, S.M., Monroe, E.A., Moore, M., Moss, N., Nützmann, H.-W., Pan, G., Pati, A., Petras, D., Reen, F.J., Rosconi, F., Rui, Z., Tian, Z., Tobias, N.J., Tsunematsu, Y., Wiemann, P., Wyckoff, E., Yan, X., Yim, G., Yu, F., Xie, Y., Aigle, B., Apel, A.K., Balibar, C.J., Balskus, E.P., Barona-Gómez, F., Bechthold, A., Bode, H.B., Borriss, R., Brady, S.F., Brakhage, A.A., Caffrey, P., Cheng, Y.-Q., Clardy, J., Cox, R.J., De Mot, R., Donadio, S., Donia, M.S., van der Donk, W.A., Dorrestein, P.C., Doyle, S., Driessen, A.J.M., Ehling-Schulz, M.,

Entian, K.-D., Fischbach, M.A., Gerwick, L., Gerwick, W.H., Gross, H., Gust, B., Hertweck, C., Höfte, M., Jensen, S.E., Ju, J., Katz, L., Kaysser, L., Klassen, J.L., Keller, N.P., Kormanec, J., Kuipers, O.P., Kuzuyama, T., Kyrpides, N.C., Kwon, H.-J., Lautru, S., Lavigne, R., Lee, C.Y., Linquan, B., Liu, X., Liu, W., Luzhetskyy, A., Mahmud, T., Mast, Y., Méndez, C., Metsä-Ketelä, M., Micklefield, J., Mitchell, D.A., Moore, B.S., Moreira, L.M., Müller, R., Neilan, B.A., Nett, M., Nielsen, J., O’Gara, F., Oikawa, H., Osbourn, A., Osburne, M.S., Ostash, B., Payne, S.M., Pernodet, J.-L., Petricek, M., Piel, J., Ploux, O., Raaijmakers, J.M., Salas, J.A., Schmitt, E.K., Scott, B., Seipke, R.F., Shen, B., Sherman, D.H., Sivonen, K., Smanski, M.J., Sosio, M., Stegmann, E., Süßmuth, R.D., Tahlan, K., Thomas, C.M., Tang, Y., Truman, A.W., Viaud, M., Walton, J.D., Walsh, C.T., Weber, T., van Wezel, G.P., Wilkinson, B., Willey, J.M., Wohlleben, W., Wright, G.D., Ziemert, N., Zhang, C., Zotchev, S.B., Breitling, R., Takano, E., Glöckner, F.O., 2015. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nat Chem Biol* 11, 625–631. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1890>

Metz, J.G., 2001. Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Polyketide Synthases in Both Prokaryotes and Eukaryotes. *Science* 293, 290–293. <https://doi.org/10.1126/science.1059593>

Minerdi, D., Moretti, M., Gilardi, G., Barberio, C., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2008. Bacterial ectosymbionts and virulence silencing in a *Fusarium oxysporum* strain. *Environ Microbiol* 10, 1725–1741. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01594.x>

Miranda, R.U., Gómez-Quiroz, L.E., Mendoza, M., Pérez-Sánchez, A., Fierro, F., Barrios-González, J., 2014. Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biology* 118, 979–989. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.09.002>

Mohimani, H., Gurevich, A., Shlemov, A., Mikheenko, A., Korobeynikov, A., Cao, L., Shcherbin, E., Nothias, L.-F., Dorrestein, P.C., Pevzner, P.A., 2018. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nat Commun* 9, 4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>

Molloy, E.M., Hertweck, C., 2017. Antimicrobial discovery inspired by ecological interactions. *Current Opinion in Microbiology* 39, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.006>

Moody, S.C., 2014. Microbial co-culture: harnessing intermicrobial signaling for the production of novel antimicrobials. *Future Microbiology* 9, 575–578. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.25>

Moree, W.J., Yang, J.Y., Zhao, X., Liu, W.-T., Aparicio, M., Atencio, L., Ballesteros, J., Sánchez, J., Gavilán, R.G., Gutiérrez, M., Dorrestein, P.C., 2013. Imaging Mass Spectrometry of a Coral Microbe Interaction with Fungi. *J Chem Ecol* 39, 1045–1054. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0320-1>

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Mothana, R.A.A., Jansen, R., Jülich, W.-D., Lindequist, U., 2000. Ganomycins A and B, New Antimicrobial Farnesyl Hydroquinones from the Basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *J. Nat. Prod.* 63, 416–418. <https://doi.org/10.1021/np990381y>

Musa, Z., Ma, J., Egamberdieva, D., Abdelshafy Mohamad, O.A., Abaydulla, G., Liu, Y., Li, W.-J., Li, L., 2020. Diversity and Antimicrobial Potential of Cultivable Endophytic Actinobacteria Associated With the Medicinal Plant *Thymus roseus*. *Front. Microbiol.* 11, 191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00191>

Myronovskiy, M., Luzhetskyy, A., 2019. Heterologous production of small molecules in the optimized *Streptomyces* hosts. *Nat. Prod. Rep.* 36, 1281–1294. <https://doi.org/10.1039/C9NP00023B>

Nalini Kanta, S., G, T., Madhusmita, S., Ks, M., 2020. An overview on NMR spectroscopy based metabolomics. *Int J Pharm Sci Dev Res* 6, 016–020. <https://doi.org/10.17352/ijpsdr.000029>

Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity

and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54, 655–670. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>

Navarro-Muñoz, J.C., Selem-Mojica, N., Mullooney, M.W., Kautsar, S., Tryon, J.H., Parkinson, E.I., Santos, E.L.C.D.L., Yeong, M., Cruz-Morales, P., Abubucker, S., Roeters, A., Lokhorst, W., Fernandez-Guerra, A., Cappelini, L.T.D., Thomson, R.J., Metcalf, W.W., Kelleher, N.L., Barona-Gomez, F., Medema, M.H., 2018. A computational framework for systematic exploration of biosynthetic diversity from large-scale genomic data. *bioRxiv* 445270. <https://doi.org/10.1101/445270>

Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D.J., König, C.C., Valiante, V., Schroeckh, V., Brakhage, A.A., 2015. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00299>

Netzker, T., Flak, M., Krespach, M.K., Stroe, M.C., Weber, J., Schroeckh, V., Brakhage, A.A., 2018a. Microbial interactions trigger the production of antibiotics. *Current Opinion in Microbiology* 45, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.002>

Netzker, T., Flak, M., Krespach, M.K., Stroe, M.C., Weber, J., Schroeckh, V., Brakhage, A.A., 2018b. Microbial interactions trigger the production of antibiotics. *Current Opinion in Microbiology* 45, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.002>

Nicault, M., Tidjani, A.-R., Gauthier, A., Dumarcay, S., Gelhaye, E., Bontemps, C., Leblond, P., 2020. Mining the Biosynthetic Potential for Specialized Metabolism of a *Streptomyces* Soil Community. *Antibiotics* 9, 271. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050271>

Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I.V., Dubchak, I., 2014. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Res* 42, D26–D31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1069>

Ochi, K., 2017. Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. *The Journal of Antibiotics* 70, 25–40. <https://doi.org/10.1038/ja.2016.82>

Ohm, R.A., de Jong, J.F., Lugones, L.G., Aerts, A., Kothe, E., Stajich, J.E., de Vries, R.P., Record, E., Levasseur, A., Baker, S.E., Bartholomew, K.A., Coutinho, P.M., Erdmann, S., Fowler, T.J., Gathman, A.C., Lombard, V., Henrissat, B., Knabe, N., Kües, U., Lilly, W.W., Lindquist, E., Lucas, S., Magnuson, J.K., Piumi, F., Raudaskoski, M., Salamov, A., Schmutz, J., Schwarze, F.W.M.R., vanKuyk, P.A., Horton, J.S., Grigoriev, I.V., Wösten, H.A.B., 2010. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotechnology* 28, 957–963. <https://doi.org/10.1038/nbt.1643>

Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., Horinouchi, S., 2008. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology* 190, 4050–4060. <https://doi.org/10.1128/JB.00204-08>

Ōmura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *PNAS* 98, 12215–12220. <https://doi.org/10.1073/pnas.211433198>

Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., Furumai, T., 2011. Mycolic Acid-Containing Bacteria Induce Natural-Product Biosynthesis in *Streptomyces* Species. *Appl Environ Microbiol* 77, 400–406. <https://doi.org/10.1128/AEM.01337-10>

Oppong-Danquah, E., Budnicka, P., Blümel, M., Tasdemir, D., 2020. Design of Fungal Co-Cultivation Based on Comparative Metabolomics and Bioactivity for Discovery of Marine Fungal Agrochemicals. *Marine Drugs* 18, 73. <https://doi.org/10.3390/md18020073>

- Ormerod, A.D., Copeland, P., Hay, I., Husain, A., Ewen, S.W.B., 1999. The Inflammatory and Cytotoxic Effects of a Nitric Oxide Releasing Cream on Normal Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 113, 392–397. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00692.x>
- Ourisson, G., Rohmer, M., Poralla, K., 1987. Prokaryotic Hopanoids and other Polyterpenoid Sterol Surrogates. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 301–333. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.001505>
- Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H., Wang, H., 2019. Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. *Front. Microbiol.* 10, 294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00294>
- Park, H.B., Kwon, H.C., Lee, C.-H., Yang, H.O., 2009. Glionitrin A, an Antibiotic–Antitumor Metabolite Derived from Competitive Interaction between Abandoned Mine Microbes. *J. Nat. Prod.* 72, 248–252. <https://doi.org/10.1021/np800606e>
- Parret, A.H.A., Schoofs, G., Proost, P., De Mot, R., 2003. Plant Lectin-Like Bacteriocin from a Rhizosphere-Colonizing *Pseudomonas* Isolate. *J Bacteriol* 185, 897–908. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.897-908.2003>
- Pavlov, A.R., Tyazhelova, T.V., Moiseenko, K.V., Vasina, D.V., Mosunova, O.V., Fedorova, T.V., Maloshenok, L.G., Landesman, E.O., Bruskin, S.A., Psurtseva, N.V., Slesarev, A.I., Kozyavkin, S.A., Koroleva, O.V., 2015. Draft Genome Sequence of the Fungus *Trametes hirsuta* 072. *Genome Announc* 3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01287-15>
- Perazzolli, M., Herrero, N., Sterck, L., Lenzi, L., Pellegrini, A., Puopolo, G., Van de Peer, Y., Pertot, I., 2016. Transcriptomic responses of a simplified soil microcosm to a plant pathogen and its biocontrol agent reveal a complex reaction to harsh habitat. *BMC Genomics* 17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3174-4>
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Braña, A.F., Shinkets, L.J., Sevillano, L., Santamaría, R.I., 2011. *Myxococcus xanthus* induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microbial Biotechnology* 4, 175–183. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00208.x>
- Perotto, S., Angelini, P., Bianciotto, V., Bonfante, P., Girlanda, M., Kull, T., Mello, A., Pecoraro, L., Perini, C., Persiani, A.M., Saitta, A., Sarrocco, S., Vannacci, G., Venanzoni, R., Venturella, G., Selosse, M.A., 2013. Interactions of fungi with other organisms. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 147, 208–218. <https://doi.org/10.1080/11263504.2012.753136>
- Pettit, R.K., 2011. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites: Elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial Biotechnology* 4, 471–478. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00196.x>
- Piao, S.-J., Jiao, W.-H., Yang, F., Yi, Y.-H., Di, Y.-T., Han, B.-N., Lin, H.-W., 2014. New Hippolide Derivatives with Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activity from the Marine Sponge *Hippospongia lachne*. *Marine Drugs* 12, 4096–4109. <https://doi.org/10.3390/md12074096>
- Piel, J., 2011. Approaches to Capturing and Designing Biologically Active Small Molecules Produced by Uncultured Microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 431–453. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102805>
- Prajapati, D., Kumari, N., Dave, K., Chatupale, V., Pohnerkar, J., 2019. Chromomycin, an antibiotic produced by *Streptomyces flaviscleroticus* might play a role in the resistance to oxidative stress and is essential for viability in stationary phase. *Environ. Microbiol.* 21, 814–826. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14515>
- Quin, M.B., Flynn, C.M., Schmidt-Dannert, C., 2014. Traversing the fungal terpenome. *Nat. Prod. Rep.* 31, 1449–1473. <https://doi.org/10.1039/C4NP00075G>
- Rakshith, D., Santosh, P., Tarman, K., Gurudatt, D., Satish, S., 2013. Dereplication strategy for antimicrobial metabolite using thin-layer chromatography-bioautography and LC-PDA-MS analysis. *Journal of Planar*

Chromatography – Modern TLC 26, 470–474. <https://doi.org/10.1556/JPC.26.2013.6.2>

Rateb, M.E., Hallyburton, I., Houssen, W.E., Bull, A.T., Goodfellow, M., Santhanam, R., Jaspars, M., Ebel, R., 2013. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Adv.* 3, 14444. <https://doi.org/10.1039/c3ra42378f>

Ren, T., Roy, R., Knowles, R., 2000. Production and Consumption of Nitric Oxide by Three Methanotrophic Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 66, 3891–3897.

Richter, C., Helaly, S.E., Thongbai, B., Hyde, K.D., Stadler, M., 2016. Pyristriatins A and B: Pyridino-Cyathane Antibiotics from the Basidiomycete *Cyathus cf. striatus*. *J. Nat. Prod.* 79, 1684–1688. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00194>

Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey, F.E., Cheng, J., Duncan, A.E., Kau, A.L., Griffin, N.W., Lombard, V., Henrissat, B., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Ilkayeva, O., Semenkovich, C.F., Funai, K., Hayashi, D.K., Lyle, B.J., Martini, M.C., Ursell, L.K., Clemente, J.C., Treuren, W.V., Walters, W.A., Knight, R., Newgard, C.B., Heath, A.C., Gordon, J.I., 2013. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science* 341. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>

Rikkinen, J., 2013. Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. *MC* 6, 3–32. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.6.3869>

Rikkinen, J., 2003. Cyanolichens: An Evolutionary Overview, in: Rai, A.N., Bergman, B., Rasmussen, U. (Eds.), *Cyanobacteria in Symbiosis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 31–72. https://doi.org/10.1007/0-306-48005-0_4

Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otilar, R., Lindquist, E.A., Sun, H., LaButti, K.M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S.E., Pisabarro, A.G., Walton, J.D., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D.S., Grigoriev, I.V., 2014a. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *PNAS* 111, 9923–9928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400592111>

Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otilar, R., Lindquist, E.A., Sun, H., LaButti, K.M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S.E., Pisabarro, A.G., Walton, J.D., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D.S., Grigoriev, I.V., 2014b. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 9923–9928. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400592111>

Romero, D., Traxler, M.F., López, D., Kolter, R., 2011. Antibiotics as Signal Molecules. *Chem. Rev.* 111, 5492–5505. <https://doi.org/10.1021/cr2000509>

Rukachaisirikul, V., Chingpha, S., Phongpaichit, S., Saikhwan, N., Sakayaroj, J., Preedanon, S., 2019. Sesquiterpene and monoterpene derivatives from the soil-derived fungus *Trichoderma reesei* PSU-SPSF013. *Phytochemistry Letters* 30, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.01.023>

Rutledge, P.J., Challis, G.L., 2015. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology* 13, 509–523. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3496>

Sakoulas, G., Nam, S.-J., Loesgen, S., Fenical, W., Jensen, P.R., Nizet, V., Hensler, M., 2012. Novel bacterial metabolite merochlorin A demonstrates in vitro activity against multi-drug resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 7, e29439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029439>

Sandargo, B., Chepkirui, C., Cheng, T., Chaverra-Muñoz, L., Thongbai, B., Stadler, M., Hüttel, S., 2019. Biological and chemical diversity go hand in hand: Basidiomycota as source of new pharmaceuticals and agrochemicals. *Biotechnology Advances* 37, 107344. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.01.011>

- Sassone-Corsi, M., Nuccio, S.-P., Liu, H., Hernandez, D., Vu, C.T., Takahashi, A.A., Edwards, R.A., Raffatellu, M., 2016. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature* 540, 280–283. <https://doi.org/10.1038/nature20557>
- Sauder, L.A., Ross, A.A., Neufeld, J.D., 2016. Nitric oxide scavengers differentially inhibit ammonia oxidation in ammonia-oxidizing archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 363. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw052>
- Sawant, I.S., 2014. Trichoderma- Foliar Pathogen Interactions. *TOMYCJ* 8, 58–70. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010058>
- Sayers, E.W., Agarwala, R., Bolton, E.E., Brister, J.R., Canese, K., Clark, K., Connor, R., Fiorini, N., Funk, K., Hefferon, T., Holmes, J.B., Kim, S., Kimchi, A., Kitts, P.A., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T.L., Marchler-Bauer, A., Phan, L., Schneider, V.A., Schoch, C.L., Pruitt, K.D., Ostell, J., 2019. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 47, D23–D28. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1069>
- Scarpari, M., Reverberi, M., Parroni, A., Scala, V., Fanelli, C., Pietricola, C., Zjalic, S., Maresca, V., Tafuri, A., Ricciardi, M.R., Licchetta, R., Mirabili, S., Sveronis, A., Cescutti, P., Rizzo, R., 2017. Tramesan, a novel polysaccharide from *Trametes versicolor*. Structural characterization and biological effects. *PLoS ONE* 12, e0171412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171412>
- Scherlach, K., Partida-Martinez, L.P., Dahse, H.-M., Hertweck, C., 2006. Antimitotic Rhizoxin Derivatives from a Cultured Bacterial Endosymbiont of the Rice Pathogenic Fungus *Rhizopus microsporus*. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 11529–11536. <https://doi.org/10.1021/ja062953o>
- Schlatter, D.C., Kinkel, L.L., 2015. Do tradeoffs structure antibiotic inhibition, resistance, and resource use among soil-borne *Streptomyces*? *BMC evolutionary biology*, *BMC evolutionary biology* [electronic resource] 15, 186. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0470-6>
- Schmidt, R., Cordovez, V., de Boer, W., Raaijmakers, J., Garbeva, P., 2015. Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME Journal* 9, 2329–2335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.42>
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nutzmann, H.-W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C., Brakhage, A.A., 2009. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 14558–14563. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901870106>
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., Garbeva, P., 2017. Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Front. Microbiol.* 8, 2484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02484>
- Seipke, R.F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Yu, D.W., Goss, R.J.M., Hutchings, M.I., 2011. A Single *Streptomyces* Symbiont Makes Multiple Antifungals to Support the Fungus Farming Ant Acromyrmex octospinosus. *PLoS ONE* 6, e22028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022028>
- Seo, S.W., Kim, D., Szubin, R., Palsson, B.O., 2015. Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell Reports* 12, 1289–1299. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.043>
- Shih, C.-J., Chen, P.-Y., Liaw, C.-C., Lai, Y.-M., Yang, Y.-L., 2014. Bringing microbial interactions to light using imaging mass spectrometry. *Nat. Prod. Rep.* 31, 739–755. <https://doi.org/10.1039/C3NP70091G>
- Singh, R.S., Walia, A.K., 2014. Characteristics of lichen lectins and their role in symbiosis. *Symbiosis* 62, 123–134. <https://doi.org/10.1007/s13199-014-0278-y>
- Sivalingam, P., Hong, K., Pote, J., Prabakar, K., 2019. Extreme Environment *Streptomyces* : Potential Sources for New Antibacterial and Anticancer Drug Leads? *International Journal of Microbiology* 2019, 1–20.

<https://doi.org/10.1155/2019/5283948>

Smedsgaard, J., Nielsen, J., 2005. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *Journal of Experimental Botany* 56, 273–286. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri068>

Smith, A.P., Marín-Spiotta, E., de Graaff, M.A., Balsler, T.C., 2014. Microbial community structure varies across soil organic matter aggregate pools during tropical land cover change. *Soil Biology and Biochemistry* 77, 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.05.030>

Sola-Landa, A., Moura, R.S., Martín, J.F., 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6133–6138. <https://doi.org/10.1073/pnas.0931429100>

Somma, S., Gastaldo, L., Corti, A., 1984. Teicoplanin, a new antibiotic from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. *Antimicrob Agents Chemother* 26, 917–923.

Song, C., Schmidt, R., de Jager, V., Krzyzanowska, D., Jongedijk, E., Cankar, K., Beekwilder, J., van Veen, A., de Boer, W., van Veen, J.A., Garbeva, P., 2015. Exploring the genomic traits of fungus-feeding bacterial genus *Collimonas*. *BMC Genomics* 16, 1103. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2289-3>

Song, J., Weon, H.-Y., Yoon, S.-H., Park, D.-S., Go, S.-J., Suh, J.-W., 2001. Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces* spp. isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett* 202, 97–102. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10786.x>

Sonnenbichler, J., Dietrich, J., Peipp, H., 1994. Secondary Fungal Metabolites and Their Biological Activities, V. Investigations Concerning the Induction of the Biosynthesis of Toxic Secondary Metabolites in Basidiomycetes. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 375, 71–80. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1994.375.1.71>

Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2011. Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>

Stark, W.M., Boeck, L.D., 1965. Biosynthesis of capreomycin I in a chemically defined medium. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 5, 157–164.

Suay, I., Arenal, F., Asensio, F.J., Basilio, A., Angeles Cabello, M., Teresa Díez, M., García, J.B., González del Val, A., Gorrochategui, J., Hernández, P., Peláez, F., Francisca Vicente, M., 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78, 129–140. <https://doi.org/10.1023/A:1026552024021>

Suroto, D.A., Kitani, S., Arai, M., Ikeda, H., Nihira, T., 2018. Characterization of the biosynthetic gene cluster for cryptic phthoxazolin A in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS ONE* 13, e0190973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190973>

Szewczyk, E., Chiang, Y.-M., Oakley, C.E., Davidson, A.D., Wang, C.C.C., Oakley, B.R., 2008. Identification and Characterization of the Asperthecin Gene Cluster of *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7607–7612. <https://doi.org/10.1128/AEM.01743-08>

Takehana, Y., Umekita, M., Hatano, M., Kato, C., Sawa, R., Igarashi, M., 2017. Fradiamine A, a new siderophore from the deep-sea actinomycete *Streptomyces fradiae* MM456M-mF7. *J Antibiot* 70, 611–615. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.26>

Tan, L.T.-H., Chan, K.-G., Khan, T.M., Bukhari, S.I., Saokaew, S., Duangjai, A., Pusparajah, P., Lee, L.-H., Goh, B.-H., 2017. *Streptomyces* sp. MUM212 as a Source of Antioxidants with Radical Scavenging and Metal Chelating Properties. *Front. Pharmacol.* 8, 276. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00276>

Tanaka, I., Tanimoto, T., Hamano, K., Hosoya, T., 2001. Recovery of degenerate schizostatin production by screening single-basidiospore isolates in *Schizophyllum commune*. *Mycoscience* 42, 627–630.

<https://doi.org/10.1007/BF02460962>

Tarkka, M.T., Lehr, N.-A., Hampp, R., Schrey, S.D., 2008. Plant behavior upon contact with Streptomyces. *Plant Signal Behav* 3, 917–919.

Taylor, R.F., 1984. Bacterial triterpenoids. *Microbiol Rev* 48, 181–198.

Tian, M., Zhao, P., Li, G., Zhang, K., 2020. In Depth Natural Product Discovery from the Basidiomycetes *Stereum* Species. *Microorganisms* 8, 1049. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071049>

Tidjani, A.-R., Lorenzi, J.-N., Toussaint, M., van Dijk, E., Naquin, D., Lespinet, O., Bontemps, C., Leblond, P., 2019a. Genome Sequences of 11 Conspecific *Streptomyces* sp. Strains. *Microbiol Resour Announc* 8, MRA.00863-19, e00863-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00863-19>

Tidjani, A.-R., Lorenzi, J.-N., Toussaint, M., van Dijk, E., Naquin, D., Lespinet, O., Bontemps, C., Leblond, P., 2019b. Massive Gene Flux Drives Genome Diversity between Sympatric *Streptomyces* Conspecifics. *mBio* 10, e01533-19, /mbio/10/5/mBio.01533-19.atom. <https://doi.org/10.1128/mBio.01533-19>

Tillotson, R.D., Wösten, H. a. B., Richter, M., Willey, J.M., 1998. A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. *Molecular Microbiology* 30, 595–602. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01093.x>

Turneroche, A., Lami, R., Hubas, C., Blanchet, E., Vallet, M., Escoubeyrou, K., Paris, A., Prado, S., 2019. Bacterial–Fungal Interactions in the Kelp Endomicrobiota Drive Autoinducer-2 Quorum Sensing. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01693>

Traxler, M.F., Kolter, R., 2015. Natural products in soil microbe interactions and evolution. *Natural Product Reports* 32, 956–970. <https://doi.org/10.1039/C5NP00013K>

Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C., Kolter, R., 2013a. Interspecies Interactions Stimulate Diversification of the *Streptomyces coelicolor* Secreted Metabolome. *mBio* 4, e00459-13, mBio.00459-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00459-13>

Traxler, M.F., Watrous, J.D., Alexandrov, T., Dorrestein, P.C., Kolter, R., 2013b. Interspecies Interactions Stimulate Diversification of the *Streptomyces coelicolor* Secreted Metabolome. *mBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00459-13>

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>

Tyc, O., Song, C., Dickschat, J.S., Vos, M., Garbeva, P., 2017. The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology* 25, 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>

Ueda, K., Kawai, S., Ogawa, H.-O., Kiyama, A., Kubota, T., Kawanobe, H., Beppu, T., 2000. Wide Distribution of Interspecific Stimulatory Events on Antibiotic Production and Sporulation Among *Streptomyces* species. *J. Antibiot.* 53, 979–982. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.979>

Uroz, S., Oger, P., Morin, E., Frey-Klett, P., 2012. Distinct Ectomycorrhizospheres Share Similar Bacterial Communities as Revealed by Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *Appl Environ Microbiol* 78, 3020–3024. <https://doi.org/10.1128/AEM.06742-11>

Van Bruggen, A.H.C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R., Morris, J.G., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment* 616–617, 255–268.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>

van der Heul, H.U., Bilyk, B.L., McDowall, K.J., Seipke, R.F., van Wezel, G.P., 2018. Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. *Nat. Prod. Rep.* 35, 575–604. <https://doi.org/10.1039/C8NP00012C>

van Wageningen, A.M., Kirkpatrick, P.N., Williams, D.H., Harris, B.R., Kershaw, J.K., Lennard, N.J., Jones, M., Jones, S.J., Solenberg, P.J., 1998. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* 5, 155–162. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(98\)90060-6](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(98)90060-6)

Velez, P., Espinosa-Asuar, L., Figueroa, M., Gasca-Pineda, J., Aguirre-von-Wobeser, E., Eguiarte, L.E., Hernandez-Monroy, A., Souza, V., 2018. Nutrient Dependent Cross-Kingdom Interactions: Fungi and Bacteria From an Oligotrophic Desert Oasis. *Front Microbiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01755>

Vicente, C.M., Thibessard, A., Lorenzi, J.-N., Benhadj, M., Hôtel, L., Gacemi-Kirane, D., Lespinet, O., Leblond, P., Aigle, B., 2018. Comparative Genomics among Closely Related Streptomyces Strains Revealed Specialized Metabolite Biosynthetic Gene Cluster Diversity. *Antibiotics* 7, 86. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040086>

Vinayavekhin, N., Saghatelian, A., 2010. Untargeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 30, Unit 30.1.1-24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3001s90>

Wagman, G.H., Cooper, R., 1988. *Natural Products Isolation: Separation Methods for Antimicrobials, Antivirals and Enzyme Inhibitors*. Elsevier.

Wakefield, J., Hassan, H.M., Jaspars, M., Ebel, R., Rateb, M.E., 2017. Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-cultivation. *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01284>

Waksman, S.A., Harris, D.A., Kupferberg, A.B., Singher, H.O., Styles, H., 1949. Streptocin, Antibiotic Isolated from Mycelium of *Streptomyces griseus*, Active Against *Trichomonas vaginalis*, and Certain Bacteria. *Experimental Biology and Medicine* 70, 308–312. <https://doi.org/10.3181/00379727-70-16909>

Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapono, C.A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A.V., Meehan, M.J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P.D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R.D., Pace, L.A., Quinn, R.A., Duncan, K.R., Hsu, C.-C., Floros, D.J., Gavilan, R.G., Kleigrewe, K., Northen, T., Dutton, R.J., Parrot, D., Carlson, E.E., Aigle, B., Michelsen, C.F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B.T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R.A., Sims, A.C., Johnson, A.R., Sidebottom, A.M., Sedio, B.E., Klitgaard, A., Larson, C.B., Boya P, C.A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D.J., Silva, D.B., Marques, L.M., Demarque, D.P., Pociute, E., O'Neill, E.C., Briand, E., Helfrich, E.J.N., Granatosky, E.A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J.J., Zeng, Y., Vorholt, J.A., Kurita, K.L., Charusanti, P., McPhail, K.L., Nielsen, K.F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M.F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O.B., Baric, R., Silva, R.R., Mascuch, S.J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P.G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A.M.C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B.M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J.E., Metz, T.O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K.M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P.R., Palsson, B.Ø., Pogliano, K., Lington, R.G., Gutiérrez, M., Lopes, N.P., Gerwick, W.H., Moore, B.S., Dorrestein, P.C., Bandeira, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* 34, 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>

Wapinski, I., Pfeffer, A., Friedman, N., Regev, A., 2007. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature* 449, 54–61. <https://doi.org/10.1038/nature06107>

Weber, T., Kim, H.U., 2016. The secondary metabolite bioinformatics portal: Computational tools to facilitate

- synthetic biology of secondary metabolite production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, Special Issue on “Bioinformatic tools and approaches for Synthetic Biology of natural products” 1, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2015.12.002>
- Weissman, B.A., Gross, S.S., 1998. Measurement of NO and NO Synthase. *Current Protocols in Neuroscience* 5, 7.13.1-7.13.22. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0713s05>
- Weissman, K.J., 2015. The structural biology of biosynthetic megaenzymes. *Nature Chemical Biology* 11, 660–670. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1883>
- Weissman, K.J., Leadlay, P.F., 2005. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat Rev Microbiol* 3, 925–936. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1287>
- Williams, W.K., Katz, E., 1977. Development of a Chemically Defined Medium for the Synthesis of Actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11, 281–290. <https://doi.org/10.1128/AAC.11.2.281>
- Wolfe, K.L., Liu, R.H., 2007. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8896–8907. <https://doi.org/10.1021/jf0715166>
- Wu, C., Kim, H.K., van Wezel, G.P., Choi, Y.H., 2015. Metabolomics in the natural products field – a gateway to novel antibiotics. *Drug Discovery Today: Technologies* 13, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2015.01.004>
- Xia, H., Li, X., Li, Z., Zhan, X., Mao, X., Li, Y., 2020. The Application of Regulatory Cascades in *Streptomyces*: Yield Enhancement and Metabolite Mining. *Front Microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00406>
- Xu, L., Dong, Z., Fang, L., Luo, Y., Wei, Z., Guo, H., Zhang, G., Gu, Y.Q., Coleman-Derr, D., Xia, Q., Wang, Y., 2019. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic Acids Res* 47, W52–W58. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz333>
- Xue, C., Li, T., Deng, Z., Fu, H., Lin, W., 2006. Janthinolide A-B, two new 2,5-piperazinedione derivatives from the endophytic *Penicillium janthinellum* isolated from the soft coral *Dendronephthya* sp. *Pharmazie* 61, 1041–1044.
- Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T., Ueda, K., 2005. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology*, 151, 2899–2905. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28139-0>
- Ye, Y., Minami, A., Igarashi, Y., Izumikawa, M., Umemura, M., Nagano, N., Machida, M., Kawahara, T., Shinya, K., Gomi, K., Oikawa, H., 2016. Unveiling the Biosynthetic Pathway of the Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptide Ustiloxin B in Filamentous Fungi. *Angew. Chem. Int. Ed.* 55, 8072–8075. <https://doi.org/10.1002/anie.201602611>
- Yoon, B.K., Jackman, J.A., Valle-González, E.R., Cho, N.-J., 2018. Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>
- Yu, Y., Zhang, Q., Deng, Z., 2017. Parallel pathways in the biosynthesis of aminoglycoside antibiotics. *F1000Res* 6. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11104.1>
- Zeilinger-Migsich, S., Mukherjee, P.K., 2014. Editorial-Fungus-Fungus Interactions. *TOMYCYJ* 8, 27–27. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010027>
- Zhang, Z., Du, C., Barys, F. de, Liem, M., Liakopoulos, A., Wezel, G.P. van, Choi, Y.H., Claessen, D., Rozen, D.E., 2020. Antibiotic production in *Streptomyces* is organized by a division of labor through terminal genomic differentiation. *Science Advances* 6, eaay5781. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay5781>

Zhu, F., Lu, L., Fu, S., Zhong, X., Hu, M., Deng, Z., Liu, T., 2015. Targeted engineering and scale up of lycopene overproduction in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 50, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.008>

Zuck, K.M., Shipley, S., Newman, D.J., 2011. Induced Production of *N*-Formyl Alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by Co-culture with *Streptomyces peucetius*. *Journal of Natural Products* 74, 1653–1657. <https://doi.org/10.1021/np200255f>

Zuo, G., Hao, B., 2015. CVTree3 Web Server for Whole-genome-based and Alignment-free Prokaryotic Phylogeny and Taxonomy. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 13, 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.004>

ANNEXE – LISTE DES COMMUNICATIONS

Activation des voies de biosynthèse cryptiques par des co-cultures bactériennes / fongiques

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

¹ Université de Lorraine, INRA, DynAMic, F-54000 Nancy, France; ² Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Séminaire International, LUE, IMPACT BIOMOLECULES, 2019, Palma de Mallorca, Espagne

L'émergence de nouvelles bactéries multi-résistantes est aujourd'hui un enjeu de santé publique et la découverte de nouveaux antibiotiques devient cruciale pour surmonter cette menace. Les bactéries (principalement les actinomycètes, par exemple les *Streptomyces*) et les champignons sont l'une des principales sources de composés antimicrobiens (métabolites spécialisés). Cependant, la plupart des groupes de gènes codant pour ces métabolites secondaires restent silencieux dans des conditions de laboratoire standard. Les interactions biotiques entre les microbes dans la nature constituent un signal pour induire la production de métabolites spécialisés. Ainsi, les co-cultures en laboratoire, qui imitent ces interactions, peuvent induire la production de produits naturels cryptiques. L'objectif de cette étude est d'induire la production de composés antimicrobiens à travers les co-cultures entre *Streptomyces* et champignons.

Les champignons et les *Streptomyces* environnementaux ont été co-cultivés sur deux milieux. L'extraction des métabolites a été réalisée dans de l'acétate d'éthyle. L'activité antibiotique résultant de l'interaction sera criblée contre des souches indicatrices et a été caractérisée par des méthodes de chimie analytique (LC-DAD, GC-MS et LC-MS / MS) et une analyse statistique multivariée.

144 co-cultures ont été réalisées entre 9 champignons et 8 *Streptomyces* environnementaux sur deux milieux. Les résultats préliminaires ont permis d'identifier 2 couples bactériens et fongiques sur un même milieu avec une activité antimicrobienne accrue ou nouvelle contre les bactéries Gram +. Le profilage métabolique avec LC-DAD et GC / MS couplé à une analyse statistique a révélé une nouvelle production de métabolites. LC-MS / MS dans les modes positifs et négatifs et la mise en réseau moléculaire ont révélé différentes classes de composés induits lors des interactions.

Activation of cryptic biosynthetic pathways by bacterial/fungal co-cultures

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

¹ Université de Lorraine, INRA, DynAMic, F-54000 Nancy, France; ² Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Abstract

The emergence of new multiresistant bacteria is nowadays a public health issue and the discovery of new antibiotics becomes crucial to overcome this threat. Bacteria (mostly actinomycetes e.g. *Streptomyces*) and fungi are one of the major source of antimicrobial compounds (specialized metabolites). However, most of the gene clusters coding for these secondary metabolites remain silent in standard lab conditions. Biotic interactions between microbes in nature constitute a signal to induce the production of specialized metabolites. Thus, co-cultures in lab, that mimick these interactions, can induce the production of cryptic natural products. The objective of this study is to induce the production of antimicrobial compounds through the co-cultures between *Streptomyces* and fungi.

Fungi and environmental *Streptomyces* have been co-cultivated on two media. Metabolites extraction was performed in ethyl acetate. The antibiotic activity resulting from the interaction will be screened against indicator strains and were characterized by analytical chemistry methods (LC-DAD, GC-MS and LC-MS/MS) and statistical multivariate analysis.

144 co-cultures were achieved between 9 fungi and 8 environmental *Streptomyces* on two media. Preliminary results enabled to identify 2 bacterial and fungal couples on one medium with an increased or a new antimicrobial activities against Gram+ bacteria. Metabolic profiling with LC-DAD and GC/MS coupled with statistical analysis has revealed new metabolite production. LC-MS/MS in positive and negative modes and molecular networking revealed different classes of compounds induced during interactions.

Activation of cryptic biosynthetic pathways by bacterial/fungal co-cultures

Mathieu NEALE^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE and Pierre LEBOND¹

¹Université de Lorraine, INRA, DYNAMIS, F-54000 Nancy, France; ²Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Introduction

The emergence of new antibiotic resistance is nowadays a public health issue and the discovery of new antibiotics becomes crucial to overcome this threat. Bacteria (mostly actinomycetes e.g. *Streptomyces*) and fungi are one of the major source of antimicrobial compounds (specialized metabolites). However, most of the gene clusters coding for these secondary metabolites remain silent in standard lab conditions. Biotic interactions between microbes in nature constitute a signal to induce the production of specialized metabolites. Thus, co-culture in lab, that mimick these interactions, can induce the production of cryptic natural products. The objective of this study is to induce the production of antimicrobial compounds through the co-cultures between *Streptomyces* and fungi.

Strategy



Results

Antimicrobial effects were observed during interactions

A screening of 344 interactions was performed. Two interactions between two *Streptomyces* and one fungus showed an enhancement of antimicrobial activity as a new antimicrobial activity against indicator strains.

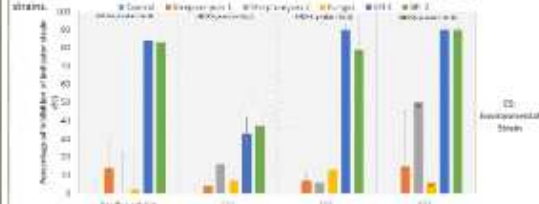


Figure 2: Antimicrobial activities observed during interactions
These histograms showed the percentage of inhibition observed for *Streptomyces* and fungal control and their resulting interaction zones. One classical *Bacillus subtilis* and 3 environmental strains (S1, E2, E3) were used as indicator strains. Anova test and t-tests confirmed the difference observed between interaction zones than single cultures.

Metabolite profiles revealed new induced metabolites

Discrimination between co-cultures and single culture with Partial Least Square – Discriminant Analysis (PLS-DA) was significant (R²-D: 96/94 on two predictive components). A heat map based on the Variable Important for Projection (VIP) of PLS-DA revealed different patterns between single and co-cultures.

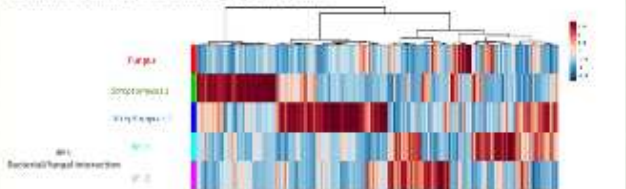


Figure 3: Heat-map revealed a production of new metabolites during interactions
Metabolite profiling was performed by GC-MS. Spectral data (retention time and m/z) were extracted with MARIUS 2 and analyzed by using metabolite/analyst. Partial least square discriminant analysis was performed and gave a list of variable important for projection (VIP) on the spectral data which permit the discrimination of each category. A heat-map was constructed by using these VIP.

A high diversity of compounds classes were induced during interactions

Molecular networking revealed the production of 311 ions with 50% of these ions possess no match to chemical classes. The other ions were identified among their molecular class and divided into 11 superclasses, 26 classes and 32 sub-classes. Interactions in lab confirmed the enhancement of the diversity during microbial interactions and highlight the high potential of chemical production among microbial communities.

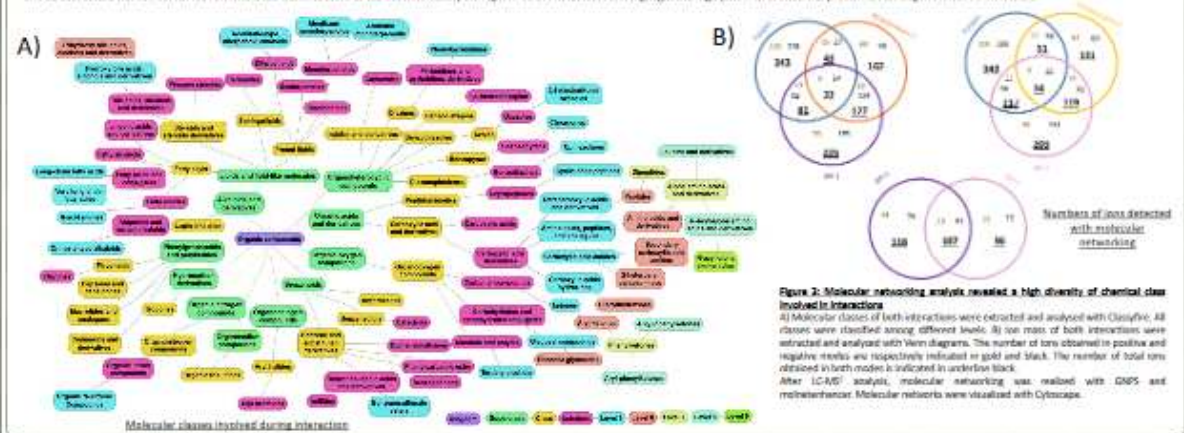
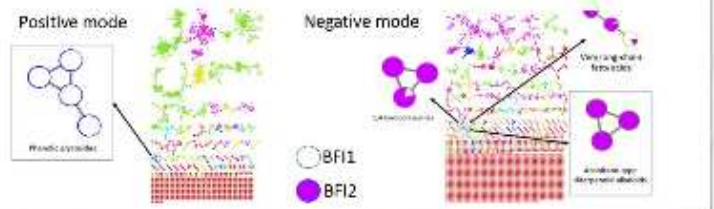


Figure 4: Molecular networking analysis revealed a high diversity of chemical class involved in interactions
A) Molecular classes of both interactions were extracted and analyzed with Classyfire. All classes were identified among different levels. B) Ion mass of both interactions were extracted and analyzed with Venn diagrams. The number of ions obtained in positive and negative modes are respectively indicated in gold and black. The number of total ions obtained in both modes is indicated in underlines black. After LC-MS analysis, molecular networking was realized with GNPS and metabolite/analyst. Molecular networks were visualized with Cytoscape.

Specific networks were observed for interactions

On molecular networks, most of the observed networks gave nodes specific of B1 linked with nodes of single cultures. Four networks were specific of B1 unlinked with single cultures. For example, phenolic glycosides compounds and acetate-type diterpenoid alkaloids were only produced by only BFI1 and BFI2 respectively. In addition, 1,4-benzodiazepine and very long-chain fatty acids compounds were produced in both interactions. Pie charts revealed that some were common to both interactions (circle filled with two colors) and another were specific of one interaction (see chart filled with one color).

Figure 5: Molecular networking analysis revealed specific networks for interactions
Analysis of each network revealed molecular networks specific of the interactions. After LC-MS analysis, molecular networking was realized with GNPS and metabolite/analyst. Molecular networks were visualized with Cytoscape.



Conclusion

- Bacterial and fungal interaction (BFI) induced an enhancement of a new antimicrobial activities
- Different classes of compounds were induced during interactions
- Active fractions were obtained

Perspectives

- ➔ To identify compounds present in active fractions
- ➔ To isolate bioactive compounds
- ➔ To understand the biological role of each class of compounds involved during interactions

Activation de composés antimicrobiens par des co-cultures bactériennes / fongiques

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

¹ Université de Lorraine, INRA, DynAMic, F-54000 Nancy, France; ² Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Congrès FEMS, 2019, Glasgow, Ecosse

Contexte:

Les molécules antimicrobiennes naturelles telles que les antibiotiques et les antifongiques ont profondément changé la médecine moderne et amélioré la santé humaine. Cependant, avec l'émergence croissante de bactéries pathogènes multi-résistantes, il existe aujourd'hui un besoin d'identifier de nouvelles molécules et activités antimicrobiennes.

Les micro-organismes constituent l'une des principales sources de produits naturels bioactifs et, par exemple, environ la moitié des antibiotiques utilisés en médecine humaine proviennent du seul genre bactérien *Streptomyces*. Malgré cette production prolifique, les approches d'extraction du génome ont révélé que *Streptomyces* et d'autres microbes connus pour produire des molécules bioactives hébergent beaucoup plus de clusters de gènes de biosynthèse génétique que prévu auparavant et peuvent cacher de nouvelles sources de nouveaux composés qui restent cryptiques dans des conditions de laboratoire.

Objectifs:

Parce qu'ils imitent les interactions biotiques naturelles qui peuvent induire la biosynthèse de molécules bioactives, notre approche consiste à effectuer des co-cultures entre les champignons et les *Streptomyces* afin de réveiller des grappes de gènes cryptiques chez l'un ou les deux partenaires. Après cela, les métabolites et les voies de biosynthèse seront identifiés par des méthodologies métabolomiques et transcriptomiques.

Méthodes:

Les champignons et les *Streptomyces* environnementaux ont été co-cultivés sur deux milieux. L'extraction des métabolites a été réalisée dans de l'acétate d'éthyle. L'activité antibiotique résultant de l'interaction sera criblée contre des souches indicatrices et a été caractérisée par des méthodes de chimie analytique (LC-DAD, GC-MS).

Résultats:

144 co-cultures ont été réalisées entre 9 champignons et 8 *Streptomyces* environnementaux sur deux milieux. Les résultats préliminaires ont permis d'identifier 3 couples bactériens et fongiques sur un même milieu avec des activités antimicrobiennes potentiellement accrues contre les bactéries Gram +. Le profilage métabolique avec LC-DAD et GC-MS a révélé une nouvelle production de métabolites.

Activation of antimicrobial compounds by bacterial/fungal co-cultures

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

¹ Université de Lorraine, INRA, DynAMic, F-54000 Nancy, France; ² Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Background:

Natural antimicrobial molecules such as antibiotics and antifungals have profoundly changed the modern medicine and improved human health. However, with the increasing emergence of multiresistant pathogenic bacteria, there is nowadays a need to identify new molecules and antimicrobial activities.

Microorganisms constitute one of the principal source of bioactive natural products and, for instance, about half of the antibiotics used in the human medicine comes from the sole bacterial genus *Streptomyces*. Despite this prolific production, genome mining approaches have revealed that *Streptomyces* and other microbes known to produce bioactive molecules harbour many more gene biosynthetic gene clusters than earlier expected and potentially conceal new sources for novel compounds that remain cryptic in lab conditions.

Objectives:

Because they mimic natural biotic interactions that can induce bioactive molecule biosynthesis, our approach is to perform co-cultures between fungi and *Streptomyces* in order to awake cryptic gene clusters in one or both partners. After that, metabolites and biosynthetic pathways will be identified by metabolomics and transcriptomics methodologies.

Methods:

Fungi and environmental *Streptomyces* have been co-cultivated on two media. Metabolites extraction was performed in ethyl acetate. The antibiotic activity resulting from the interaction will be screened against indicator strains and were characterized by analytical chemistry methods (LC-DAD, GC-MS).

Results:

144 co-cultures were achieved between 9 fungi and 8 environmental *Streptomyces* on two media. Preliminary results enabled to identify 3 bacterial and fungal couples on one medium with potentially increased antimicrobial activities against Gram+ bacteria. Metabolic profiling with LC-DAD and GC-MS has revealed new metabolite production.

Activation of cryptic antimicrobial compounds by microbial co-cultures

Mathieu NICHAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

* mathieu.nicault@univ-lorraine.fr

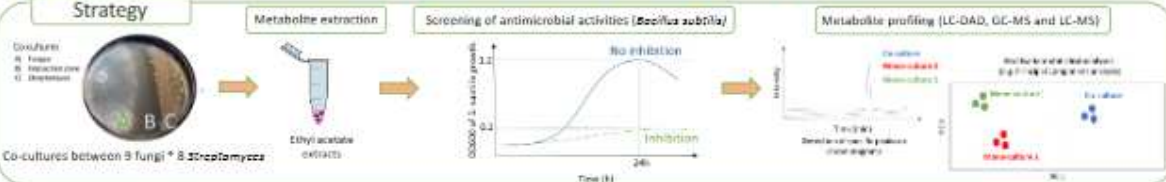
¹ Université de Lorraine, INRA, DYNAMIC, F-54000 Nancy, France; ² Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France



Introduction

The **emergence of new multiresistant bacteria** is nowadays a public health issue and the **discovery of new antibiotics** becomes crucial to overcome this threat. **Bacteria** (mostly actinomycetes e.g. *Streptomyces*) and **fungi** are one of the major **source of antimicrobial compounds** (secondary metabolites). However, **most of the gene clusters coding for these secondary metabolites remain silent** in standard lab conditions. Biotic interactions between microbes in nature constitute a signal to induce the production of specialized metabolites. Thus, **co-cultures** in lab, which mimic these interactions, can induce the production of **cryptic natural products**. The objective of this study is to perform **co-cultures between *Streptomyces* and fungi** (e.g. *Schizophyllum commune*) for the production of **new antimicrobial compounds**.

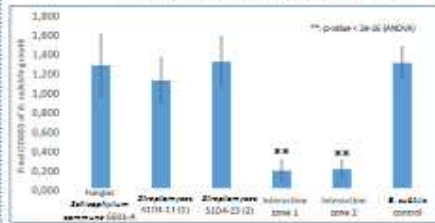
Strategy



Results

Antimicrobial activity during interaction

→ Among 144 co-cultures, 2 models were selected for their antimicrobial activity during interactions



The growth of *S. subtilis* was challenged in presence of ethyl acetate extracts obtained from: control cultures of *Streptomyces* SID4-11, *Streptomyces* SID4-23, the fungus *S. commune* 6601A and their interaction zones. The growth of the bacteria in presence of all the single culture extracts was the same than the *S. subtilis* control. Interaction zones inhibited the growth of *S. subtilis*, indicating the presence of an antimicrobial activity not observed in the controls.

Interaction zone 1: interaction between *S. commune* and *Streptomyces* SID4-11
Interaction zone 2: interaction between *S. commune* and *Streptomyces* SID4-23

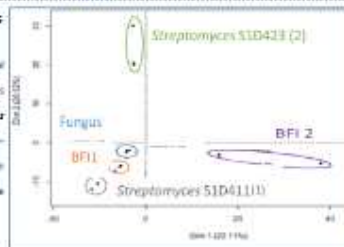
2) Are new metabolites produced during interactions?

1) Is the metabolite production different during interactions?

2) Are new metabolites produced during interactions?

PCA revealed specific metabolite profiles during interactions

Principal component analyses were performed from metabolite profiles (biological triplicates) with HPLC-DAD recorded in 5 wavelengths. The global metabolite profiles obtained from the fungus *S. commune* 6601A (blue circle) and two *Streptomyces* single cultures (gray and green circles) were compared with the respective co-cultures interaction zones of each *Streptomyces* and the fungus *S. commune* (purple and orange circles). The non-overlapping of circles indicates that global metabolite profiles are different in interaction zones than single cultures.



BFI1: Bacterial-Fungal interaction between *S. commune* and *Streptomyces* SID4-11
BFI2: Bacterial-Fungal interaction between *S. commune* and *Streptomyces* SID4-23
→ 300% of the variability was explained with 5 principal components.
→ Analyses were performed only on common peaks between replicates (40%).

GC-MS revealed the production of 10 metabolites during interaction

- 10 peaks specific of the interactions were identified
- 5 were common for the two interactions
- 3 were specific of the interaction with *Streptomyces* SID4-23 and 2 with *Streptomyces* SID4-11

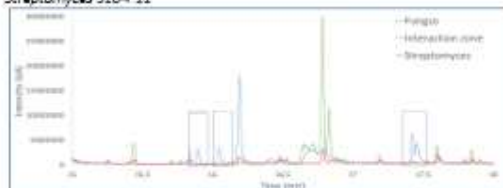


Illustration of the comparison of GC-MS metabolite profiles of one *Streptomyces*, the fungus and their interaction zone. The metabolite profile of *Streptomyces* is in red, the one of the fungus is in green and the interaction zone is in blue. New peaks induced during the interaction are framed by blue rectangles.

LC-MS revealed the production of new metabolites in interaction zones

- So far, negative mode EICs revealed at least the production of 4 new metabolites in interaction zones between *S. commune* 6601-A and *Streptomyces* SID4-11

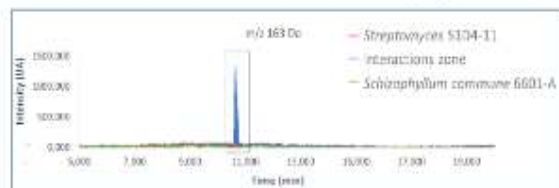


Illustration of the comparison of LC-MS metabolite profiles of one *Streptomyces*, the fungus and their interaction zone for the Extracted-ion chromatograms for m/z 163. The metabolite profile of *Streptomyces* is in red, the one of the fungus is in green and the interaction zone is in blue. The peak at 11 minutes is specific of the interaction.

Conclusions and perspectives

- Two interaction models between *S. commune* and two *Streptomyces* strains showed an induced antimicrobial activity.
- The metabolite profiles of interactions are different from those of single cultures.
- LC-MS and GC-MS peaks, potentially explaining these differences, were identified

➤ Further experiments:

- ✓ To further analyse LC/MS (positive mode/second interaction) and GC/MS
- ✓ To correlate the antimicrobial effect with the production of new compounds
- ✓ To decipher the molecular mechanisms involved during the interactions

Elicitation de composés antimicrobiens cryptiques par co-culture microbienne

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

¹ Université de Lorraine, INRA, DynAMic, F-54000 Nancy, France; ² Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Séminaire Ecole doctorale SIRENa, 2019, Nancy-Brabois, France

Les molécules antimicrobiennes naturelles telles que les antibiotiques et les antifongiques ont profondément changé la médecine moderne et amélioré la santé humaine. Cependant, avec l'émergence croissante de bactéries pathogènes multi-résistantes, il existe aujourd'hui un besoin d'identifier de nouvelles molécules et activités antimicrobiennes. Les micro-organismes constituent l'une des principales sources de produits naturels bioactifs et, par exemple, environ la moitié des antibiotiques utilisés en médecine humaine proviennent du seul genre bactérien *Streptomyces*. Malgré cette production prolifique, les approches d'extraction du génome ont révélé que *Streptomyces* et d'autres microbes connus pour produire des molécules bioactives hébergent beaucoup plus de clusters de gènes de biosynthèse génétique que prévu auparavant et peuvent cacher de nouvelles sources de nouveaux composés qui restent cryptiques dans des conditions de laboratoire.

Parce qu'ils imitent les interactions biotiques naturelles qui peuvent induire la biosynthèse de molécules bioactives, notre approche consiste à effectuer des co-cultures entre les champignons et les *Streptomyces* afin de réveiller des grappes de gènes cryptiques chez l'un ou les deux partenaires. Après cela, les métabolites et les voies de biosynthèse seront identifiés par les méthodologies métabolomiques de transcriptomique du sable. Les champignons et les *Streptomyces* environnementaux ont été co-cultivés sur deux milieux. L'extraction des métabolites a été réalisée dans de l'acétate d'éthyle. L'activité antibiotique résultant de l'interaction sera criblée contre des souches indicatrices et a été caractérisée par des méthodes de chimie analytique (LC-DAD, GC-MS).

144 co-cultures ont été réalisées entre 9 champignons et 8 *Streptomyces* environnementaux sur deux milieux. Les résultats préliminaires ont permis d'identifier 3 couples bactériens et fongiques sur un même milieu avec des activités antimicrobiennes potentiellement accrues contre les bactéries Gram +. Le profilage métabolique avec LC-DAD et GC-MS a révélé une nouvelle production de métabolites.

Elicitation of cryptic antimicrobial compounds by microbial co-culture

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

¹ Université de Lorraine, INRA, DynAMic, F-54000 Nancy, France; ² Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Natural antimicrobial molecules such as antibiotics and antifungals have profoundly changed the modern medicine and improved human health. However, with the increasing emergence of multiresistant pathogenic bacteria, there is nowadays a need to identify new molecules and antimicrobial activities. Microorganisms constitute one of the principal source of bioactive natural products and, for instance, about half of the antibiotics used in the human medicine comes from the sole bacterial genus *Streptomyces*. Despite this prolific production, genome mining approaches have revealed that *Streptomyces* and other microbes known to produce bioactive molecules harbour many more gene biosynthetic gene clusters than earlier expected and potentially conceal new sources for novel compounds that remain cryptic in lab conditions.

Because they mimic natural biotic interactions that can induce bioactive molecule biosynthesis, our approach is to perform co-cultures between fungi and *Streptomyces* in order to awake cryptic gene clusters in one or both partners. After that, metabolites and biosynthetic pathways will be identified by metabolomics and transcriptomics methodologies. Fungi and environmental *Streptomyces* have been co-cultivated on two media. Metabolites extraction was performed in ethyl acetate. The antibiotic activity resulting from the interaction will be screened against indicator strains and were characterized by analytical chemistry methods (LC-DAD, GC-MS).

144 co-cultures were achieved between 9 fungi and 8 environmental *Streptomyces* on two media. Preliminary results enabled to identify 3 bacterial and fungal couples on one medium with potentially increased antimicrobial activities against Gram+ bacteria. Metabolic profiling with LC-DAD and GC-MS has revealed new metabolite production.

Elicitation of cryptic secondary metabolites by microbial co-cultures

Mathieu NICAUSE^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GOUHAY¹ and Pierre LEBLOND¹
¹ Université de Lorraine, INRA, DYNAMIC, F-54000 Nancy, France; ² Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Introduction

The emergence of new multiresistant bacteria is nowadays a public health issue and the discovery of new antibiotics became crucial to overcome this threat. Bacteria (mostly actinomycetes like *Streptomyces*) and fungi are a major sources of antibiotics, but many gene clusters encoding for secondary metabolites production remain unexpressed in lab conditions. Biotic interactions between microbes in nature constitute a signal to induce the production of specialized metabolites. Lab co-cultures, in mimicking these interactions can activate cryptic gene clusters and enabling new compounds discovery.

Objectives

- To trigger the expression of metabolite silent gene clusters through microbial co-cultures.
- To identify and characterize the induced metabolites.

Methods

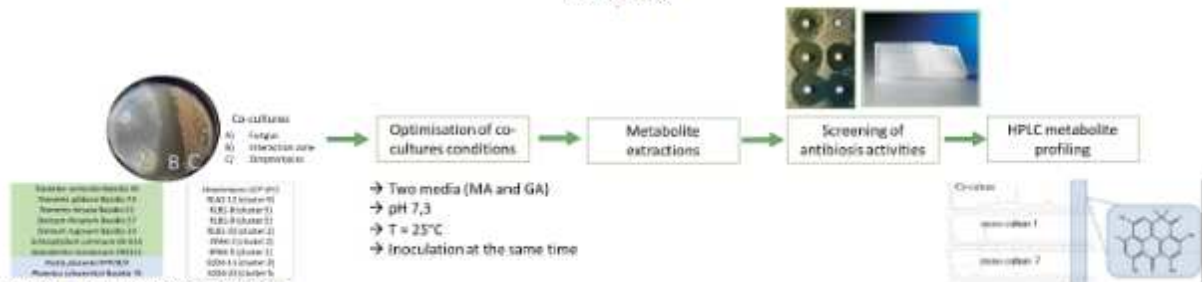


Figure 1: Strategy to study bacteria/fungus interactions

Design and optimisation of the co-cultures performed between 8 environmental *Streptomyces* and 9 wood decay fungi and screening strategy for metabolite extraction, antibiotic activity and characterization to compare fungal (zone A) bacterial (zone B) and interaction co-culture zone (zone C).

Results

1) Co-cultures showed different metabolite signatures compared to single strain culture

- ➔ 177 global metabolite profiles were recorded at 24 wavelengths
- ➔ Medium influence metabolite production (data not shown)
- ➔ The global metabolite production is different between the controls and interaction zones

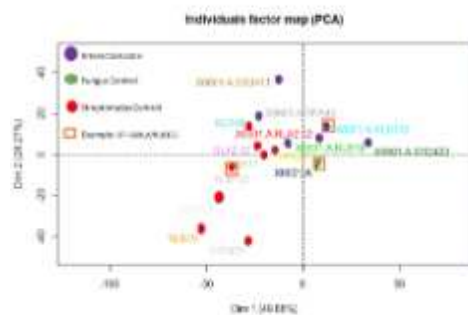


Figure 2: Example of comparison of global metabolite production between single and co-cultures. The metabolite profiles were determined with HPLC-DAD in different wavelengths and statistically compared with Principal Component Analysis. The global metabolite profiles obtained from the fungus *S. commune* 6601A (green dot) and 8 independent *Streptomyces* single cultures (red dots with bacterial strain name) were compared with the respective co-cultures interaction zones of each *Streptomyces* and the fungus (orange dot). One example of differential production is indicated by orange squares.

2) Co-cultures enhance antimicrobial activity

- ➔ 7 over 144 interactions shows an enhancement of co-culture antimicrobial activity against one Gram+ Bacteria

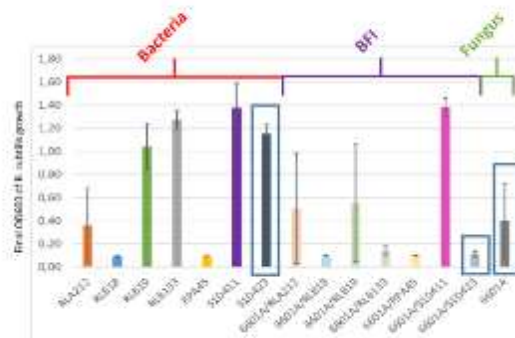


Figure 3: Differential antimicrobial activities against *Bacillus subtilis* between single and co-cultures

B. subtilis liquid growth was challenged in presence of ethyl acetate extracts obtained from single cultures of *Streptomyces* (black histograms), the fungus *S. commune* 6601A (grey histograms) and their interaction zones in co-culture (coloured histograms). Experiments were performed in 96-well microplates for 24h and *Bacillus* growth monitored by OD (600nm).

3) Identification of molecules specifically produced during co-culture

- ➔ We investigated the profiles with enhance activities against *Bacillus* to detect specific peaks in the co-culture

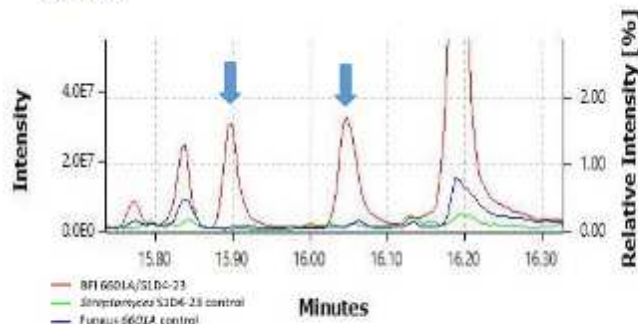


Figure 4: Example of identification of induced compounds during the co-culture of *S. commune* and *Streptomyces* S1D6-23. The single cultures (blue and green) and the interaction zone resulting from co-culture (red) between *S. commune* and *Streptomyces* S1D6-23 were compared in GC-MS. An example of new peaks induced during co-culture are indicating by the two blue arrows.

Conclusions/perspectives

- Metabolomics profiling has revealed a differential molecule production during the interaction
- Screening of 7 different fungal and *Streptomyces* co-culture enabled to select promising interaction models
- These couples have shown an enhancement of inhibitory activities
- Further experiments:
 - ✓ To extend the screening to other indicator strains (e.g. multiresistant or pathogenic microorganisms) and other activities.
 - ✓ To identify and to characterize the induced metabolites and their biosynthetic pathways.
 - ✓ To decipher the molecular mechanisms involved during the interactions for a better understanding of the ecological microbial interactions in soil environment.

Interactions bactéries / champignons (BFI): un moyen d'induire la production de nouveaux métabolites bioactifs

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

¹Université de Lorraine, INRA, DynAMic, F-54000 Nancy, France

²Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Séminaire LUE IMPACT BIOMOLECULES, 2018, Nancy-Brabois, France

Les biomolécules sont des composés du système vivant. Ce sont des macromolécules comme les protéines sont de petites molécules comme les métabolites secondaires. L'une des principales sources de biomolécules est le micro-organisme. En effet, ils ont produit 23 000 composés (Lazzarini et al., Antonie van Leeuwenhoek, 2000). Ces composés sont des antimicrobiens, des antifongiques ou des herbicides. Des problèmes récents comme l'émergence de souches multi-résistantes ou la toxicité des produits agricoles ont pour conséquences la découverte de nouvelles biomolécules. L'analyse génomique a révélé que les micro-organismes ont des amas de gènes de métabolites secondaires silencieux dans des conditions de laboratoire standard. Pour réveiller ces gènes, la co-culture qui imite l'interaction présente dans la nature peut induire la production de nouveaux métabolites (Betrand et al., Biotechnology advances, 2013; Traxler et al., Natural Product Reports, 2015).

Le but de ce travail est de réaliser une co-culture entre les bactéries *Streptomyces* et différents champignons. Après l'optimisation des différentes étapes, 144 interactions bactéries / champignons entre 8 bactéries et 9 champignons ont été obtenues sur deux milieux. Après l'extraction des métabolites secondaires des zones d'interaction bactéries / champignons (BFI) et les contrôles bactériens et fongiques, différentes analyses ont été réalisées. Les tests d'antibiose ont été effectués contre différentes souches indicatrices (*E. coli*, *Bacillus* et levure). Après, un profil métabolique HPLC a été réalisé si une activité était détectée. Les résultats de ce travail sont (i) une production différentielle de métabolites a été observée sur le BFI, (ii) une augmentation de l'activité antimicrobienne a été observée dans le BFI et (iii) de nouveaux pics sont observés sur les profils de métabolite HPLC du BFI. Après cela, les prochains objectifs de ce travail sont (i) d'étendre le dépistage des activités biologiques contre d'autres souches (pathogènes et phytopathogènes), (ii) d'identifier les molécules induites et les voies de biosynthèse impliquées lors de la co-culture et (iii) de déchiffrer les mécanismes moléculaires impliqués lors des interactions microbiennes.

Bacteria/fungi Interactions (BFI): a way to induce the production of new bioactive metabolites

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹

¹Université de Lorraine, INRA, DynAMic, F-54000 Nancy, France

²Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Biomolecules are compounds from living system. They are macromolecules like protein are small molecules like secondary metabolites. One of the major sources of biomolecules are microorganism. Indeed, they produced 23 000 compounds (Lazzarini *et al.*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **2000**). These compounds are antimicrobials, antifungal or herbicides. Recent problems like emergence of multiresistant strains or toxicity of agricultural products have for consequences the discovery of new biomolecules. Genomic analysis revealed microorganisms have secondary metabolite gene clusters silent under standard lab conditions. To awake these gene clusters, co-cultivation that mimic the interaction present in nature can induce the production of new metabolites (Betrand *et al.*, *biotechnology advances*, **2013**; Traxler *et al.*, *Natural Product Reports*, **2015**).

The aim of this work is to realize co-culture between the bacteria *Streptomyces* and different fungi. After the optimisation of the different steps, 144 bacteria/fungi interactions between 8 bacteria and 9 fungi were obtained on two media. After the extraction of secondary metabolites of bacteria/fungi interaction zones (BFI) and the bacterial and fungal controls, different analyses were realized. The antibiosis assays were performed against different indicator strains (*E. coli*, *Bacillus* and yeast). After, HPLC metabolic profiling were realized if an activity was detected. The results of this work are (i) differential metabolite production was observed on BFI, (ii) an enhancement of antimicrobial activity was observed in BFI and (iii) new peaks are observed on HPLC metabolite profiles of BFI. After that, the next objectives of this work are (i) extend the screening of biological activities against other strains (pathogens and phytopathogens), (ii) identify the molecules induced and the biosynthetic pathways involved during co-culture and (iii) decipher the molecular mechanisms involved during microbial interactions.

Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Eric GELHAYE¹ and Pierre LEBLOND¹
¹Université de Lorraine, INRA, DynAmic, F-54000 Nancy, France
²Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

Introduction

- The emergence of new multiresistant bacteria is nowadays a public health issue.
- The discovery of new antibiotics became crucial to overcome this problem.
- Bacteria (mostly actinomycetes like *Streptomyces*) and fungi are a major sources of antibiotics.
- However many gene clusters encoding for secondary metabolites production remain not expressed in lab conditions.
- Co-cultures, that mimic the interactions occurring in nature that induce production of specialized metabolites, is a way to activate these silent gene clusters.
- Objectives of this work are :
 - To awake these silent gene clusters through co-cultures between microorganisms.
 - To characterize the induced metabolites.
 - To decipher the basis of the interactions leading to secondary metabolite biosynthesis.

Methods



- 144 co-cultures between 8 *Streptomyces* and 9 fungal strains were performed on two media.
- The antibiosis activities of the ethyl acetate extracts of single cultures (A and C in fig1) and of their interaction zones (B in fig 1) are then tested and compared against indicator microorganisms (*E. coli*, *Bacillus*, yeast)

Figure 1 - Example of a co-culture between a *Streptomyces* and a fungus
 On MA medium, a fungus (A) and a *Streptomyces* (C) are incubated at the same time. The zone (B) represents the interaction zone between the two microorganisms.

Results

- 1) All the tested *Streptomyces* exhibited direct antifungal capacities during the co-cultures (1 to 9 out of 9 fungi were inhibited depending of *Streptomyces* strains) and gave interaction zones (B in fig1).
- 2) 12 out of 144 interaction zones showed an induced activity in comparison to single cultures.
- 3) A differential metabolite production was observed between single and co-cultures.

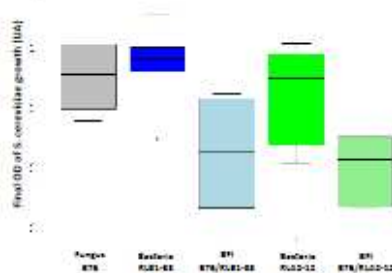


Figure 2: Example of enhanced inhibitory activities in co-culture interaction zones compared to single cultures
 Yeast growth was measured by spectrophotometry in media supplemented with extracts from single strain cultures of the fungus B76 (grey), the bacteria RLB1-33 (blue) or RLA2-12 (green). Comparisons with the interaction zone extracts of the fungus/bacteria co-cultures B76/RLB1-33 (lightblue) and B76/RLA2-12 (lightgreen) showed greater inhibitory activities.

4) HPLC chromatograms of single and co-cultures indicated the presence of new metabolites

Figure 4: Chromatograms of single and co-cultures between the fungus B76 and the *Streptomyces* sp. RLA2-12
 The chromatograms were recorded at 254 nm with MeOH(+ 0,1% acid formic)/Water(+ 0,1% acid formic) gradient. The orange chromatogram represents the metabolite profile of *Streptomyces* RLA2-12. The blue chromatogram represents the metabolite profile of the fungus B76. The grey chromatogram represents the metabolite profile of interaction zone. Interaction between the fungus B76 and *Streptomyces* RLA2-12 could induce the production of 3 new metabolites (green circles)

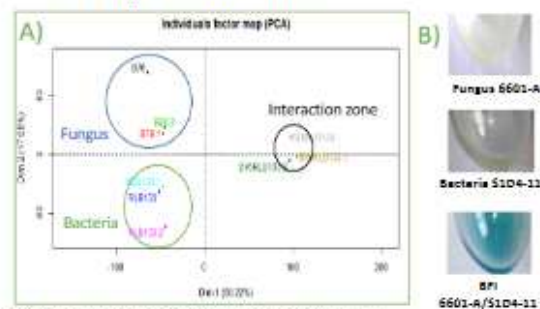
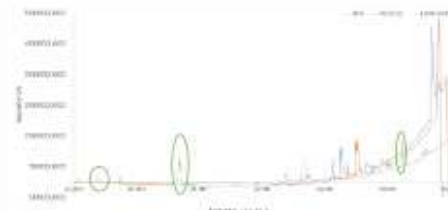


Figure 3: Observations of differential metabolite production
 A) The global metabolite production of single cultures of the fungus B76 and of the bacterium RLB1-33 are statistically different from their interaction zones (PCA analysis). B) A blue pigment is present in the interaction zone of the co-culture between the fungus B601-A and the bacterium S1D4-11, but not the single cultures, indicating a difference in metabolite production.



Conclusion/Perspectives

- The screening method of the interaction is set up.
- In some cases, co-cultures showed an enhancement of the inhibitory activity that can rely on new metabolite production.
- Further experiments :
 - To extend the screening to others couples and indicator strains (multiresistant and phytopathogenic microorganisms).
 - To identify and to characterize the induced metabolites (new peaks on chromatograms) and their biosynthetic pathways.
 - To decipher the molecular mechanisms involved during the interactions



Déchiffrer et exploiter les dialogues bactéries-champignons pour identifier de nouveaux métabolites bioactifs

Matthieu NICAULT^{1,2,3,4}, Cyril BONTEMPS^{1,2}, Éric GELHAYE^{3,4} and Pierre LEBLOND^{1,2}

¹ UMR 1128, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² UMR 1128, Institut National de la Recherche Agronomique, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

³ UMR1136, interactions arbres/micro-organismes, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁴ UMR1136, Institut National de la Recherche Agronomique, interactions arbres/micro-organismes, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Journées Jean Chauvignon, 2018, Aussois, France

Depuis leur découverte il y a 70 ans, les molécules antimicrobiennes comme les antibiotiques et les molécules antifongiques ont profondément changé la médecine moderne et amélioré la santé humaine. Cependant, avec l'émergence récente de bactéries pathogènes multi-résistantes, il existe aujourd'hui un besoin d'identifier de nouvelles molécules et activités antimicrobiennes. Les micro-organismes constituent l'une des principales sources de produits naturels bioactifs et, par exemple, la moitié des antibiotiques utilisés en médecine humaine provient du genre bactérien *Streptomyces*. Fait intéressant, la récente prospection de la séquence du génome de souches connues pour produire des molécules d'intérêt a révélé que de nombreux groupes de gènes étaient potentiellement impliqués dans la production d'autres molécules. Cependant, ils sont restés cryptiques dans des conditions de culture en laboratoire.

Notre objectif principal est de réveiller ces molécules cryptiques à travers des co-cultures de champignons et de bactéries. En effet, du fait qu'elles imitent les interactions biotiques naturelles, une telle approche est capable de déclencher l'expression de gènes cryptiques silencieux dans l'une ou l'autre espèce (voir pour revue Bertrand et al., *Biotech.Advances*, 32, 1180–1204, 2014). Pour ce faire, des souches modèles et des collections environnementales de champignons et de bactéries (principalement des *Streptomyces*) seront co-cultivées et criblées avec des essais biologiques contre des souches indicatrices (par exemple, bactéries, champignons, souches multirésistantes) pour découvrir de nouvelles activités antimicrobiennes potentielles. Des méthodes de chimie analytique (LCMS, RMN, IMS) seront utilisées pour identifier des molécules uniques ou en mélange avec des bioactivités intéressantes. Enfin, des approches génomiques (RNAseq, extraction de génomes) seront réalisées pour identifier les gènes activés lors de l'interaction et aideront à déchiffrer comment les microbes interagissent et communiquent.

Deciphering and exploiting bacteria-fungi dialogues to identify new bioactive metabolites

Matthieu NICAULT^{1,2,3,4}, Cyril BONTEMPS^{1,2}, Éric GELHAYE^{3,4} and Pierre LEBLOND^{1,2}

¹ UMR 1128, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² UMR 1128, Institut National de la Recherche Agronomique, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

³ UMR1136, interactions arbres/micro-organismes, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

⁴ UMR1136, Institut National de la Recherche Agronomique, interactions arbres/micro-organismes, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Since their discovery 70 years ago, antimicrobial molecules like antibiotics and antifungal molecules have profoundly changed the modern medicine and improved human health. However, with the recent emergence of multiresistant pathogenic bacteria, there is nowadays a need to identify new molecules and antimicrobial activities. Microorganisms constitute one of the principal source of bioactive natural products and, for instance, the half of the antibiotics used in the human medicine comes from the bacterial genus *Streptomyces*. Interestingly, the recent prospection of the genome sequence of strains known to produce molecules of interest has revealed that many gene clusters were potentially involved in the production of other molecules. However, they remained cryptic in lab culture conditions.

Our main objective is to awake these cryptic molecules through co-cultures of fungi and bacteria. Indeed, because the mimic natural biotic interactions, such approach is able to trigger the expression of silent cryptic gene clusters in one or the other species (see for review Bertrand et al., *Biotech.Advances*,32,1180–1204,2014). To do so, model strains and environmental collections of fungi and bacteria (mostly *Streptomyces*) will be co-cultivated and screened with bioassays against indicator strains (e.g.bacteria, fungi, multiresistant strains) to unravel potential new antimicrobial activities. Analytical chemistry methods (LCMS, NMR, IMS) will be used to identify single or mixture of molecules with interesting bioactivities. Finally, genomic approaches (RNAseq, genome mining) will be performed to identify the activated genes during interaction and will help to decipher how microbes interact and communicate.

Deciphering and exploiting Bacteria-Fungi interactions to identify new bioactive metabolites



Matthieu NICAULT^{1,2}, Cyril BONTEMPS¹, Éric GELHAYE² and Pierre LEBLOND¹
¹UMR 1128, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France
²UMR 1136, Interactions Arbres-Microorganismes, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France
 Email : matthieu.nicault@univ-lorraine.fr

Introduction

- The emergence of new multiresistant bacteria has become nowadays a public health issue and there is an urge to discover new antibiotics¹
- Most antibiotics used in medicine are obtained from bacteria (mostly actinomycetes like *Streptomyces*) and fungi
- Genomic analyses have revealed that many strains harbor numerous metabolite gene clusters that remain cryptic in standard lab conditions
- Co-cultivation, that mimic the interactions occurring in nature, is a way to activate these cryptic gene clusters²

Objectives

- To awake these silent cryptic gene clusters through co-cultivation
- To characterize the products of co-cultivation
- To decipher the basis of the interactions between microorganisms

Methodology

- Bacteria (mostly genome sequenced *Streptomyces*) and fungi (mostly basidiomycetes) were co-cultivated
- The interactions were realized in two ways : (i) fungal exudates were incorporated in *Streptomyces* growth medium and (ii) both strains were co-cultivated on solid medium
- The production of bioactive molecules from mono-cultures and interaction zones in co-cultures was tested with bioassays against indicator strains (bacteria, yeast, fungi)



Fig. 1: Principle of Bioassays

A piece of agar (plug) from a 5 day culture of the producer is incubated on an indicator strain lawn. After diffusion of the produced molecules from the plug in the bioassay plate, the presence of an antimicrobial activity is revealed by a growth inhibition zone of the indicator strain

- If antimicrobial activities are detected, metabolites will be extracted, analyzed and identified (HPLC, multivariate data, MS, NMR)
- To decipher the genetic bases of the interaction, transcriptomic approaches (e.g. RNAseq) will be used to identify the genes activated during co-cultivation

Preliminary results :

- *Streptomyces* strains have an important antifungal activity
 - 8 single *Streptomyces* culture and 72 co-cultures were performed and 50% of the tested *Streptomyces* can inhibit the growth of at least one fungus
 - Some *Streptomyces* exhibit a large range of antifungal activities (e.g. some strains can inhibit the growth of 7 out of 9 fungi)
- The presence of fungal exudates can activate or stimulate gene cluster expression



Fig. 2: Bioassay of *Streptomyces* sp. RPA4-5 grown in presence or not of fungal exudates.

The *Streptomyces* was grown for 5 days in presence or not of a fungus exudate. Plugs of *Streptomyces* were then tested on a *Bacillus* lawn used as indicator strain. A) Plug of medium with the fungus exudate only does not inhibit the *Bacillus* growth. B) *Streptomyces* without fungal exudate exhibits a small inhibition zone. C) The presence of fungal exudate in the culture medium induces a larger zone of inhibition that can result either from a stimulation of the molecule produced in B) or from the activation of cryptic compounds.

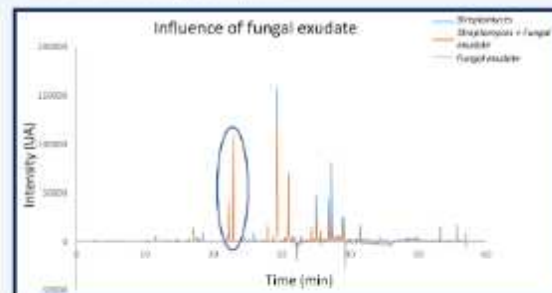


Fig. 3: Metabolites HPLC profiles of *Streptomyces* sp. RPA4-5 in presence of fungal exudate.

HPLC was realized with gradient mode. Methanol (+ 0,1% formic acid) and water (+ 0,1% formic acid) were used as solvents to extract molecules directly from the culture medium. The chromatograms were recorded at 254 nm. The blue circle indicates a metabolites over-production in presence of fungal exudate.

Conclusions and further works

- *Streptomyces* have potential antifungal activities
- The presence of fungal exudates can activate cryptic gene clusters expression
- Further screenings, notably using resistant indicator strains, will be performed to discover new activities
- The produced molecules will be characterized

References

- Uenta et al., The Journal of Antibiotics, 70, 341-345, 2017
- Bertrand et al., Biotechnologies Advances, 32, 1180-1204, 2014

Résumé

L'émergence de résistances multiples aux antibiotiques chez les micro-organismes pathogènes constitue une menace importante en santé humaine. L'identification de principes actifs nouveaux avec des cibles cellulaires et des mécanismes originaux est un besoin urgent et en ce sens les micro-organismes du sol (bactéries et champignons) riches en molécules biologiques constituent un réservoir d'intérêt.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à des souches isolées conjointement (communauté) de *Streptomyces*, des bactéries filamenteuses du sol produisant plus de la moitié des antibiotiques utilisés en médecine. Une analyse conjointe du métabolome et du génome de 8 souches (dont 5 ont été séquencés au cours de cette étude) a montré une diversité importante des voies de biosynthèse de métabolites spécialisés au sein de cette communauté. Afin de stimuler l'expression de nouvelles molécules cryptiques en conditions de laboratoire, la co-culture de ces *Streptomyces* et de champignons a été réalisée. Un criblage de 64 co-cultures entre 8 souches de *Streptomyces* et 8 espèces de champignons Basidiomycètes a été réalisé en suivant des activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires et anti-oxydantes induites (c'est-à-dire produites en co-culture mais pas dans les cultures seules des bactéries et des champignons). Nos criblages ont révélé deux interactions prometteuses dont les produits ont été analysés par la combinaison d'une approche métabolomique couplant chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse (**GC-MS**), chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Un fractionnement guidé par l'activité antimicrobienne a permis d'identifier un ensemble de composés candidats en lien avec l'activité antimicrobienne.

En révélant une grande variabilité des gènes de biosynthèse de molécules biologiques, nos résultats ont permis dans un premier temps de circonscrire la communauté comme un cadre d'échantillonnage approprié pour rechercher des molécules biologiques d'intérêt chez les *Streptomyces*. Ces gènes étant pour la plupart cryptiques en conditions de laboratoire, nous avons pu également souligner l'intérêt de la co-culture comme stimulus biotique permettant leur production, en faisant une approche prometteuse en biotechnologie.

Mots clés : Génomique, Métabolomique, Co-cultures, *Streptomyces*, Champignons, Basidiomycètes

Abstract

The emergence of multiple resistance to antibiotics in pathogenic microorganisms poses a significant threat to human health. The identification of new active ingredients with cellular targets and original mechanisms is an urgent need and in this sense soil microorganisms (bacteria and fungi) rich in biological molecules constitute a reservoir of interest.

During this thesis, we were interested in jointly isolated strains (community) of *Streptomyces*, filamentous bacteria from the soil producing more than half of the antibiotics used in medicine. A joint analysis of the metabolome and the genome of 8 strains (5 of which were sequenced during this study) showed a significant diversity of the biosynthetic pathways of specialized metabolites within this community. In order to stimulate the expression of new cryptic molecules under laboratory conditions, the co-culture of these *Streptomyces* and fungi was performed. A screening of 64 co-cultures between 8 strains of *Streptomyces* and 8 species of Basidiomycetes fungi was performed by monitoring induced antimicrobial, anti-inflammatory and anti-oxidant activities (i.e. produced in co-culture but not in cultures only bacteria and fungi). Our screens revealed two promising interactions whose products were analyzed by the combination of a metabolomics approach coupling gas chromatography, mass spectrometry (GC-MS), liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS / MS). Antimicrobial activity-guided fractionation has identified a set of candidate compounds related to antimicrobial activity.

By revealing a large variability of genes for the biosynthesis of biological molecules, our results first allowed us to define the community as an appropriate sampling framework to search for biological molecules of interest in *Streptomyces*. As these genes are mostly cryptic under laboratory conditions, we were also able to underline the interest of co-culture as a biotic stimulus allowing their production, making it a promising approach in biotechnology.

Keywords: Genomics, Metabolomics, Co-cultures, *Streptomyces*, Mushrooms, Basidiomycetes